

HUGO CHEINQUER

ASSOCIAÇÃO ENTRE O VÍRUS B DA HEPATITE E O CARCINOMA  
HEPATOCELULAR PRIMÁRIO: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, CLÍNICO,  
LABORATORIAL E IMUNO-HISTOQUÍMICO

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA  
MÉDICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CLÍNICA MÉDICA

Porto Alegre, 1990

HUGO CHEINQUER

ASSOCIAÇÃO ENTRE O VÍRUS B DA HEPATITE E O CARCINOMA  
HEPATOCELULAR PRIMÁRIO: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, CLÍNICO,  
LABORATORIAL E IMUNO-HISTOQUÍMICO

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA  
MÉDICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CLÍNICA MÉDICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GASTROENTEROLOGIA

ORIENTADOR: LUIZ PEREIRA-LIMA

Porto Alegre, 1990

A Silvia

pela paciência, inspiração e estímulo

Aos meus pais, Mauricio e Dacia,  
por estarem ao meu lado nos momentos  
mais decisivos

Ao Professor Jorge Pereira-Lima,  
por uma formação

## AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é um trabalho de equipe. Quero, pois, agradecer a todos aqueles que contribuíram, de forma generosa e desinteressada, para a realização deste projeto.

Em primeiro lugar ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Pereira-Lima, por ter acreditado em mim muito mais do que eu próprio, meu profundo agradecimento.

Expresso também minha eterna gratidão aos Drs. Cláudio Galleano Zettler e Lígia Maria Barbosa Coutinho, do Departamento de Patologia da FFFCMPA, pelo inestimável auxílio na realização da técnica imuno-histoquímica e na análise dos resultados. Posso dizer, sem medo de errar, que sem a sua colaboração esta pesquisa não teria sido realizada.

Dirijo igualmente meus agradecimentos sinceros ao doutorando Ernani Luiz Rohden pela incansável disposição em auxiliar na coleta dos dados. Exemplo de dedicação à pesquisa, sem sombra de dúvida tem um brilhante futuro a sua frente.

À Professora Sídia Jacques, do Departamento de Bioestatística da UFRGS, agradeço pela paciência com que orientou a análise estatística deste trabalho.

Pelo auxílio no corte dos blocos e na preparação das lâminas minha gratidão ao trabalho primoroso realizado pela Srta. Iara, técnica do Departamento de Patologia da FFFCMPA.

Aos meus colegas da Enfermaria 42 da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, minha lembrança pelos sábios conselhos e estímulo constante.

Meu agradecimento maior a minha esposa Silvia, juntamente com minhas desculpas pelas horas roubadas. Seu amor e compreensão me fizeram trabalhar com entusiasmo redobrado.

Por último, mas não menos importante, minha homenagem aos pacientes deste e de outros estudos. Muito mais do que as anônimas iniciais que os representam, constituem o objetivo final de nosso esforço.

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	08
1.1 Características gerais do VBH .....	12
1.2 Métodos de detecção dos antígenos do VBH .....	15
1.3 Evidências da associação entre o VBH e o CHP .....	19
1.4 Mecanismos envolvidos na carcinogênese .....	25
2 - OBJETIVOS .....	29
2.1 Gerais .....	30
2.2 Específicos .....	30
3 - MATERIAL E MÉTODOS .....	32
3.1 Material .....	33
3.2 Reagentes .....	35
3.3 Métodos .....	40
4 - RESULTADOS .....	49
4.1 Aspectos epidemiológicos do CHP .....	50
4.2 Aspectos clínicos do CHP .....	50
4.3 Aspectos laboratoriais do CHP .....	58
4.4 Aspectos imuno-histoquímicos do CHP .....	62
4.5 Correlação entre os diversos aspectos do CHP e a presen- ça do VBH .....	63
5 - DISCUSSÃO .....	70
5.1 Aspectos epidemiológicos do CHP .....	70
5.2 Aspectos clínicos do CHP .....	82
5.3 Aspectos laboratoriais do CHP .....	98
5.4 Aspectos imuno-histoquímicos do CHP .....	105
5.5 Correlação entre os diversos aspectos do CHP e a presen- ça do VBH .....	112
6 - CONCLUSÕES .....	123
7 - ANEXOS .....	131

7.1 Anexo A - protocolo para levantamento dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos casos de CHP .....	132
7.2 Anexo B - lâminas de imunoperoxidase e histologia dos casos de CHP .....	133
8 - RESUMO .....	140
9 - ABSTRACT .....	143
10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	146

1 - INTRODUÇÃO



## 1 - INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular primário (CHP) é um dos tumores malignos mais comuns da espécie humana, sendo diretamente responsabilizado por cerca de 750 mil óbitos por ano em âmbito mundial (214).

A própria Organização Mundial da Saúde atesta este fato, admitindo que o CHP deva ser reconhecido como o segundo câncer mais comum na humanidade, precedido apenas pelo câncer pulmonar (257).

Sua distribuição geográfica, no entanto, não é uniforme. Apresenta índices elevados de incidência e prevalência em áreas do continente africano e asiático, em contraste com os baixos percentuais encontrados na maioria dos países ocidentais (84).

Em Moçambique, por exemplo, a incidência do CHP varia entre 100 a 150 casos novos por 100.000 habitantes/ano, sendo provavelmente a mais elevada do mundo (89, 265, 279). Em Formosa é considerado a segunda causa de morte entre adultos do sexo masculino (332), enquanto na África do Sul é o responsável por 65,5% de todos os tumores malignos entre adultos do sexo masculino, ou seja, aproximadamente 60 vezes mais que nos Estados Unidos (151, 160, 265). Na tribo dos Bantu, no leste africano,

quatro de cada cinco necrópsias revelam a presença do CHP (101, 156, 302), contrastando com o ocidente, onde o CHP é encontrado em menos de 1% das necrópsias (114, 302). De fato, em uma análise de 94.556 necrópsias realizadas na Universidade da Califórnia em Los Angeles, EUA, no período compreendido entre 1918 e 1980, foram encontrados apenas 339 casos de CHP (84). Outros relatos, mesmo confirmando a raridade do CHP nos países ocidentais, evidenciam um aumento recente e progressivo em sua incidência (198, 202, 289), sendo que na Califórnia sua freqüência triplicou nos últimos 20 anos (263).

Ao longo do tempo, vários agents distintos têm sido implicados na etiologia do CHP, destacando-se entre os principais as aflatoxinas (11, 184, 197), o álcool (182, 188, 322, 349), os hormônios esteróides (61, 350, 352) e a presença de cirrose (311, 312, 313). A partir da descoberta do agente etiológico da hepatite B por Blumberg e col. (41) em 1965, começaram a surgir relatos relacionando-o ao desenvolvimento do CHP (55, 303, 327, 332). Constatou-se, então, que os locais com alta freqüência de CHP eram, invariavelmente, hiperendêmicos para o vírus B da hepatite (VBH), da mesma maneira que uma grande proporção de pacientes com CHP apresentava positividade para vários marcadores da infecção pelo VBH (338, 346).

No Reino Unido, por exemplo, a taxa de mortalidade por CHP é de 1 a 2 por 100.000 habitantes e a taxa de portadores do VBH na

população da ordem 0,1 por 100.000, enquanto que na China a mortalidade por CHP é de aproximadamente 17 por 100.000 habitantes com uma taxa de VBH na população variando entre 7,5 e 14 por 100.000 (302).

Beasley e col. (25), em estudo clássico na literatura, avaliaram prospectivamente 22.707 homens em Formosa, demonstrando que aqueles positivos para o antígeno de superfície do VBH desenvolviam o CHP cerca de 223 vezes mais freqüentemente do que os negativos.

Postula-se atualmente o papel fundamental do VBH como principal agente etiológico do CHP, sendo encontrado em até 80% dos casos (257). Os demais fatores mencionados, como as aflatoxinas e o álcool, são considerados agentes cocarcinogênicos, provavelmente potencializando a ação oncogênica do VBH (24, 214, 219).

Mais recentemente, com o surgimento de técnicas imunohistoquímicas, que identificam a presença dos antígenos do VBH no tecido hepático através do uso de anticorpos mono ou policlonais, tem aumentado consideravelmente a sensibilidade e a especificidade dos métodos de detecção do VBH, permitindo sua demonstração em um número cada vez maior de pacientes com CHP (1, 90, 253).

No Brasil, a prevalência do VBH na população varia entre 0,3% no Estado de São Paulo e 10,34% na região amazônica, sendo que no Rio Grande do Sul estima-se uma taxa de portadores assintomáticos da ordem 1,14% (54). A ocorrência de CHP no país também é variável, parecendo maior nas regiões Norte e Nordeste em relação as regiões Sul e Sudeste (106, 262, 265, 293).

No Rio Grande do Sul, é ainda desconhecida a associação do CHP com a infecção pelo VBH. Com o objetivo de estudar esta relação, procederemos inicialmente a uma revisão das características gerais do VBH, seus principais métodos de detecção e as evidências que o apontam como agente etiológico primordial do CHP. Serão igualmente analisadas as teorias vigentes quanto aos possíveis mecanismos envolvidos na carcinogênese.

### 1.1 - Características gerais do VBH

O primeiro traço bioquímico da existência do VBH surgiu em 1965, quando Blumberg e col. (41) identificaram a presença de um antígeno desconhecido no soro de um aborígine australiano. Quando em contato com anticorpos presentes no soro de dois pacientes hemofílicos poli-transfundidos este antígeno reagiu, formando uma linha de precipitação no sistema de difusão em ágar.

O novo antígeno, inicialmente denominado Antígeno Austrália (AgAU), parecia estar relacionado a doenças como a leucemia e a síndrome de Down (41, 42), até que dois estudos independentes realizados em 1968 nos Estados Unidos (271) e no Japão (240) sugeriram fortemente sua associação com uma forma de hepatite viral com longo período de incubação, conhecida até então como hepatite sérica.

Trabalhos subseqüentes confirmaram a relação do AgAU com a hepatite sérica, valendo a Blumberg o Prêmio Nobel de Medicina em 1977 (213, 302, 319).

O estudo do soro dos pacientes com reação positiva para o AgAU através da microscopia eletrônica revelou a presença de três partículas distintas: a primeira a ser reconhecida, e a mais numerosa, apresentava-se com forma esférica e diâmetro de 22nm (23); a segunda partícula era de forma tubular e diâmetro variando entre 50 e 200nm (164); a terceira e última partícula a ser identificada foi descrita em 1970 por Dane e col. (72), sendo conhecida como a partícula de Dane. Apresentava forma esférica e diâmetro de 42nm, sendo constituída de uma camada superficial com 7nm de espessura e de uma região central denominada "core" com 27nm de diâmetro.

Estudos imunológicos mostraram que as duas primeiras partículas a serem descritas, esféricas e tubulares

respectivamente, eram antigenicamente idênticas ao AgAU e a camada externa da partícula de Dane, constituindo portanto excesso de proteína viral. Atualmente são denominadas, em conjunto, de antígeno de superfície do VBH (HBsAg). A partícula de Dane, em sua totalidade, representa o vírion completo, sendo chamada de partícula intacta do VBH (164, 302).

Em 1971, Almeida e col. (9) submeteram partículas intactas do VBH à ação de substâncias detergentes que provocaram a ruptura do envelope proteico viral, liberando a porção central (core). O estudo da composição do core ou nucleocapsídeo viral revelou a presença de material genético constituído pelo DNA e uma enzima DNA-polimerase. A análise imunológica mostrou reatividade antigênica distinta do HBsAg, recebendo a denominação de antígeno do core do VBH (HBcAg) (164, 215, 218). Posteriormente ficou evidenciado que o HBcAg não circulava de forma livre no soro, sendo encontrado apenas no tecido hepático de pacientes infectados (215, 217).

Em 1972, Magnius & Espmark (201) descreveram um sub-produto do core do VBH que recebeu a denominação de antígeno "e" do VBH (HBeAg). Sua presença no soro está relacionada com a taxa de replicação viral, sendo considerado em conjunto com a DNA-polimerase, como um dos marcadores do grau de infecciosidade do VBH (163, 308).

As características morfológicas do VBH e de seu DNA, menor do que o de qualquer outro vírus, não permitiram classificá-lo entre os grupos virais já existentes, representando assim uma nova classe viral (122, 282). Considera-se atualmente que o VBH, juntamente com os vírus que provocam hepatite no pato de Pequim (*Anas domesticus*), na marmota (*Marmota monax*) e no esquilo (*Spermophilus beecheyi*) constituem um grupo viral específico denominado hepadna (hepa = tropismo pelo fígado e DNA = ácido desoxiribonucleico) (317).

O VBH, que acomete apenas o homem e alguns primatas, está classificado como hepadna-vírus tipo 1 (212). Cada um dos hepadna-vírus possui semelhança entre si, contendo um DNA circular de dupla hélice, parcialmente aberto, cuja extensão varia entre 3000 e 3300 pares de bases (281). Nos respectivos hospedeiros os hepadna-vírus estão implicados na etiologia das hepatites aguda e crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (84, 256).

## 1.2 - Métodos de detecção dos antígenos do VBH

### 1.2.1 - No soro

As técnicas inicialmente desenvolvidas para a detecção dos antígenos do VBH no soro eram rudimentares e pouco sensíveis. Baseavam-se nos processos de imunodifusão simples (1ª geração) e

fixação de complemento ou contraímunoeletroforese (2<sup>m</sup> geração) (164).

Em 1972, Ling & Overby (190) desenvolveram uma técnica de radioimunoensaio (RIE) usando um anticorpo marcado com iodo radioativo. Este método mostrou-se rápido e sensível, porém caro (278).

Mais recentemente, em 1977, Wolters e col. (358) utilizaram um anticorpo conjugado a uma enzima, provocando uma reação com o antígeno que resultava em uma alteração de cor detectada por espectrofotometria. Esta técnica, denominada enzima imunoensaio (EIA), requer equipamento simples e apresenta sensibilidade e especificidade idênticas ao RIE. Ambos os métodos, RIE e EIA, ditos de 3<sup>m</sup> geração, são considerados os melhores para a detecção do VBH no soro. São superados apenas por técnicas que usam anticorpos monoclonais associados à microscopia eletrônica, cuja aplicação está atualmente restrita à pesquisa devido ao tempo consumido e aos altos custos envolvidos (164).

### 1.2.2 - No tecido

A maior parte dos estudos envolvendo a detecção dos antígenos do VBH no tecido hepático tem sido realizada em casos de infecção crônica, pois o grau de necrose hepatocitária existente nos processos inflamatórios agudos do fígado torna



praticamente impossível a identificação das partículas virais (206, 235, 266, 330).

Os primeiros trabalhos envolvendo a detecção dos antígenos do VBH no tecido hepático surgiram no final da década de 60 e no início dos anos 70. As técnicas usadas foram a microscopia eletrônica (3, 79, 102, 103, 169, 284) e a imunofluorescência (7, 70, 103, 132, 235, 267), ambas demonstrando a presença do HBsAg no citoplasma dos hepatócitos (116, 323, 362). As dificuldades técnicas encontradas na aplicação destes métodos compreendiam, entre outras, a necessidade de equipamento altamente especializado e fixação trabalhosa do material (164).

O primeiro método capaz de detectar o HBsAg em tecido hepático fixado rotineiramente com formalina e incluído em parafina foi descrito por Shikata e col. (305) em 1974. Esta técnica, dita histoquímica, baseia-se na afinidade da orceína e da fucsina pelas ligações disulfídicas presentes na molécula do HBsAg. Apesar do evidente progresso alcançado com este método, denominado de orceína de Shikata, permanecia elevado o grau de subjetividade envolvido na análise dos resultados (325).

Em 1975, Nayak & Sachdeva (228) demonstraram a presença do HBsAg no tecido hepático fixado em formalina e incluído em parafina através da técnica da imunoperoxidase, que utiliza um anticorpo conjugado com a enzima peroxidase (131, 324, 325). Em

comparação com a orceína de Shikata, a imunofluorescência e a microscopia eletrônica, a técnica da imunoperoxidase foi considerada mais sensível e mais específica (2, 8, 111, 128, 131, 170, 178, 228, 328). Além disto, com exceção da imunofluorescência, é a única técnica capaz de demonstrar a presença do do HBcAg e do HBeAg no fígado (18) com a vantagem de permitir uma correlação entre a localização dos antígenos virais e a morfologia hepática (133).

A utilização da técnica da imunoperoxidase representa um passo importante no diagnóstico da infecção pelo VBH, pois permite a realização de estudos retrospectivos a partir do material arquivado em blocos de parafina (325). Em comparação com os métodos sorológicos de 3<sup>ª</sup> geração (RIE e EIA), a imunoperoxidase tem apresentado sensibilidade e especificidade equivalentes na maioria das séries envolvendo lesões hepáticas crônicas (1, 63, 90, 165, 253). Existe um consenso na literatura de que o método da imunoperoxidase detecta a presença do HBsAg em mais de 90% dos casos seropositivos por RIE (325).

Com o objetivo de avaliar a acurácia do método da imunoperoxidase na demonstração de HBsAg no tecido hepático, Theodoropoulos e col. (328) realizaram a técnica em 36 pacientes com cirrose e hepatoma que apresentavam seropositividade para o HBsAg confirmada por RIE. Os autores confirmaram a presença do HBsAg em 34 casos (94,4%), de acordo com o estabelecido na

literatura. Além disto, sabe-se que mesmo os métodos sorológicos de 3<sup>ª</sup> geração não conseguem detectar partículas do VBH em concentrações inferiores a  $10^6$  -  $10^7$  por ml, embora apenas 1 ml de plasma contendo HBsAg numa diluição de  $10^{-7}$  já seja suficiente para infectar seres humanos (253). Nestes casos, o método imunohistoquímico oferece uma possibilidade de se demonstrar a presença do HBsAg e/ou HBcAg no tecido hepático na ausência de marcadores sorológicos por RIE ou EIA (1, 46, 63, 90, 119, 165, 253, 277).

O estudo ideal dos antígenos do VBH deveria combinar os métodos sorológicos e teciduais para alcançar o máximo de sensibilidade e especificidade possíveis nos resultados (253).

Quanto à localização dos antígenos do VBH no tecido hepático, o HBsAg apresenta-se exclusivamente no citoplasma dos hepatócitos, enquanto o HBcAg ocorre preferencialmente no núcleo, embora possa ser encontrado ocasionalmente no citoplasma (325).

### 1.3 Evidências da associação entre o VBH e o CHP

Tradicionalmente a relação causal entre um microorganismo e uma determinada doença deve ser estabelecida através do preenchimento de certos requisitos básicos, conhecidos como postulados de Koch (36, 139). Segundo estes preceitos, o microorganismo deverá ser isolado regularmente nos casos de

doença, ser cultivado fora do corpo do hospedeiro e mantido em cultura pura "in vitro" durante várias gerações e reproduzir a doença em animal suscetível mediante a inoculação da cultura isolada.

No caso dos agentes virais, no entanto, existem certas dificuldades técnicas que impossibilitam uma conclusão indiscutível (35). O VBH, em particular, possui alta especificidade de hospedeiro e impossibilidade de crescimento "in vitro", não permitindo que se satisfaçam os requisitos mencionados (14, 217, 257).

Numa tentativa de adaptar os postulados de Koch ao problema de como provar o papel de um vírus na gênese de um tumor, Henle (118), em 1971, sugeriu as seguintes modificações:

(1) o vírus, seus antígenos ou seu DNA devem estar presentes nas células tumorais;

(2) os anticorpos específicos contra os antígenos virais devem ocorrer com maior frequência em pacientes com o tumor em relação aos controles normais;

(3) o vírus deve ser capaz de transformar células normais "in vitro";

(4) o vírus deve ser capaz de induzir tumores em animais, preferencialmente primatas.

Apesar do VBH não preencher adequadamente os dois últimos postulados de Henle, existe atualmente considerável material clínico e experimental disponível na literatura, deixando pouca margem de dúvida quanto ao papel fundamental exercido pelo VBH na gênese do CHP, seja como agente isolado, seja como co-fator associado a outras condições (14, 25, 75, 81, 82, 89, 107, 115, 152, 154, 155, 157, 158, 182, 185, 214, 217, 242, 265, 276, 298, 320, 341, 355).

As principais evidências que apoiam o VBH como principal agente etiológico do CHP podem ser resumidas como segue:

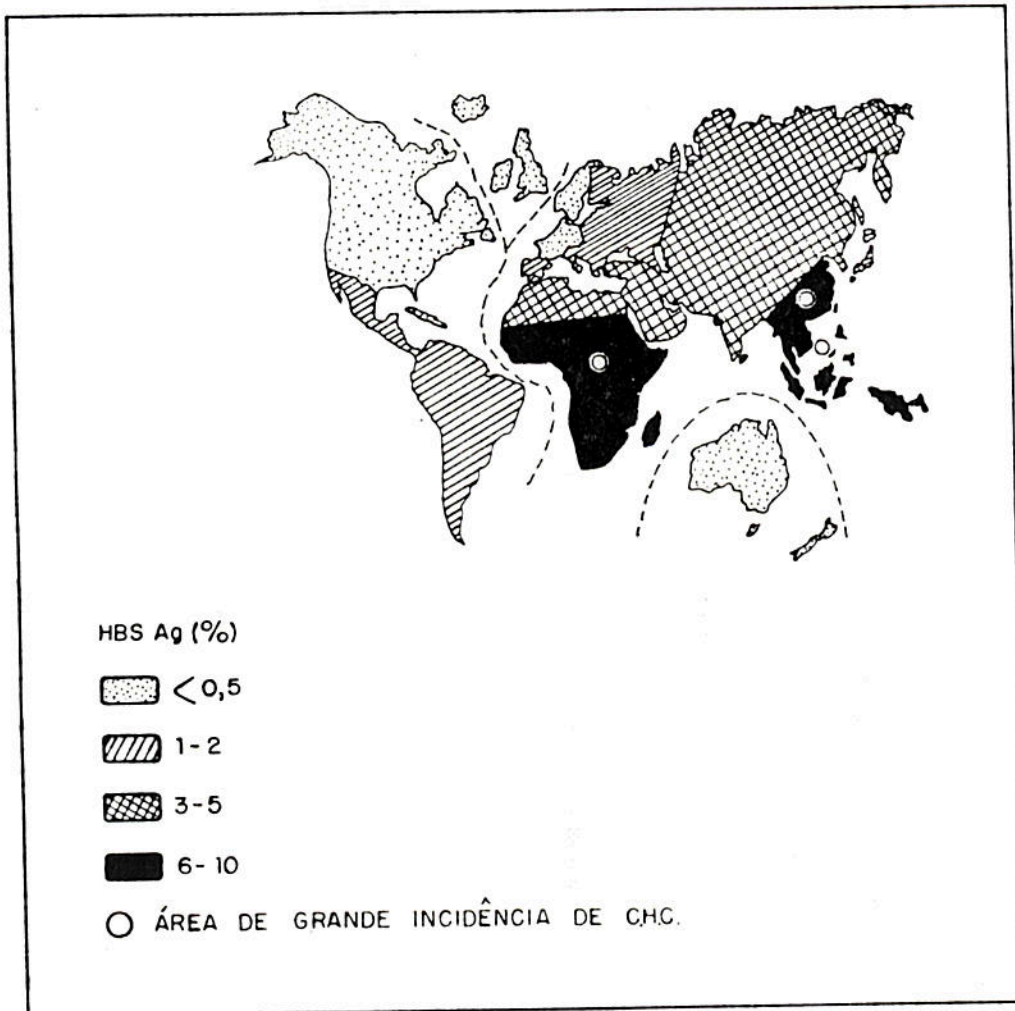
a) existe um paralelismo bem definido entre as áreas geográficas com alta prevalência de CHP e as populações com maior taxa de portadores do HBsAg (80, 107, 195, 310, 320). A representação esquemática da distribuição geográfica do CHP em relação ao VBH pode ser vista na figura 1.1, adaptada de Szmuness (320);

b) os marcadores séricos de infecção pelo VBH são mais frequentemente demonstrados em pacientes portadores de CHP quando comparados aos controles sem CHP na mesma população (24, 25, 120, 137, 138, 140, 141, 160, 191, 232, 236, 242, 258, 272, 279, 287, 288, 303, 309, 321, 326, 363). A tabela 1.1 apresenta a

prevalência da infecção pelo VBH, detectada através da presença do HBsAg e do anti-HBc medidos por RIE ou EIA em pacientes com CHP e seus controles nas diferentes regiões do globo (adaptada de London W.T. (195);

FIGURA 1.1

MAPA ESQUEMÁTICO DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO HBsAg E DO CHP\*



\* Adaptado de Szmuness, W. (320).

TABELA 1.1

## PREVALÊNCIA DO VBH EM PACIENTES COM CHP E CONTROLES\*

país	CHP		controles	
	nº testado	% positivo	nº testado	% positivo
antígeno de superfície do VBH				
Grécia	189	55,0	106	4,7
Espanha	31	19,3	101	2,0
Estados Unidos	34	14,7	56	0
Senegal	291	51,9	100	12,0
Moçambique	29	62,1	35	14,3
Uganda	47	47,0	50	6,0
Zambia	19	63,1	40	7,5
África do Sul	138	59,5	200	9,0
Taiwan	84	54,8	278	12,2
Cingapura	156	35,3	1516	4,1
Japão	260	37,3	4387	2,6
Vietnam	61	80,3	94	24,5
anticorpo contra o "core" do VBH				
Grécia	80	70,0	160	31,9
Espanha	31	87,0	101	14,8
Estados Unidos	33	48,5	56	0
Senegal	291	87,3	100	26,0
África do Sul	76	86,0	103	31,7
Hong Kong	37	70,3	58	36,2

\* Frequência do antígeno de superfície do VBH (HBsAg) e do anticorpo contra o "core" do VBH (anti-HBc) medidos por RIE ou EIA. Dados obtidos de London, W.T. (195).

c) os marcadores teciduais de infecção pelo VBH têm sido demonstrados no núcleo e no citoplasma dos hepatócitos, tanto no tecido hepático peri-neoplásico quanto no interior das células cancerosas (6, 125, 126, 128, 133, 159, 227, 250, 254, 255, 262, 293, 316, 328, 361);

d) vários casos de CHP têm sido relatados em grupamentos familiares, sendo que a maioria dos pacientes apresenta positividade para os marcadores de infecção pelo VBH (74, 180, 187, 237, 333, 334);

e) a integração do genoma do VBH ao DNA do hepatócito tem sido demonstrada no tecido hepático de pacientes portadores do CHP, como ocorre com outros vírus oncogênicos conhecidos (49, 83, 300, 353, 365);

f) várias culturas celulares derivadas de pacientes com CHP têm produzido HBsAg (22, 60, 83, 207), como é o caso da linhagem "Alexander-PLC/PRF/5" (366);

g) o CHP apresenta elevada prevalência em certas espécies animais infectadas com vírus da família hepadna, semelhantes ao VBH (40, 168, 216, 256);

h) a displasia celular, considerada lesão pré-maligna, ocorre com maior frequência em pacientes cirróticos HBsAg-positivos quando comparados aos HBsAg-negativos (5, 59, 62, 64, 149, 151, 275, 283).

A confirmação definitiva da associação causal entre o VBH e o CHP estará provavelmente disponível nas próximas décadas, a partir das alterações observadas na taxa de mortalidade por CHP, após a implementação de programas abrangentes de vacinação contra a infecção pelo VBH, nas regiões de alto risco. A prevenção do



contágio materno-fetal nestas áreas deverá provocar uma drástica redução na incidência do CHP, se for verdadeira a relação atualmente postulada (14, 44, 45, 89, 195, 257).

#### 1.4 - Mecanismos envolvidos na carcinogênese

O mecanismo específico através do qual o VBH promove o surgimento do CHP é ainda desconhecido (87).

As evidências disponíveis a partir de estudos experimentais em animais demonstram que todos os vírus implicados na gênese de tumores, sejam vírus DNA ou RNA, agem através da integração de seu material genético ao genoma do hospedeiro, induzindo as alterações que irão promover a transformação maligna (84, 87).

A natureza das alterações induzidas pelos agentes virais no DNA humano tem sido recentemente clarificada através dos estudos sobre o comportamento biológico das neoplasias a nível molecular e genético. Em 1969, Huebner & Todaro (134) sugeriram pela primeira vez o conceito de oncogenes, formando a base para o modelo atual de carcinogênese, o qual postula a existência de um certo complexo de genes nas células eucarióticas normais, chamados de proto-oncogenes, responsáveis pelo crescimento, diferenciação e divisão da célula (91, 260).

É possível que alterações quantitativas ou qualitativas nos proto-oncogenes, induzidas pela ação de diversos agentes mutagênicos (vírus, radiação, drogas, etc ...) possam provocar variações em sua expressão fenotípica, originando assim divisões celulares desordenadas seguidas por transformação maligna (14, 89, 117, 161, 260, 280, 353). Os proto-oncogenes, ao serem modificados pela ação das substâncias carcinogênicas, recebem a denominação de oncogenes (95, 260).

A seqüência de oncogenes presentes em uma determinada célula pode ser copiada diretamente pelo vírus DNA, originando os oncogenes virais. Estes poderiam então ser transmitidos para outras células do mesmo indivíduo ou, ainda, para outros indivíduos (260). Até o momento os vírus implicados neste processo são conhecidos como retrovírus oncogênicos, por possuírem uma enzima transcriptase reversa, e seus oncogenes estão em grande parte identificados (36).

No entanto, apesar de haver estudos experimentais demonstrando que a indução de neoplasia hepática em ratos promove a expressão dos oncogenes c-myc e c-ras (88), não foram ainda relatados quaisquer dos oncogenes conhecidos no genoma do VBH (183, 242). Por outro lado, vários autores têm mostrado a presença do DNA do VBH integrado ao DNA do hospedeiro através da técnica da hibridização molecular, mesmo nos casos de CHP com sorologia negativa para o VBH (39, 46, 47, 48, 49, 83, 300, 365).

Seqüências integradas de DNA viral foram igualmente demonstradas nos modelos experimentais de CHP induzidos no pato de Pequim (*Anas domesticus*) através da infecção prévia com vírus da família hepadna (256). Resultados semelhantes têm sido relatados em marmotas (*Marmota monax*) (168, 216). Estudos posteriores com a indução de CHP em animais, através do vírus da hepatite, sugerem a ocorrência de transcrição reversa do DNA, relacionando a infecção por estes agentes com a dos retrovírus (134, 318).

Além do efeito direto do VBH no DNA do hepatócito, alguns autores postulam a hipótese de uma ação facilitadora do VBH. Assim, certos agentes que isoladamente seriam incapazes de originar o CHP poderiam, em conjunto com o VBH, provocar a transformação maligna (27). Este mecanismo enquadra-se nos conceitos derivados de estudos experimentais sobre carcinogênese em ratos, onde definiu-se a existência de dois tipos de agentes capazes de provocar um crescimento neoplásico: os "iniciadores" e os "promotores" (264). É possível que a integração do DNA viral com o DNA do hepatócito constitua-se num processo "iniciador" por alterar o comportamento biológico da célula, dependendo porém da presença concomitante de alcoolismo, aflatoxinas, radiação ou outros agentes químicos para agirem como "promotores", isto é, permitindo a perpetuação e transmissão das alterações iniciais (14, 242). Com efeito, vários relatos apontam para uma maior freqüência destes e de outros co-fatores associados ao VBH em

pacientes portadores de CHP (27, 48, 182, 184, 188, 197, 204, 219, 322, 349).

2 - OBJETIVOS

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - Gerais

2.1.1 Avaliar a frequência de CHP em 1000 biopsias hepáticas consecutivas realizadas num período de sete anos na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA).

2.1.2 Avaliar os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos casos de CHP encontrados na ISCMPA.

2.1.3 Avaliar a associação entre os casos de CHP encontrados na ISCMPA e a infecção pelo VBH, determinada através da pesquisa dos antígenos de superfície (HBsAg) e do core (HBcAg) no tecido hepático pelo método imuno-histoquímico da imunoperoxidase (complexo avidina-biotina).

### 2.2 - Específicos

2.2.1 Correlacionar os aspectos epidemiológicos com os achados imuno-histoquímicos.

2.2.2 Correlacionar os aspectos clínicos com os achados imuno-histoquímicos.

2.2.3 Correlacionar os aspectos laboratoriais com os achados imuno-histoquímicos.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS



### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Material

No Departamento de Patologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), foram revisadas 1000 biopsias hepáticas consecutivas, realizadas em igual número de pacientes internados na ISCMPA, no período de julho de 1981 a dezembro de 1988. Neste grupo encontrou-se um total de 11 casos de CHP, cuja distribuição segundo a idade, sexo, cor e data de internação se acha resumida na tabela 3.1.

Fez-se uma relação nominal de todos os pacientes para evitar-se que fossem incluídos como casos novos aqueles submetidos a mais de uma biopsia hepática.

Os tecidos provenientes dos carcinomas hepatocelulares, fixados em formalina a 10% e incluídos em blocos de parafina, foram seccionados na espessura de 5 micrômetros e montados em lâminas de vidro albuminizadas, totalizando 5 cortes seqüenciais

de cada bloco, em lâminas separadas. Após a secagem em estufa a 35°C, por 12 a 24 horas, os cortes foram mantidos à temperatura ambiente até serem submetidos aos procedimentos imunohistoquímicos.

TABELA 3.1

DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR SEGUNDO A IDADE, SEXO, COR E DATA DE INTERNAÇÃO

CASO	INICIAIS	IDADE	SEXO*	COR**	DATA DA INTERNAÇÃO
01	C.C.	53	M	B	dez./83
02	W.D.	64	M	B	jan./84
03	E.D.	36	M	B	mar./84
04	C.L.	44	F	B	fev./85
05	G.G.L.	39	F	P	nov./85
06	A.C.A.	69	F	B	set./86
07	G.T.	62	M	B	fev./87
08	C.M.B.	42	M	B	jun./87
09	J.M.S.	46	M	B	fev./88
10	J.R.C.	55	M	B	mar./88
11	A.O.	42	M	m	mar./88

\* = M = masculino, F = feminino  
 \*\* = B = branca, P = preta, m = mulato

### 3.2 - Reagentes

#### 3.2.1 - Metanol (Merck)

Foi utilizado, juntamente com o peróxido de hidrogênio, para bloquear a peroxidase endógena presente nos tecidos, especialmente nas hemácias. Este é um passo importante, pois alguns desses tumores apresentavam áreas de hemorragia.

#### 3.2.2 - Peróxido de hidrogênio a 30%

#### 3.2.3 - Solução tampão de fosfato (PBS)

Foi assim preparada:

<u>Solução A:</u> $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	13,8 g
Água destilada .....	1000 ml
<u>Solução B:</u> $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	17,8 g
Água destilada .....	1000 ml.

Estas duas soluções (A e B) foram estocadas na geladeira a 4°C.

Para preparar a solução tampão, utilizou-se uma mistura de ambas soluções, na seguinte proporção:

Solução A ..... 26,50 ml  
Solução B ..... 173,50 ml.

Obtém-se 200 ml dessa mistura, à qual se acrescentam 800 ml de água destilada e 8,0 g de cloreto de sódio.

Após, mediu-se o pH dessa mistura. Se este não era igual a 7,6, acrescentavam-se gotas de hidróxido de sódio, 1 N ou 0,1 N, até alcançar o pH de 7,6. Se estivesse muito básico, acrescentava-se, gota à gota, ácido clorídrico, até alcançar o pH desejado.

#### 3.2.4 - Soro Normal

Utilizou-se os soros normais de cabra e de coelho, conforme o anticorpo primário fosse de cabra (HBsAg) ou coelho (HBcAg). Estes soros normais acompanham o Kit do ABC (Vector Laboratories, Inc. - cod. nº PK 4001) e tem a finalidade de prevenir a ligação inespecífica das imunoglobulinas às proteínas séricas.

A diluição usada em ambos os soros foi a seguinte: em 5 ml de PBS foram colocadas 4 gotas de soro normal concentrado de cabra ou coelho.

### 3.2.5 - Anticorpos primários contra o VBH

A) Anti-antígeno de superfície do vírus B da hepatite (aHBsAg):

Foi utilizado o anti-soro aHBsAg (Dako Corporation, cod. nº B 560, lote 056C) obtido por imunização de cabras com HBsAg humano purificado.

O anti-soro aHBsAg concentrado foi diluído em PBS e testado em lâminas de fígado humano HBsAg-positivo (Dako Corporation, Santa Barbara, Ca., E.U.A.), a fim de verificar a diluição mais adequada ao trabalho. A diluição escolhida foi de 1:1000, pois proporcionava uma coloração exclusiva do citoplasma dos hepatócitos HBsAg-positivos e não se observava coloração de fundo.

B) Anti-antígeno do core do vírus B da hepatite (aHBcAg)

Foi utilizado o anti-soro aHBcAg (Dako Corporation, cod. nº B 586, lote 096 Ea) obtido por imunização de coelhos com HBcAg humano purificado.

O anti-soro concentrado foi diluído em PBS e testado em lâminas de fígado humano HBcAg-positivo (Dako Corporation, Santa Barbara, Ca., E.U.A.). A diluição mais apropriada foi de 1:2000, pois proporcionava uma coloração exclusiva do núcleo dos hepatócitos HBcAg-positivos, sem coloração de fundo.

### 3.2.6 - Anticorpos secundários

#### A) De cabra

Utilizou-se o anticorpo secundário, ou seja, a imonoglobulina biotinizada anti-imunoglobulina de cabra do kit da avidina biotina (ABC) (Vector Laboratories, Inc. - cod. nº PK 4.001), para se ligar ao anticorpo primário anti-antígeno de superfície do vírus B da hepatite (aHBsAg) que foi igualmente produzido em cabra. O anticorpo secundário foi diluído na relação de uma gota de anticorpo secundário para cada 10,0 ml de PBS (sendo uma gota igual a 50 microlitros).

#### B) De coelho

Utilizou-se o anticorpo secundário biotinizado de coelho do kit da avidina biotina (ABC) (Vector Laboratories, Inc. - cod. nº PK 4.001), para se ligar ao anticorpo primário anti-antígeno do "core" do vírus B da hepatite (aHBcAg) que foi igualmente produzido em coelho. O anticorpo secundário de coelho foi diluído de maneira idêntica ao de cabra, descrito acima.

### 3.2.7 - Reagente avidina biotina (ABC)

O reagente avidina biotina utilizado faz parte do kit ABC já citado. O reagente foi utilizado diluindo-se 2 gotas de solução A e 2 gotas de solução B (incluídas no kit ABC) em 10,0 ml de PBS, 30 minutos antes de sua utilização.

### 3.2.8 - Substrato peroxidase

Foi utilizado 1 mg de 3-3 diamino-benzidine-tetracloroeto (DAB) (Serva, Heidelberg, Alemanha), diluído em 10,0 ml de TRISHCl, pH 7,6. Essa mistura pode ser mantida em geladeira a 4°C, para posterior utilização.

No momento de se realizar a incubação com o DAB para visualizar a atividade da peroxidase, faz-se uma solução de 15,0 ml de TRISHCl, pH 7,6 e se acrescentam 100 microlitros de peróxido de hidrogênio a 30% e aquece-se a 37°C.

Da mistura de DAB, conservada na geladeira, retiram-se 1,2 ml, misturam-se 3,0 ml da mistura de TRISHCl com peróxido de hidrogênio, preparada na hora, e, ao conjunto, acrescentam-se 1,8 ml de TRISHCl. Teremos 6,0 ml de solução.

### 3.2.9 - TRISHCl

A solução de TRISHCl foi feita da seguinte maneira:

TRIS (hidroximetilaminometano - $C_4H_{11}NO_3$ - Merck,	
cod. nº 8382) .....	12,1 g
Água destilada .....	1000 ml
HCl (ácido clorídrico 32% - Merck cod. nº 317) .....	5 ml.

Esta mistura vai formar o tampão TRISHCl. Deve-se medir o pH e acrescentar o ácido clorídrico até alcançar pH 7,6.

### 3.2.10 - Cloreto de sódio

Utilizado para o tampão PBS anteriormente descrito.

## 3.3 - Métodos

### 3.3.1 - Método imuno-histoquímico

Utilizou-se o método da imunoperoxidase, através da técnica do complexo avidina-biotina (ABC) descrita por Hsu e col. (129) em 1981, por ser mais sensível e permitir uma maior diluição dos anticorpos primários.

A avidina é uma glicoproteína com peso molecular de 68.000 e que possui grande afinidade pela vitamina biotina. Essa afinidade é cerca de um milhão de vezes mais alta do que a maioria dos anticorpos por seus antígenos. A biotina é uma vitamina do complexo B com baixo peso molecular, que pode ser acoplada a uma proteína ou enzima covalente e que, por sua vez, também se ligará à Avidina.

O método do ABC, pois, baseia-se nas propriedades dessas duas substâncias, ou seja, que a avidina possui 4 pontos de ligação à biotina e que a maioria das proteínas e enzimas podem



ser conjugadas com muitas moléculas de biotina. Isto permite a formação de macromoléculas complexas entre a avidina e enzimas biotinizadas.

O método da avidina-biotina consiste de quatro fases distintas:

1<sup>ª</sup>) Na ligação do anticorpo primário com o antígeno existente no tecido;

2<sup>ª</sup>) Na ligação do anticorpo secundário biotinizado ao anticorpo primário. Este anticorpo secundário é uma anti-globulina produzida contra o mesmo tipo de animal no qual foi produzido o anticorpo primário, e posteriormente acoplado a uma molécula de biotina;

3<sup>ª</sup>) Na ligação do complexo avidina-biotina peroxidase com o anticorpo secundário biotinizado. Isto é possível devido à presença de uma peroxidase biotinizada, que forma junto com a avidina um complexo, que se liga à biotina encontrada no tecido.

4<sup>ª</sup>) Na ligação do substrato DAB com a peroxidase, para permitir a visualização dos locais no tecido onde existe o antígeno.

Também pelo método do ABC, deve-se bloquear previamente a peroxidase endógena existente nos tecidos para diminuir a reação inespecífica. Para isto basta incubar os cortes previamente com uma mistura de metanol e peróxido de hidrogênio.

Os passos seguidos para a realização da técnica da avidina-biotina foram os seguintes:

1º) desparafinaram-se os cortes, previamente identificados com o número do caso e a sigla do anticorpo primário a ser utilizado. Fez-se um contorno com nanquim ao redor do corte de tecido na face oposta da lâmina (para não alterar o material), a fim de facilitar a visualização do tecido durante a realização da técnica imuno-histoquímica;

2º) as lâminas foram deixadas em água destilada durante 5 minutos;

3º) as lâminas foram colocadas em uma solução de metanol e peróxido de hidrogênio durante 30 minutos. Para cada 200 ml de metanol, acrescentaram-se 3 ml de peróxido de hidrogênio;

4º) as lâminas foram lavadas em solução de PBS, pH 7,6, durante 20 minutos;

5º) as lâminas foram incubadas em soro normal de cabra ou coelho (conforme o anticorpo primário utilizado) em uma câmara úmida, à temperatura ambiente, durante 20 minutos;

6º) as lâminas foram escorridas, sem lavar;

7º) colocou-se sobre as lâminas uma gota de anticorpo primário, deixando em geladeira a 4°C, durante 14 a 16 horas (pernoite);

8º) as lâminas foram colocadas em uma solução de PBS, pH 7,6, durante 10 minutos;

9º) os cortes foram incubados com o anticorpo secundário durante 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara úmida;

10º) as lâminas foram lavadas em solução de PBS, pH 7,6, durante 10 minutos;

11º) os cortes foram incubados com avidina-biotina (ABC), preparada 30 minutos antes do uso, durante 60 minutos, em câmara úmida, e à temperatura ambiente;

12º) as lâminas foram lavadas em solução de PBS, pH 7,6, durante 10 minutos;

13º) os cortes foram incubados com DAB, por 5 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente;

14º) as lâminas foram lavadas em água destilada durante 5 minutos;

15º) os cortes foram corados com hematoxilina durante 5 minutos;

16º) as lâminas foram colocadas em água corrente, desidratadas e montadas em bálsamo.

### 3.3.2 - Controle da especificidade dos anti-soros

#### A) Inibição da peroxidase endógena

As células hepáticas normais ou as células tumorais de um carcinoma hepatocelular não demonstram atividade de peroxidase endógena, entretanto os eritrócitos presentes nas neoplasias hepáticas por hemorragia do tumor ou pós-biopsia hepática podem apresentar uma certa atividade da peroxidase endógena, que deve ser bloqueada, previamente à realização do método do ABC, para evitar resultados falso-positivos.

#### B) Controles positivos

Os controles positivos foram obtidos a partir de cortes parafinados de fígado humano contendo o antígeno de superfície do

vírus B da hepatite (HBsAg) (Dako Corporation, Santa Barbara, CA. - cod. nº T 1.110) e o antígeno do core do vírus B da hepatite (HBcAg) (Dako Corporation, Santa Barbara, CA. - cod. nº T 1.230). (Anexo B - lâminas 1 e 2 respectivamente).

### C) Controles negativos

Os mesmos cortes parafinados de fígado humano usados como controle positivo serviram também de controle negativo. Esses cortes eram submetidos a mesma técnica imuno-histoquímica que a realizada nas demais lâminas, com a diferença que o anticorpo primário de cabra (aHBsAg) era substituído por soro normal de coelho e o anticorpo primário de coelho (aHBcAg) era substituído por soro normal de cabra.

Além deste controle negativo, também apresentaram a mesma função todos aqueles casos que, investigados simultaneamente, não demonstraram imuno-reação positiva.

### 3.3.3 - Análise dos dados imuno-histoquímicos

Os cortes, corados pelo método imuno-histoquímico foram examinados em microscópio óptico convencional e a leitura das lâminas foi realizada da seguinte forma:

- todos os casos foram examinados em conjunto quanto a cada antígeno, permitindo um parâmetro quanto à intensidade de coloração;

- cada conjunto de lâminas coradas no mesmo momento foi observado conjuntamente com seu controle negativo e positivo.

#### 3.3.4 - Análise dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais

A análise epidemiológica, clínica e laboratorial dos pacientes foi realizada a partir da revisão dos prontuários de internação, de acordo com um protocolo pré-estabelecido, cujo modelo está no Anexo A. Isto só foi feito após a realização da técnica imuno-histoquímica e leitura das lâminas, para evitar-se a influência da história clínica na observação microscópica dos casos.

Foram pesquisados e correlacionados entre si os seguintes aspectos.

##### A) Aspectos epidemiológicos

Especificou-se a idade, sexo e cor dos pacientes.

## B) Aspectos clínicos

Pesquisou-se o quadro clínico (data de início e duração dos sinais e sintomas), os fatores de risco associados (álcool, fumo e cirrose) e o modo de evolução clínica dos pacientes (alta hospitalar ou óbito) durante a internação.

## C) Aspectos laboratoriais

Analisou-se os valores encontrados nas provas laboratoriais hepáticas dos pacientes, compreendendo a bilirrubina total (BT) e direta imediata (BDI), transaminases glutâmico-pirúvica (TGP) e glutâmico-oxalacética (TGO) e fosfatase alcalina (FA). Foram considerados apenas os primeiros resultados obtidos a partir da internação. Em nenhum dos casos foi possível obter-se informações relacionadas à presença de qualquer dos marcadores séricos de infecção pelo VBH.

### 3.3.5 - Análise dos aspectos histológicos

Os critérios utilizados para o diagnóstico de CHP nas biopsias hepáticas revisadas foram descritos previamente por Anthony (14) e Schever (295). O achado considerado característico foi o de fragmentos com preservação do aspecto trabecular do fígado; porém com disposição irregular e espessura de várias células, que se apresentam com atipias nucleares e

aumento da atividade mitótica. O estroma é raro (Anexo B - lâminas 5 e 6).

### 3.3.6 - Análise estatística

A análise estatística foi feita, nas comparações referentes às variáveis quantitativas, pelo teste "t" de Student e, nas comparações entre proporções, pelo teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 0,05.



4 - RESULTADOS

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Aspectos epidemiológicos do CHP

A frequência de CHP no material estudado através da técnica da imunoperoxidase (método ABC) foi de 11 casos de CHP em 1000 biopsias consecutivas (1,1%). Deste total, 8 casos pertenciam ao sexo masculino (73%) e 3 ao sexo feminino (27%). O paciente mais jovem tinha 36 anos e o mais velho 69 anos. A média de idade dos pacientes foi de 50,2 anos. Nove pacientes eram de cor branca (82%), um de cor preta (9%) e um mulato (9%).

### 4.2 - Aspectos clínicos do CHP

#### 4.2.1 - Quadro clínico

Os pacientes foram subdivididos conforme os sinais e sintomas apresentados no momento da internação, em:

- pacientes com quadro clínico sugestivo de neoplasia intra-abdominal (massa palpável em abdome superior, com ou sem icterícia): 7 casos (64%);

- pacientes com quadro clínico sugestivo de cirrose (icterícia, ascite, esplenomegalia e aranhas vasculares, sem massa palpável): 4 casos (36%).

Os sinais e sintomas mais frequentemente encontrados nos pacientes estudados estão especificados na tabela 4.1.

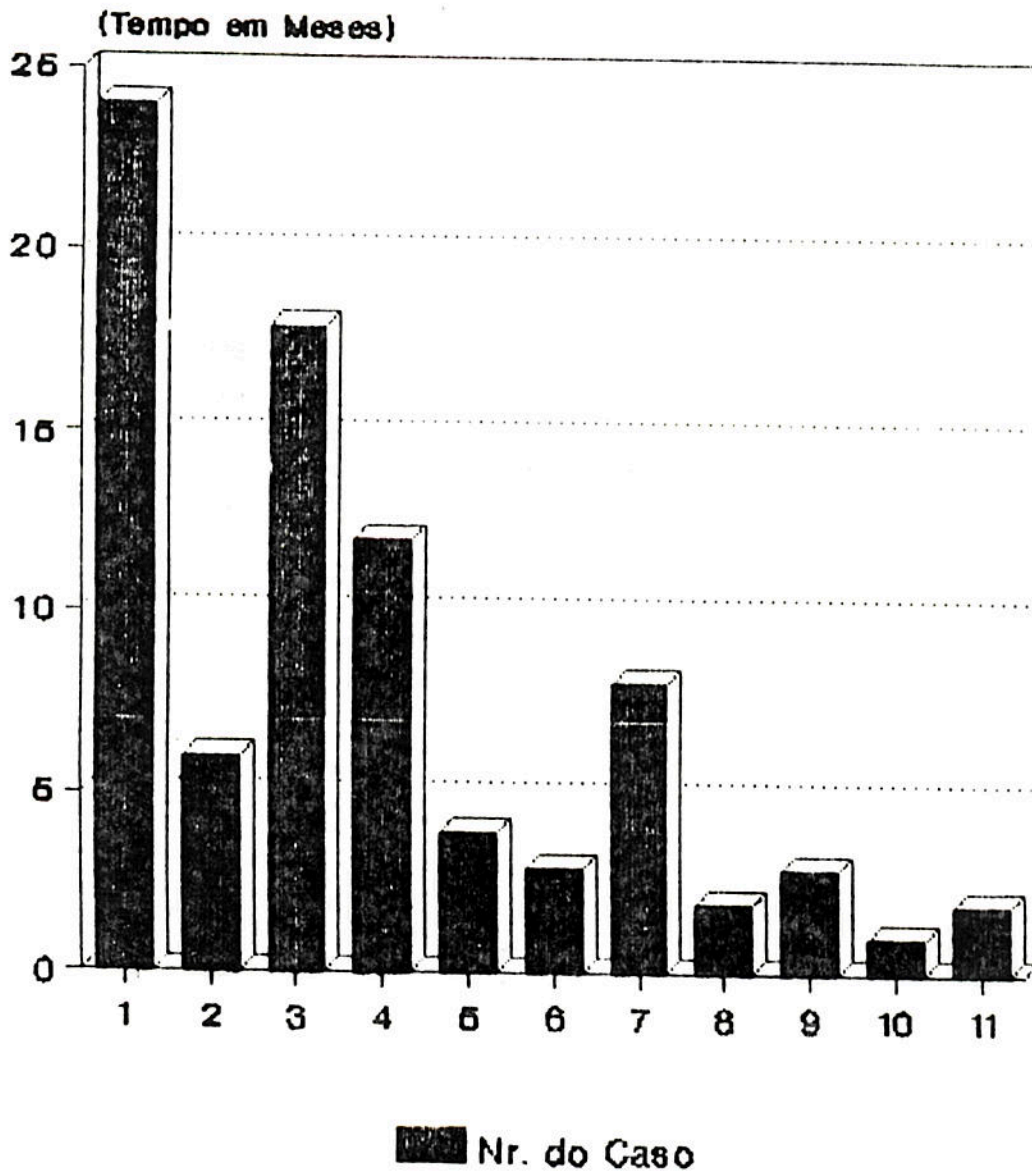
O intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico variou entre um e 24 meses, com uma média de 7,5 meses na presente série (figura 4.1).

**TABELA 4.1**  
SINAIS E SINTOMAS MAIS FREQUENTES NOS PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR

NUMERO DO CASO	DOR ABDOMINAL	ANOREXIA E EMAGRECIMENTO	ICTERICIA E ASCITE	MASSA PALPAVEL	ABANHAS VASCULARES	ESPIENO-MEGALIA	FEBRE
01	+	+	-	+	-	-	-
02	-	+	+	+	-	-	-
03	+	+	+	+	+	-	+
04	+	+	-	+	-	-	-
05	+	-	+	+	-	-	+
06	+	+	+	-	+	+	+
07	+	+	+	+	+	-	-
08	+	-	+	-	+	+	-
09	+	+	+	-	+	+	-
10	+	+	+	-	+	+	-
11	+	+	+	+	+	-	+
n (%)	10 (91)	9 (81)	9 (81)	7 (64)	7 (64)	4 (36)	4 (36)

+ = PRESENTE; - = AUS

**FIGURA 4.1**  
**INTERVALO ENTRE O INICIO DOS SINTOMAS E**  
**O DIAGNOSTICO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR**



#### 4.2.2 - Fatores de risco

##### A) Álcool

Os pacientes foram subdivididos quanto ao hábito de ingestão de bebidas alcóolicas em:

- pacientes alcoolistas, com ingestão superior a 80g de etanol/dia, em média, por mais de 5 anos consecutivos: 6 casos (55%);

- pacientes não-alcoolistas, com ingestão inferior a 25 g de etanol/dia, em média, ou com história negativa para qualquer tipo de ingestão alcóolica prévia: 5 casos (45%).

A caracterização dos pacientes alcoolistas quanto à frequência, duração, volume e tipo de bebida preferencialmente ingerida está resumida na tabela 4.2.

TABELA 4.2

CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES ALCOOLISTAS COM CARCINOMA  
HEPATOCELULAR QUANTO À FREQUÊNCIA, DURAÇÃO, VOLUME E TIPO DE  
BEBIDA PREFERENCIALMENTE INGERIDA

número do caso	frequência de uso	duração (anos)	volume (g de etanol/dia)	tipo de bebida
02	diária	20	440	cachaça*
07	diária	32	220	cachaça
08	diária	20	330	cachaça
09	diária	08	440	cachaça
10	diária	25	110	cachaça
11	diária	10	110	cachaça
Média	-	19,2	275,0	-

\* 1 garrafa de cachaça = 660ml = 220g de etanol

#### B) Fumo

Os pacientes foram subdivididos quanto ao hábito de fumar em:

- pacientes fumantes, com mais de 10 cigarros/dia, em média, por mais de 10 anos consecutivos: 8 casos (73%);

- pacientes não-fumantes, com uso inferior a 5 cigarros/dia, em média, de maneira ocasional, ou, ainda, história negativa para o uso de fumo: 3 casos (27%).

A caracterização dos pacientes tabagistas quanto à frequência, duração, quantidade e tipo de fumo preferencialmente usado está resumida na tabela 4.3.

TABELA 4.3

CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES TABAGISTAS COM CARCINOMA HEPATOCELULAR QUANTO À FREQUÊNCIA, DURAÇÃO, QUANTIDADE E TIPO DE FUMO PREFERENCIALMENTE USADO

número do caso	frequência de uso	duração (anos)	quantidade (nº cig./dia)	tipo de fumo
01	diária	20	20	cigarro
02	diária	50	10	palheiro
03	diária	12	12	palheiro
07	diária	49	10	palheiro
08	diária	20	60	cigarro
09	diária	10	20	cigarro
10	diária	25	40	cigarro
11	diária	20	20	cigarro
Média	-	25,75	24,0	-

C) Cirrose

Os pacientes foram subdivididos quanto à presença de cirrose associada ao carcinoma hepatocelular na biopsia hepática em:



- pacientes com evidência de cirrose pela presença de fibrose e nódulos de regeneração (Anexo B - lâmina 7): 5 casos (45%);

- pacientes sem evidência de cirrose: 6 casos (55%).

A distribuição dos pacientes com CHP de acordo com a presença ou ausência de cirrose na biopsia hepática está descrita na tabela 4.4.

TABELA 4.4

DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR DE ACORDO COM A PRESENÇA DE CIRROSE NA BIÓPSIA HEPÁTICA

cirrose	número dos casos	n	(%)
presente	6, 7, 8, 10, 11	5	(45)
ausente	1, 2, 3, 4, 5, 9	6	(55)
Total	-	11	(100)

#### 4.2.3 - Evolução clínica

Os pacientes foram subdivididos quanto ao tipo de evolução clínica na internação em:

- pacientes com alta hospitalar: 9 casos (82%);

- pacientes com óbito durante a internação: 2 casos (18%).

A distribuição dos pacientes segundo a evolução clínica está especificada na tabela 4.5.

TABELA 4.5

DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR DE ACORDO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA NA INTERNAÇÃO

tipo de evolução	número dos casos	n	(%)
alta hospitalar	1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11	9	(82)
óbito	2, 8	2	(18)
Total	-	11	(100)

#### 4.3 - Aspectos laboratoriais do CHP

Os resultados dos exames laboratoriais registrados nos prontuários dos pacientes com carcinoma hepatocelular estão representados na tabela 4.6.

##### 4.3.1 - Bilirrubinas

De acordo com os valores obtidos na análise da bilirrubina total (BT), os pacientes foram subdivididos em:

- pacientes com hiperbilirrubinemia, quando a BT era superior a 1,4 mg/dl: 8 casos (73%);

- pacientes sem hiperbilirrubinemia, quando a BT era inferior a 1,4 mg/dl: 2 casos (18%).

Em um paciente não havia o registro da BT no prontuário. Em todos os pacientes com hiperbilirrubinemia a fração direto-imediata era o componente principal.

#### 4.3.2 - Transaminases

De acordo com os valores obtidos na análise das transaminases (TGO e TGP), os pacientes foram também subdivididos em:

- pacientes com TGO maior que a TGP, ou seja, com índice TGO/TGP superior a 1: 7 casos (64%);

- pacientes com TGP maior que a TGO, ou seja, com índice TGO/TGP inferior a 1: 4 casos (36%).

#### 4.3.3 - Fosfatase alcalina

De acordo com os valores obtidos na análise da fosfatase alcalina (FA), os pacientes foram ainda subdivididos em:

- pacientes com perfil colestático, quando a FA era superior a 300 UI/l (normal até 92 UI/l): 5 casos (45%);

- pacientes com perfil não colestático, quando a FA era inferior a 300 UI/l: 5 casos (45%).

Em um paciente não havia o registro da dosagem da FA no prontuário.

TABELA 4.6

RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS REALIZADOS EM PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR

EX. LABORATORIAL * (VALORES NORMAIS)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	MEDIA
B.T. (ATE 1,4 mg/dl)	0,55	7,2	-	1,04	14	3,83	2,82	1,5	11,5	1,47	1,5	4,5
B.D.I. (ATE 0,5 mg/dl)	0,27	4,7	-	0,48	11	2,48	1,58	0,8	9,8	0,84	0,8	3,3
T.G.O. (ATE 36 U/L)	20	86	58	48	85	47	125	105	285	118	75	94,9
T.G.P. (ATE 40 U/L)	23	95	28	36	95	28	36	39	195	126	78	69,4
INDICE TGO/TGP	0,87	0,91	2,9	1,33	0,89	1,68	3,47	2,69	1,46	0,87	1,87	1,4
F.A. (ATE 91 U/L)	64	320	-	83	490	155	104	156	544	635	304	285,5

\* BT = BILIRRUBINA TOTAL

BDI = BILIRRUBINA DIRETA IMEDIATA

TGO = TRANSAMINASE GLUTAMICO OXALECETICA

TGP = TRANSAMINASE GLUTAMICO PIRUVICA

FA = FOSFATASE ALCALINA

#### 4.4 - Aspectos imuno-histoquímicos do CHP

A reação imuno-histoquímica nos permitiu agrupar os carcinomas hepatocelulares em imuno-reatores positivos e imuno-reatores negativos. Os pacientes que não demonstraram nenhuma reação positiva aos dois antisoros pesquisados (aHBsAg e/ou aHBcAg) foram chamados de imuno-reatores negativos e totalizaram 4 casos (36%). Aqueles que tiveram reação imuno-histoquímica positiva a pelo menos um dos anti-soros estudados foram denominados de imuno-reatores positivos e somaram 7 casos (64%).

Os carcinomas hepatocelulares com imuno-histoquímica positiva para o anti-soro aHBsAg apresentaram os hepatócitos corados apenas no citoplasma, enquanto aqueles positivos para o aHBcAg apresentaram em geral coloração no núcleo e no citoplasma dos hepatócitos.

A coloração positiva era finamente granular e castanho-escura, contrastando com o fundo pálido. Nos 7 casos positivos, haviam áreas com grande número de células positivas, contrastando com áreas na mesma secção com raras células isoladas positivas. A distribuição do antígeno foi semelhante nas células neoplásicas e nas não-neoplásicas

Os 7 pacientes imuno-reatores positivos foram subdivididos conforme o resultado da reação imuno-histoquímica em dois grupos:

- pacientes com imuno-reação positiva ao aHBcAg (Anexo B - lâmina 4): 5 casos (71%);

- pacientes com imuno-reação positiva ao aHBsAg (Anexo B - lâmina 3): 2 casos (29%).

A distribuição dos carcinomas hepatocelulares segundo o resultado da reação imunohistoquímica acha-se resumida na tabela 4.7.

TABELA 4.7

DISTRIBUIÇÃO DOS CARCINOMAS HEPATOCELULARES DE ACORDO COM O RESULTADO DA REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

anti-soro positivo	número do caso	n	(%)
aHBcAg	4, 5, 6, 7, 10	5	(45)
aHBsAg	2, 8	2	(18)
nenhum	1, 3, 9, 11	4	(37)
Total	-	11	(100)

4.5 - Correlação entre os diversos aspectos do CHP e a presença do VBH

#### 4.5.1 - Aspectos epidemiológicos

Entre os 11 casos de CHP estudados foram encontrados 7 casos (63%) que apresentaram imuno-reação positiva a pelo menos um dos dois anti-soros pesquisados (aHBsAg e aHBcAg). Desses pacientes, 4 eram homens (57%) e 3 eram mulheres (43%). As idades oscilaram de 39 a 69 anos, com média de 53,6 anos e mediana de 55 anos. Seis pacientes eram de cor branca (86%) e 1 paciente era de cor preta (14%).

Entre os 4 casos de carcinomas hepatocelulares que apresentaram imuno-reação negativa a qualquer dos dois anti-soros estudados (aHBsAg e aHBcAg), todos os pacientes eram do sexo masculino. As idades oscilaram de 36 a 53 anos, com média de 44,3 anos e mediana de 44. Três pacientes eram de cor branca (75%) e 1 um paciente era de cor mista (25%).

Os dados referentes à distribuição dos pacientes com CHP imuno-reatores positivos e negativos quanto aos aspectos epidemiológicos (sexo, idade e cor) acham-se resumidos na tabela 4.8.

A análise estatística não demonstrou significância entre as variáveis comparadas ( $p > 0,05$ ).



TABELA 4.8

DADOS REFERENTES AO SEXO, IDADE E COR DOS PACIENTES COM CHP  
IMUNO-REACTORES POSITIVOS (7 CASOS) E NEGATIVOS (4 CASOS)

	imuno-reatores positivos (n=7)	imuno-reatores negativos (n=4)	teste estatístico
<b>SEXO</b>			
masculino (m)	4 (57%)	4 (100%)	**
feminino (f)	3 (43%)	-	NS
relação m/f	1,3:1	-	
<b>idade (anos)</b>			
variação	36 a 69	36 a 53	***
média	53,6	44,3	NS
mediana	55	44	
<b>COR</b>			
brancos (b)	6 (86%)	3 (75%)	**
ñ-brancos (nb)*	1 (14%)	1 (25%)	NS
relação b/nb	6:1	3:1	

\* ñ-brancos = negros e mulatos

\*\* Exato de Fisher (NS = não-significativo)

\*\*\* "t" de Student (NS = não-significativo)

#### 4.5.2 - Aspectos clínicos

Dos 7 pacientes imuno-reatores positivos, quanto ao quadro clínico, 4 (57%) apresentaram sinais e sintomas sugestivos de neoplasia intra-abdominal (massa palpável em abdome superior) enquanto que 3 (43%) pacientes apresentaram quadro sugestivo de cirrose (icterícia, ascite, esplenomegalia e aranhas vasculares).

O intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico variou de 2 a 12 meses, com média de 5,1 e mediana de 4 meses. Os fatores de risco encontrados neste grupo foram: alcoolismo, tabagismo e cirrose em 4 casos (57%). Quanto à evolução clínica, 5 pacientes (71%) apresentaram alta e 2 pacientes (29%) foram ao óbito durante a internação hospitalar.

Dos pacientes imuno-reatores negativos, quanto ao quadro clínico, 3 (75%) apresentaram sinais e sintomas sugestivos de neoplasia intra-abdominal (massa palpável em abdome superior), enquanto um único paciente (25%) apresentou quadro sugestivo de cirrose (icterícia, ascite, esplenomegalia e aranhas vasculares). O intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico variou de 2 a 24 meses, com média de 11,8 e mediana de 10,5 meses. Os fatores de risco encontrados neste grupo foram: alcoolismo em 2 casos (50%), tabagismo em todos os casos e cirrose em um único caso (25%). Quanto à evolução clínica, todos os pacientes apresentaram alta hospitalar.

Os dados referentes à distribuição dos pacientes com CHP imuno-reatores positivos e negativos quanto aos aspectos clínicos (quadro clínico, duração dos sintomas, fatores de risco e evolução clínica) acham-se resumidos na tabela 4.9.

TABELA 4.9

DADOS REFERENTES AO QUADRO CLÍNICO, DURAÇÃO DOS SINTOMAS, FATORES DE RISCO E EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM CHP IMUNO-REACTORES POSITIVOS (7 CASOS) E NEGATIVOS (4 CASOS)

	imuno-reatores positivos (n=7)	imuno-reatores negativos (n=4)	teste estatístico
<u>quadro clínico</u>			
sugestivo de neoplasia*	4 (58%)	3 (75%)	**
sugestivo de cirrose****	3 (42%)	1 (25%)	NS
<u>duração dos sintomas (meses)</u>			
variação	2 a 12	2 a 24	***
média	5,1	11,8	NS
mediana	4	10,5	
<u>fatores de risco</u>			
alcoolismo	4 (57%)	2 (50%)	**
tabagismo	4 (57%)	4 (100%)	NS
cirrose	4 (57%)	1 (25%)	
<u>evolução clínica</u>			
alta hospitalar	5 (71%)	4 (100%)	**
óbito na internação	2 (29%)	-	NS

\* neoplasia: massa palpável em abdome superior

\*\* Exato de Fisher (NS = não significativo)

\*\*\* "t" de Student (NS = não significativo)

\*\*\*\* cirrose: icterícia, ascite, esplenomegalia e aranhas vasculares

#### 4.5.3 - Aspectos laboratoriais

Em relação à análise das provas de função hepática dos 7 pacientes imuno-reatores positivos, verificou-se

hiperbilirrubinemia em 6 casos (86%); índice TGO/TGP superior a 1 em 4 casos (57%) e perfil colestático em 3 casos (43%).

Em relação à análise das provas de função hepática dos 4 pacientes imunoreatores negativos, verificou-se hiperbilirrubinemia em 2 casos (50%), sendo que em um caso não havia o registro da dosagem de bilirrubina no prontuário; índice TGO/TGP superior a 1 em 3 casos (75%) e perfil colestático em 2 casos (50%), sendo que em um caso não havia o registro da dosagem de fosfatase alcalina no prontuário.

Os dados referentes à distribuição dos pacientes com CHP imuno-reatores positivos e negativos quanto aos aspectos laboratoriais (bilirrubinas transaminases e fosfatase alcalina) acham-se resumidos na tabela 4.10.

A análise estatística não demonstrou significância entre as variáveis comparadas ( $p > 0,05$ ).

TABELA 4.10

DADOS REFERENTES ÀS PROVAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA (BILIRRUBINAS, TRANSAMÍNASES E FOSFÁTASE ALCALINA) DOS PACIENTES COM CHP IMUNO-REACTORES POSITIVOS (7 CASOS) E NEGATIVOS (4 CASOS)

	imuno-reactores posit. (n=7)	imuno-reactores negat. (n=4)	teste estatístico
<u>Bilirrubinas totais</u>			
normais (até 1,4mg/dl)	1 (14%)	1 (25%)	***
elevadas (>1,4mg/dl)	6 (86%)	2 (50%)	NS
ñ disponíveis	-	1 (25%)	
variação média	1,04 a 14 4,6	0,55 a 11,5 4,5	
<u>IGQ*</u>			
normais (até 36 UI/l)	-	1 (25%)	
elevadas (>36 UI/l)	7 (100%)	3 (75%)	NS
variação média	47 a 125 86,6	20 a 285 109,5	
<u>IGP**</u>			
normais (até 40 UI/l)	4 (57%)	2 (50%)	
elevadas (>40UI/l)	3 (43%)	2 (50%)	NS
variação média	28 a 126 65,1	20 a 195 77,0	
<u>índice IGQ/IGP</u>			
acima de 1,0	4 (57%)	3 (75%)	
abaixo de 1,0	3 (43%)	1 (25%)	NS
média	1,7	1,6	
<u>Fosfátase alcalina</u>			
normais (até 92 UI/l)	1 (14%)	1 (25%)	
elevadas (> 92UI/l)	6 (86%)	2 (50%)	
ñ-disponíveis	-	1 (25%)	NS
variação média	83 a 635 277,6	64 a 544 304,0	

\* TGO = transaminase glutâmico-oxalacética

\*\* TGP = transaminase glutâmico-plúvica

\*\*\* = teste "t" de Student (NS = não-significativo)

5 - D I S C U S S Ã O

## 5 - DISCUSSÃO

### 5.1 - Aspectos epidemiológicos do CHP

#### 5.1.1 - Frequência do CHP

Os dados existentes sobre a frequência do CHP nas diversas regiões do globo têm sido obtidos a partir de duas fontes principais: taxas de mortalidade e séries de necrópsias.

A taxa de mortalidade de uma doença expressa o número de pessoas em uma população que morrem dela (92). Devido ao fato do CHP ser letal em aproximadamente 100% dos casos, sua taxa de mortalidade deveria refletir a incidência real da doença. Ocorre que, em geral, os óbitos por CHP não são diferenciados dos óbitos por colangiocarcinoma (108, 166), sendo ambos inclusive codificados sob o mesmo número na classificação internacional das doenças (320). Além disto, as estatísticas de mortalidade não são publicadas na maioria dos países com alta incidência ou, quando o são, a qualidade dos dados é muito duvidosa (320).

Por outro lado, os estudos da incidência do CHP baseados em séries de necrópsias expressam sua ocorrência em relação ao total de necrópsias ou em relação ao total de tumores malignos diagnosticados.

Também estes dados podem não refletir a verdadeira incidência do CHP na região estudada, estando na dependência de vícios de seleção relacionados ao sexo, idade e tipos de doenças incluídos nas séries (92, 247, 320).

Apesar das limitações mencionadas, os dados existentes permitem que se façam algumas considerações sobre a distribuição do CHP no mundo.

#### A) Dados obtidos de taxas de mortalidade

A análise da incidência do CHP através das taxas de mortalidade é mais fidedigna para os países que possuem dados estatísticos de alta qualidade. Não obstante, é possível estimar-se a distribuição geográfica do CHP através das estatísticas disponíveis em certas regiões representativas dos diferentes continentes.

As regiões são classificadas em três grupos de acordo com a taxa de mortalidade por CHP (tabela 5.1): 1) regiões de alta incidência, com mortalidade superior a 7/100.000 homens/ano, compreendendo a maioria dos países do continente africano e



asiático, além de algumas áreas do Pacífico Sul (Nova Zelândia e Havai); 2) regiões de média incidência, com mortalidade entre 3 a 7/100.000 homens/ano, compreendendo a maioria dos países da Europa Oriental, assim como áreas do Oriente Médio (Israel) e Extremo Oriente (Tailândia) e 3) regiões de baixa incidência, com menos de 3/100.000 homens/ano, compreendendo a maioria dos países do continente americano, além da Europa Ocidental e Austrália (247, 297, 302, 320).

TABELA 5.1

TAXAS DE MORTALIDADE POR CHP NAS REGIÕES DE ALTA INCIDÊNCIA (>7/10<sup>5</sup> HOMENS/ANO) MÉDIA INCIDÊNCIA (3 A 7/10<sup>5</sup> HOMENS/ANO) E BAIXA INCIDÊNCIA (<3/10<sup>5</sup> HOMENS/ANO)\*

<u>alta incidência</u>		<u>média incidência</u>		<u>baixa incidência</u>	
local	taxa	local	taxa	local	taxa
Moçambique	103,8	Hungria	7,0	Chile	2,6
Rodésia	47,5	Tchecoslov.	6,2	Porto Rico	2,5
Hong Kong	38,9	Romênia	5,7	Suécia	2,5
Cingapura	33,5	Bélgica	5,7	Escócia	2,5
Áf. do Sul	28,4	Áustria	5,6	Jamaica	2,3
Senegal	24,5	Alemanha	5,1	Colômbia	2,0
China	17,0	Suíça	4,4	Noruega	2,0
Havai	15,2	Tailândia	4,1	E.U.A.	1,4
Japão	12,5	Israel	3,7	Austrália	1,4
Nigéria	11,2	Dinamarca	3,3	Inglaterra	1,4
N. Zelândia	7,8	finlândia	3,1	Canadá	1,0

\* Dados obtidos das referências 247, 297, 302, 320.

A análise das taxas de mortalidade por CHP resumidas na tabela 5.1 permite verificar-se que a incidência de CHP na

população masculina de Moçambique é cerca de 100 vezes superior aquela registrada no Canadá.

Quanto ao Brasil, são raras as estatísticas disponíveis baseadas em taxas de mortalidade por CHP. Calegari e col. (52), em trabalho de 1980, analisaram as populações rural e urbana de Londrina, Paraná, encontrando uma mortalidade por CHP da ordem de 3,8 e 1,3/100.000 habitantes/ano respectivamente, referentes ao período de 1976 a 1978.

Torloni & Bramini (335), em 1978, estabeleceram as taxas de mortalidade nas diferentes regiões brasileiras referentes ao ano de 1975. Os dados encontrados acham-se resumidos na tabela 5.2.

TABELA 5.2

TAXAS DE MORTALIDADE POR CHP NAS DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS NO ANO DE 1975 (POR 100.000 HABITANTES/ANO)\*

região	mortalidade
Sul	0,25
Sudeste	0,27
Nordeste	0,12
Norte	0,079
Centro-Oeste	0,05

\*Dados obtidos da referência 335.

Em relação à incidência do CHP nas cidades brasileiras, existem poucos trabalhos disponíveis. Mirra e col. (220)

encontraram em São Paulo uma incidência de 0,9 casos/100.000 homens/ano, em 1969. Estes dados contrastam com os relatados por Arruda (19), que encontrou em Recife 4,7 casos/100.000 homens/ano no período compreendido entre 1969 e 1971.

Essas publicações, embora escassas, indicam que o CHP é mais freqüente no Nordeste do país (262). O fato das taxas de mortalidade analisadas por região não permitirem a mesma conclusão pode estar relacionado à qualidade dos dados existentes.

#### B) Dados obtidos de séries de necrópsias

A freqüência de CHP estimada a partir de séries de necrópsias confirma, em grande parte, os dados obtidos a partir das taxas de mortalidade. Nas regiões de alta incidência como Hong Kong, a porcentagem de CHP em necrópsias chega a 6,8%, ou seja, cerca de 20 vezes superior aos locais de baixa incidência. Os dados compilados por diversos autores (84, 114, 124, 193, 198, 199, 202, 222, 226, 234, 238, 243, 247, 259, 263, 320, 354) acham-se resumidos na tabela 5.3.

TABELA 5.3

PROPORÇÃO DO CHP EM NECRÓPSIAS NOS VÁRIOS PAÍSES, EM ORDEM DE FREQUÊNCIA\*

país	n <sup>o</sup> total de necrópsias	n <sup>o</sup> total de casos de CHP	%
Hong Kong	1.480	100	6,8
Nigéria	n.d.**	n.d.	5,8
África do Sul	n.d.	n.d.	4,0
Japão	500.237	18.157	3,6
Tailândia	12.265	297	2,4
França	2.540	42	1,7
Suécia	8.837	121	1,4
Itália	12.827	135	1,1
Escócia	6.586	41	0,6
Inglaterra	7.366	39	0,5
Suíça	23.470	93	0,4
E.U.A.	305.368	1.163	0,4
Índia	12.616	45	0,3
Dinamarca	14.881	50	0,3
Finlândia	15.545	45	0,3
Rússia	6.103	17	0,3
Paquistão	5.450	11	0,2

\* Dados obtidos das referências 84, 114, 124, 193, 198, 199, 202, 222, 226, 234, 238, 243, 247, 259, 263, 320, 354.

\*\* n.d. = não-disponível.

Lopez-Correla e col. (196) revisaram os dados referentes à frequência de CHP em necrópsias na América Latina (vide tabela 5.4). Os achados não diferem, em média, dos encontrados em locais de baixa incidência como a Europa Ocidental e os Estados Unidos.

TABELA 5.4

FREQUÊNCIA DE CHP EM NECRÓPSIAS EM PAÍSES DA AMÉRICA LATINA, POR ORDEM DE FREQUÊNCIA\*

país	n <sup>o</sup> total de necrópsias	n <sup>o</sup> de casos de CHP	%
Colômbia	1.827	27	1,48
Costa Rica	3.000	25	0,83
Guatemala	1.000	07	0,70
México	6.558	37	0,56
Argentina	10.193	55	0,54
Brasil	1.280	06	0,47
Perú	11.339	49	0,43
El Salvador	3.791	16	0,42
Chile	4.337	16	0,37
Panamá	8.756	26	0,30

\* Dados obtidos da referência 196

A frequência de CHP em necrópsia nas diferentes cidades brasileiras foi revisada por Pereira e col. (261) em 1977. Os dados obtidos acham-se resumidos na tabela 5.5, e confirmam a maior frequência de CHP nas cidades do Nordeste brasileiro, em relação ao Sudeste.

TABELA 5.5

FREQUÊNCIA DE CHP ENCONTRADO EM NECRÓPSIAS NAS DIFERENTES CIDADES BRASILEIRAS, EM ORDEM DE FREQUÊNCIA\*

cidade	região	% de CHP em necrópsia
Salvador	Nordeste	1,73
Recife	Nordeste	0,57
Rio de Janeiro	Sudeste	0,54
São Paulo	Sudeste	0,27
Belo-Horizonte	Sudeste	0,14

\* Dados obtidos da referência 261.

No presente trabalho foram revisadas 1000 biopsias hepáticas consecutivas no Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, referentes ao período de julho/81 a dezembro/88. Foram encontrados 11 casos de CHP, correspondendo a uma frequência de 1,1%. Este dado não pode ser comparado com aqueles obtidos em séries de necrópsias ou a partir das taxas de mortalidade, por serem provenientes de pacientes altamente selecionados, portadores de quadro clínico e/ou laboratorial de doença hepática, constituindo-se portanto em grupo de alto risco para o CHP. No entanto, este dado sugere que a frequência do CHP em nosso meio compara-se à descrita nas regiões de baixa incidência.

### 5.1.2 - Distribuição do CHP quanto ao sexo, idade e raça

#### A) Sexo

O CHP costuma acometer mais freqüentemente os homens. A relação masculino/feminino apresenta-se ao redor de 2 na maioria dos países de baixa e média incidência, sendo superior a 4 nas regiões de alta incidência, tais como Ásia e África (320).

A predominância do CHP em pacientes masculinos deve estar provavelmente relacionada a maior prevalência do estado de portador do HBsAg, a maior exposição aos fatores ambientais potencialmente carcinogênicos e a maior freqüência de doença hepática crônica e alcoolismo em relação às mulheres (231).

Na presente casuística, dos 11 pacientes portadores de CHP, 8 eram do sexo masculino, sendo a relação masculino/feminino da ordem de 2,7. Este dado é compatível com o relatado nos locais de baixa e média incidência.

#### B) Idade

Quanto à idade, o CHP apresenta uma distribuição peculiar. Nas áreas de alta incidência, ocorre mais freqüentemente em jovens, em geral na 2<sup>ª</sup> ou 3<sup>ª</sup> década de vida (106). Em Moçambique, por exemplo, a taxa de CHP em homens entre 25 e 34 anos é aproximadamente 500 vezes superior àquela encontrada na

população de mesma idade nos E.U.A. e Inglaterra, enquanto que no grupo com mais de 65 anos a incidência é apenas 15 vezes maior (84).

Por outro lado, nas áreas de média e baixa incidência, a frequência do CHP aumenta progressivamente com a idade, acometendo preferencialmente pacientes na 6<sup>m</sup> ou 7<sup>m</sup> décadas de vida (84).

Estas diferenças de idade encontradas nos pacientes com CHP estão provavelmente relacionadas à exposição precoce aos agentes carcinogênicos presentes nas áreas de alto risco, em especial à transmissão materno-fetal da infecção pelo VBH. O contágio na infância apresenta alta taxa de cronificação da doença hepática, progredindo para cirrose e CHP em poucos anos (308).

No presente estudo, a idade dos pacientes variou entre 36 e 69 anos, com média de 50,3 anos. Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos nas áreas de média ou baixa incidência.

### C) Raça

O CHP apresenta diferentes taxas de incidência em uma mesma área geográfica de acordo com a distribuição racial da população analisada (247, 297). Na África do Sul, os negros



apresentam uma incidência de CHP mais de 20 vezes superior aos brancos, enquanto que na Califórnia esta relação se aproxima de 4 vezes (77).

Este fato pode indicar que as variações encontradas na frequência do CHP nas diferentes regiões estejam mais relacionadas a fatores sócio-econômicos e culturais do que propriamente geográficos (297).

Os estudos sobre a incidência de neoplasias em populações migratórias têm sido importantes na geração de hipóteses etiológicas. Steiner (312), em 1960, observou que descendentes de europeus morando há vários anos em regiões de alto risco para CHP no continente africano mantinham a mesma frequência de CHP observada em europeus da Europa e E.U.A.

O modelo que ilustra bem as variações na incidência do CHP em imigrantes é o dos chineses-americanos. Szmunness (320) analisou a taxa de mortalidade por CHP em diferentes raças na cidade de Nova Iorque, entre 1971 e 1976. Os resultados mostraram que embora os chineses constituíssem menos de 1% da população da cidade, eram responsáveis por mais de 10% das mortes por CHP registradas naquele período. Segundo o autor, a alta mortalidade encontrada nos chineses-americanos parece estar diretamente relacionada à alta prevalência dos marcadores do VBH neste grupo. Um dado interessante é de que a taxa de portadores do VBH

apresenta níveis progressivamente menores nas gerações subseqüentes (320).

No Brasil, a distribuição racial do CHP varia de acordo com a região estudada. Gonçalves e Pereira (106) encontraram 70% de pacientes negros em sua série de 43 casos de CHP no Estado do Espírito Santo, contrastando com os 10% relatados por Pittela e col. (265) em 21 casos de CHP no Estado do Rio de Janeiro.

A distribuição racial dos 11 casos de CHP analisados no presente estudo foi de 9 pacientes brancos (82%), 1 negro (9%) e 1 mulato (9%), refletindo provavelmente a predominância da raça branca na região sul do país. Estes achados estão de acordo com os de Calegari e col. (52) que estudaram os 9 casos de CHP registrados em Londrina, Paraná, nos anos de 1976 a 1978 e encontraram 100% de pacientes da raça branca.

## 5.2 - Aspectos clínicos do CHP

### 5.2.1 - Quadro clínico do CHP

A apresentação clínica do CHP depende não apenas das características biológicas do tumor, mas também da presença ou não de doença hepática crônica associada (247).

#### A) Sintomas

Na maioria das séries os sintomas mais encontrados nos pacientes com CHP, em ordem de frequência, são a dor abdominal, plenitude epigástrica e massa no quadrante superior direito do abdome (10, 12, 245, 246, 249).

Okuda e o grupo japonês de estudos de CHP (243) apresentaram em 1980 sua experiência com 1896 casos de CHP diagnosticados no Japão. Segundo os autores, a ordem de frequência dos sintomas foi semelhante à descrita na literatura, porém, os casos sem cirrose associada possuíam uma incidência significativamente maior de massa no abdome superior.

Outro fator que influi no modo de apresentação clínica do CHP é a localização geográfica da população em estudo. Nas áreas de alta incidência os sintomas parecem ser mais frequentes e de maior severidade (84, 115). Nestes locais o quadro clínico predominante relaciona-se principalmente com a presença do tumor hepático, e apenas ocasionalmente é precedido das manifestações de hepatopatia crônica subjacente (106).

Thomas e col. (329), ao estudarem prospectivamente 28 casos de CHP na Rodésia, encontraram dor abdominal em 82% dos pacientes, seguida de plenitude e emagrecimento em 71,5%, fraqueza em 50%, anorexia em 43% e massa abdominal em 35,7%.

Estes achados estão de acordo com aqueles descritos em outros países de alta incidência no continente africano e asiático (10, 57, 174, 192, 245, 246, 249, 307).

Por outro lado, Al-Sarraf e col. (12), ao revisarem 65 casos de CHP diagnosticados nos E.U.A., encontraram dor abdominal em 62%, seguida de emagrecimento em 34%, astenia e plenitude em 30%, e anorexia em 19%. Estes achados refletem um quadro clínico mais brando do que aquele encontrado nas áreas de alta incidência, sendo semelhante ao descrito em outros trabalhos provenientes dos E.U.A. e Europa (21, 30, 37, 53, 65, 71, 86, 123, 124, 146, 173, 186, 193, 199, 221, 223, 230, 259, 299). Nos locais de baixa e média incidência a história clássica é de um paciente com manifestações clínicas de cirrose que inicia com dor abdominal intensa e descompensação progressiva (247).

No Brasil, uma análise de 43 casos de CHP diagnosticados no Estado do Espírito Santo (106), demonstrou os seguintes sintomas: emagrecimento (92,5%), dor abdominal (83,3%), anorexia (42,5%), icterícia (29,3%), adinamia (27,5%), plenitude (25,8%) e febre (11,7%). Embora sendo provenientes de uma área considerada de baixa incidência, apenas 3 dos 43 pacientes nesta série relataram quadro clínico de hepatopatia crônica prévia, fato semelhante ao observado nas áreas de alta incidência.

## B) Sinais

Os sinais clínicos mais freqüentes nos pacientes com CHP são a presença de hepatomegalia, em geral dolorosa, massa palpável no quadrante superior direito do abdome, ascite, icterícia e aranhas vasculares. Com menor freqüência são descritos esplenomegalia, pirexia, eritema palmar e ginecomastia. Muitos destes sinais estão na dependência de cirrose concomitante (297). A presença de atrito e sopro na área hepática são considerados os sinais mais específicos de neoplasia maligna do fígado, embora pouco freqüentes (304, 324).

Uma análise de 2411 casos de CHP diagnosticados no Japão (243) mostrou que os sinais mais comumente encontrados, em ordem de freqüência, foram: hepatomegalia (67,2%), ascite (43,6%), icterícia (30,6%) e esplenomegalia (14,4%). Estes achados não diferem daqueles descritos por Thomas e col. (329) na Rodésia e por Albert e col. (10) em Uganda.

Nos E.U.A. Al-Sarraf e col. (12) encontraram a seguinte distribuição dos sinais em 65 pacientes com CHP: hepatomegalia em 75% dos casos, seguida de ascite (30%), icterícia (16%), esplenomegalia (10%) e massa palpável no abdome (10%). É interessante notar que em 13% dos casos não havia nenhum sinal presente ao exame físico. Estes achados sugerem um quadro

clínico mais brando em relação aos países de alta incidência (68, 124, 230).

No Brasil, a série de 43 casos estudada no Espírito Santo (106) apresentou a seguinte frequência de sinais clínicos: hepatomegalia (97,5%), ascite (65%), icterícia (29,3%) e esplenomegalia (12%). De maneira semelhante ao ocorrido com relação aos sintomas, a distribuição dos sinais nestes pacientes correlaciona-se mais com aquela encontrada em países de alta incidência. As causas para este fato não são claras, porém podem estar relacionadas ao diagnóstico mais tardio do CHP no Brasil, motivados talvez pela sua pouca frequência e baixo índice de suspeita clínica.

No sentido de uniformizar os modos de apresentação clínica do CHP, Okuda e col. (252) sugeriram em 1976 uma classificação em nove tipos diferentes baseada nos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes com CHP no momento do diagnóstico (tabela 5.6).

TABELA 5.6  
CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DO CHP\*

tipo	descrição	ocorrência (%)
franco	dor, plenitude e massa abdominais	61,0%
cirrótico	ascite, insuficiência hepática, varizes de esôfago	21,1%
oculto	achado ocasional em cirurgias ou necrópsias	3,0%
febril	febre alta, dor abdominal, rápida evolução	3,0%
metastático	metastases produzem primeiros sintomas	3,0%
hepático	icterícia súbita, TGO e TGP elevadas	3,0%
abdomen agudo	dor abdominal súbita, reação peritoneal	2,2%
colestático	icterícia severa e progressiva	0,7%
outros	não classificados	3,0%

\* Dados obtidos da referência 252

Os sinais e sintomas dos 11 pacientes com CHP analisados na presente série foram os seguintes: dor abdominal em 91% dos casos, anorexia e emagrecimento (81%), icterícia (81%), ascite (81%), massa palpável no quadrante superior direito (64%), aranhas vasculares (64%), esplenomegalia (36%) e febre (36%).

A tentativa de separar os pacientes de acordo com o modo de apresentação clínica conforme a classificação sugerida por Okuda

e col. (252) e resumida na tabela 5.6 mostrou haver considerável superposição entre os diferentes grupos. Por exemplo, dos 11 pacientes 7 (64%) apresentaram massa palpável enquadrando-se no grupo denominado "franco" na classificação de Okuda. No entanto, 5 destes 7 pacientes apresentaram concomitantemente ascite e icterícia, podendo ser também enquadrados no grupo dos "cirróticos". Portanto, optou-se por dividir os pacientes em 2 grupos distintos com base na presença ou ausência de massa palpável no abdome superior. Desta maneira, obtivemos 64% dos casos com clínica sugestiva de neoplasia pela presença da massa e 36% dos casos com clínica sugestiva de cirrose pela ausência de massa e presença de icterícia, ascite, esplenomegalia e aranhas vasculares.

Esta divisão, embora empírica, assemelha-se à frequência encontrada por Okuda e col. (252) para os tipos de CHP "franco" e "cirrótico", ou seja, de 61,0% e 21,1% respectivamente.

Desta maneira, pode-se observar que o quadro clínico apresentado nesta série reflete aquele descrito na literatura proveniente dos locais de alta incidência, talvez pelas razões de diagnóstico tardio anteriormente citadas.

É interessante notar que nenhum dos 7 casos de CHP com massa palpável apresentou esplenomegalia associada, sendo esta restrita apenas aos 4 casos ditos "cirróticos". Não há explicação



aparente para este fato que, do nosso conhecimento, não foi previamente descrito.

### 5.2.2 - Fatores de risco associados ao CHP

Apesar das inúmeras evidências que apontam o VBH como principal agente etiológico do CHP, deve ser considerado que nem todos os casos desta neoplasia apresentam os antígenos virais, assim como nem todos os pacientes com a infecção viral desenvolvem o CHP. A explicação deste fato deve estar relacionada a uma provável origem multifatorial do CHP, envolvendo a participação de outros fatores de risco que agiriam como co-carcinógenos, possivelmente potencializando a ação do VBH ou, mais raramente, induzindo o crescimento tumoral individualmente (11, 48, 182, 184, 188, 197, 219, 311, 312, 313, 322, 349).

Além do VBH, os principais fatores de risco associados ao CHP são o alcoolismo (48), tabagismo (152) e cirrose (310). Em certas regiões da África têm sido implicado também o consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas (11, 184, 197).

A seguir serão analisados alguns dos fatores de risco encontrados em nossa casuística, relacionando-os com os dados encontrados na literatura.

## A) Álcool

O consumo de bebidas alcóolicas tem sido relacionado à carcinogênese em diversos locais do organismo. Lieber e col. (188) resumiram alguns dos mecanismos fisiopatológicos propostos para a ação do álcool no desenvolvimento de neoplasias, destacando-se entre eles os seguintes: 1) efeitos locais relacionados ao contato direto, principalmente ao nível do trato gastrointestinal superior (língua, hipofaringe, laringe e esôfago); 2) a presença de agentes carcinogênicos em algumas bebidas alcóolicas; 3) a indução das enzimas microsossomais causada pelo álcool, acelerando a formação de metabólitos tóxicos; 4) vários tipos de dano celular provocados pelo álcool, em particular nas mitocôndrias e retículo endoplasmático liso e 5) os distúrbios nutricionais freqüentemente encontrados em alcoolistas.

Além destes mecanismos, existem trabalhos mostrando que o alcoolismo crônico induz a um estado de baixa imunidade, tornando o indivíduo mais suscetível aos diferentes agentes agressores (188, 269). Este fato parece explicar a maior freqüência de marcadores da infecção pelo VBH e pacientes alcoolistas em relação aos controles (219). Da mesma maneira, Saibara e col. (286) mostraram a presença de linfócitos T-"Killer" deficientes em pacientes alcoolistas com CHP, salientando o papel das defesas imunitárias na proteção contra a carcinogênese.

Existem estudos mostrando que a frequência de ingestão alcoólica é maior em pacientes com CHP em relação aos controles (367). Alpert e col. (10) analisaram 42 pacientes ugandenses com CHP e encontraram uma história positiva de alcoolismo crônico em 23 casos (54,8%) contra apenas 12 de 38 controles (31,6%).

Existem dúvidas, no entanto, de que a associação do CHP ao alcoolismo não esteja relacionada diretamente ao álcool e sim à presença de cirrose induzida por este (322, 344).

Lieber e col. (188) procuraram estudar a frequência de alcoolismo em pacientes com CHP sem cirrose associada. Para tal, revisaram 48 pacientes com CHP internados consecutivamente em dois hospitais gerais da cidade de Nova Iorque, no período compreendido entre 1947 e 1979. Quinze casos (31%) não possuíam cirrose associada, dos quais 7 eram alcoolistas e não apresentavam positividade para os marcadores do VBH. Os autores consideraram este achado como uma possível evidência do papel do álcool como agente carcinogênico isolado.

Estudos histopatológicos do CHP também parecem confirmar a ação do álcool na origem do CHP. Norkin & Campagna-Pinto (233) descreveram a presença do corpúsculo hialino de Mallory em 23 de 81 casos de CHP diagnosticados nos E.U.A. Esta inclusão eosinofílica do citoplasma hepatocitário é considerada característica, embora não patognomônica das lesões hepáticas

induzidas pelo álcool (14). Nakanuma & Ohta (225), em estudo recente, encontraram o corpúsculo de Mallory em 75% de seus 28 casos de CHP diagnosticados no Japão, postulando um possível papel desta estrutura na proliferação das células tumorais, por estar envolvida com os microtúbulos da célula hepática.

Na presente série, a prevalência de alcoolismo nos 11 pacientes com CHP foi de 6 casos (55%). Destes, 4 apresentaram cirrose diagnosticada histologicamente (micronodular em 75% dos casos). Em nenhum dos casos demonstrou-se a presença do corpúsculo de Mallory associado. A alta frequência da combinação de vários fatores de risco em um mesmo paciente dificultam a avaliação do papel de um deles isoladamente na gênese do CHP.

#### B) Fumo

O hábito de fumar tem sido incriminado como fator de risco em pacientes com CHP (152, 177, 337). No Japão (17) e E.U.A. (367) foi demonstrada uma relação positiva entre o tabagismo pesado (acima de 20 cigarros/dia) e o desenvolvimento de CHP. Em ambos os estudos os pacientes foram controlados para evitar os vícios de confusão originados pela maior incidência de alcoolismo entre os fumantes.

Ken e col. (152) avaliaram 240 pacientes com CHP na África do Sul quanto ao hábito de fumar, encontrando uma maior

incidência de tabagismo em um sub-grupo de pacientes com idade acima de 50 anos.

No presente estudo, dos 11 casos de CHP 8 (73%) eram fumantes crônicos. Destes, apenas 2 (19%) não apresentavam nenhum outro fator de risco associado, dificultando assim sua apreciação como agente neoplásico isolado no CHP.

### C) Cirrose

Cirrose e CHP em geral coexistem no mesmo fígado. Apesar da marcada variação na distribuição geográfica do CHP, esta associação é observada em todos os países e raças estudados (14).

O tipo de cirrose mais frequentemente associado ao CHP é o macronodular (243, 302). Este tipo de cirrose tem por etiologia, via de regra, a infecção prévia pelos vírus B e não-A, não-B, embora possa ser encontrada em pacientes alcoolistas após períodos de abstinência (15, 96, 182) entre outras causas (38, 315).

Vários autores têm sugerido que pacientes com cirrose alcóolica raramente desenvolvem CHP enquanto estão ingerindo grandes quantidades de etanol, mas apresentam alta incidência quando param de beber por algum tempo (84, 243, 247). Lee (182), em Londres, mostrou que de 29 pacientes com cirrose alcóolica em

abstinência 16 (55%) apresentaram CHP, enquanto que de 55 pacientes com cirrose alcóolica que continuaram bebendo apenas 9 (16,4%) apresentaram o tumor hepático.

Estudos anátomo-patológicos têm demonstrado que o padrão histológico da cirrose alcóolica altera-se progressivamente após a parada da ingestão de álcool, passando de micro para macronodular (15, 96, 247). Este achado sugere um aumento na atividade regenerativa dos hepatócitos na ausência dos efeitos do etanol, promovendo o surgimento de hiperplasia nodular, aumento das células, pleomorfismo nuclear e multinucleação celular, considerados como alterações pré-malignas (33, 64, 302, 340, 344).

Com efeito, Queiróz e col. (275) encontraram displasia hepatocitária em 84,2% dos pacientes com cirrose e CHP, contra apenas 44,2% dos casos sem CHP. A tendência atual da literatura é considerar a cirrose, independente de sua etiologia e com ou sem displasia associada, como lesão com potencial de evolução à neoplasia (204, 239, 283, 302, 347).

Nas regiões de alta incidência do CHP a maioria dos casos parece apresentar cirrose associada. Estudos realizados em vários países do continente africano e asiático mostram que isto ocorre em aproximadamente 75% dos casos (10, 13, 64, 192, 222, 250, 298, 312, 313). Thomas e col. (329) encontraram resultados

conflitantes ao analisarem 23 pacientes com CHP na Rodésia, encontrando cirrose em apenas 39,1% dos casos.

Nas regiões de baixa e média incidência a associação de cirrose e CHP parece ser um pouco menos freqüente. Por exemplo, nos E.U.A., um total de 1452 casos de CHP foram avaliados por vários autores em diferentes centros, sendo descrita uma freqüência de cirrose que variou entre 21,8% e 100% dos casos, com média de 65,3% (30, 31, 37, 53, 65, 71, 85, 86, 114, 146, 200, 230, 352, 354). Esta freqüência é semelhante à descrita em 242 casos de CHP diagnosticados em 3 países europeus, a qual foi, em média, de 66,5% (153, 202, 238). Na América Latina, Lopez-Corella e col. (196) encontraram 66,6% de cirrose em 30 casos de CHP diagnosticados no México, enquanto que no Brasil, apesar do pequeno número de pacientes analisados, pode-se observar um declínio na freqüência de cirrose associada ao CHP na medida em que se aproxima da região sul do país (vide tabela 5.7).

TABELA 5.7

## FREQUÊNCIA DE CIRROSE ASSOCIADA AO CHP EM CIDADES BRASILEIRAS

cidade (referência)	região	nº de CHP	nº de cirrose	%
Salvador (275)	Nordeste	35	23	64,3
Vitória (262)	Sudeste	46	28	60,9
Rio de Janeiro (265)	Sudeste	21	05	23,8
Londrina (52)	Sul	09	02	22,2
total		111	58	52,3

A média da incidência de cirrose nos casos de CHP encontrados no Brasil foi de 52,3%. Apesar de discretamente inferior à média encontrada na literatura dos países de baixa e média incidência, está de acordo com algumas séries provenientes da América do Norte, onde são relatadas frequências inferiores a 50% (37, 65, 86, 352). No presente estudo, dos 11 pacientes com CHP, 5 (45%) apresentaram cirrose associada (Anexo B - lâmina 7). Estes dados estão de acordo com os encontrados na literatura nacional e podem estar relacionados à alta frequência de alcoolistas nesta série. A cirrose foi evidenciada na região peri-tumoral durante a revisão histológica dos casos. Como o estudo baseou-se em material obtido através de biopsia hepática por agulha, conforme outros trabalhos (4, 20, 66, 73, 100, 143, 167, 290, 291, 295, 301), é possível que sua ocorrência tenha sido sub-estimada em alguns casos, além de tornar praticamente impossível sua classificação em macro ou micronodular.



### 5.2.3 - Evolução clínica do CHP

A evolução clínica dos pacientes com CHP varia principalmente de acordo com o estágio da doença no momento do diagnóstico (247, 251).

Kameda (144) revisou em 1982 150 casos de CHP com mais de 3 anos de sobrevida, destacando como fatores de bom prognóstico a baixa idade, ausência de ascite e varizes de esôfago, ressecabilidade cirúrgica, pequeno tamanho da neoplasia e presença de cápsula no tumor. Outros aspectos considerados favoráveis por diversos autores incluem a ausência de cirrose (142, 175, 192, 248), os baixos níveis de alfa-fetoproteína (142) e o grau elevado de diferenciação tumoral (78, 208, 270).

Ocasionalmente surgem relatos de regressão espontânea do CHP (32, 110, 135, 176), embora o prognóstico, de maneira geral, permaneça ruim, sendo a sobrevida média descrita na literatura de cerca de 7 meses a partir do diagnóstico (10, 56, 76, 106, 241, 251).

Na presente série, 9 dos 11 casos de CHP (82%) apresentaram alta hospitalar, não havendo registro de seguimento posterior. Os dois pacientes restantes (18%) evoluíram para óbito durante a internação. Ambos possuíam em comum um pequeno intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico (média de 4,5 meses), se

comparados aos demais pacientes da série (8,3 meses), embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ , teste "t" de Student).

### 5.3 - Aspectos laboratoriais do CHP

Os achados laboratoriais nos pacientes com CHP refletem o estágio da doença e as lesões hepáticas subjacentes, como a hepatite crônica ou cirrose (247).

As alterações bioquímicas mais frequentes envolvem as bilirrubinas, transaminases e fosfatase alcalina, porém são inespecíficas e não permitem diferenciar a cirrose isolada daquela associada ao CHP (196, 302, 329).

A seguir, serão analisadas em detalhe algumas destas alterações mais encontradas no exame laboratorial dos pacientes portadores de CHP.

#### 5.3.1 - Bilirrubinas

Em geral a concentração média da bilirrubina sérica permanece baixa no CHP, embora a maioria dos pacientes apresente icterícia em algum momento da evolução (153, 299). Lai e col. (174) analisaram a distribuição dos níveis séricos de bilirrubina total (BT) em 205 pacientes chineses com CHP, no momento da internação. Neste trabalho, cerca de 75% dos pacientes

apresentaram BT inferior a 3,0mg/dl e apenas 17,5% superior a 5,0mg/dl. A média dos pacientes quanto ao valor da BT foi de 4,3mg/dl, variando entre 0,3 e 32,8mg/dl. Segundo os autores, as séries de CHP relatadas em países de alta incidência em geral descrevem uma menor frequência de pacientes ictericos, relacionada provavelmente ao diagnóstico precoce e evolução rápida. De fato, Alpert e col. (10), ao analisarem 46 pacientes com CHP na África, encontraram uma concentração de bilirrubina sérica dentro da normalidade em mais de 50% dos casos. Por outro lado, Curutchet e col. (71) encontraram hiperbilirrubinemia em 41 de 65 pacientes (63,1%) diagnosticados nos E.U.A., enquanto Kay (146), em Nova Iorque, relatou um índice de 90% em 32 pacientes com CHP estudados.

No Brasil, Gonçalves & Pereira (106) analisaram 43 casos de CHP no Espírito Santo, encontrando uma elevação média da BT da ordem de 4,3mg/dl e icterícia detectável clinicamente em 30% dos casos.

Na presente casuística, dos 11 pacientes com CHP, 8 (73%) apresentaram hiperbilirrubinemia, sendo que em um dos casos não havia a informação no prontuário. Os valores de BT encontrados variaram entre 0,55 e 14 mg/dl, com média de 4,5 mg/dl. Tanto a frequência de casos com elevação da bilirrubina quanto os níveis desta alteração estão de acordo com os descritos na literatura dos países de média ou baixa incidência.

### 5.3.2 - Transaminases

As alterações nos níveis das transaminases glutâmico oxalacética ou do aspartato (TGO) e glutâmico pirúvica ou da alanina (TGP) ocorrem em praticamente todos os pacientes com CHP, porém o padrão de elevação não tem sido considerado significativo a ponto de permitir um diagnóstico específico (136, 146, 292, 359, 360).

Shimokawa e col. (306) procuraram avaliar os níveis de transaminases em 131 casos de CHP, comparando-os com os encontrados em 76 casos de metástases hepáticas e 234 casos de cirrose. Os resultados obtidos (vide tabela 5.8) demonstraram que embora a TGO fosse constantemente maior que a TGP nos três grupos estudados, este aumento era mais significativo nos casos com CHP.

TABELA 5.8

DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DAS TRANSAMÍNASES EM PACIENTES COM CHP ASSOCIADO OU NÃO A CIRROSE, CIRROSE SEM CHP E METÁSTASES HEPÁTICAS\*

grupo	n <sup>o</sup> de pacientes	média da TGO (normal: até 40UI/l)	média da TGP (normal: até 40UI/l)	índice TGO/TGP
CHP c/ cirrose	92	152 +/- 14	54 +/- 5	3,5 +/- 0,3
CHP s/ cirrose	39	96 +/- 12	42 +/- 5	2,5 +/- 0,2
cirrose	234	84 +/- 17	55 +/- 4	1,9 +/- 0,1
metástases hepát.	76	64 +/- 17	38 +/- 5	2,2 +/- 0,1

\* Dados obtidos da referência 306

A causa do maior aumento de TGO observado nos pacientes com CHP não foi ainda elucidada, embora várias teorias tenham sido propostas. Um dos possíveis mecanismos envolve o crescimento tumoral próximo a ramos importantes da veia porta, comprometendo a vascularização e induzindo a um estado de anóxia com necrose e subsequente elevação das transaminases (306). Este fato explicaria o motivo pelo qual o grupo de pacientes com CHP apresentou os níveis mais altos de TGO, porém não o motivo pelo qual a TGP permaneceu em níveis baixos. Na doença hepática alcoólica a explicação do aumento seletivo da TGO em relação a TGP está relacionado ao dano preferencial da mitocôndria e à deficiência de piridoxal fosfato encontrados em pacientes alcoolistas, porém nenhum destes mecanismos se aplica à

fisiopatologia do CHP (348, 357). Wallerstedt e col. (348) também encontraram um índice TGO/TGP significativamente maior em pacientes com CHP. Estes autores, assim como outros (357) postulam uma produção seletiva de TGO pelo tecido tumoral, com posterior liberação na circulação.

No Brasil, uma análise de 43 pacientes com CHP mostrou valores de TGO consistentemente maiores que os de TGP. A média de elevação de ambas enzimas foi de cerca de quatro e três vezes os valores normais, respectivamente sendo a média do índice TGO/TGP de 1,13 (106).

Na presente série, dos 11 pacientes com CHP 7 (64%) apresentaram TGO maior que a TGP. A média da elevação da TGO em todos os pacientes analisados foi de 94,9UI/l (normal até 36UI/l), enquanto que a média da TGP foi de 69,4UI/l (normal até 40UI/l). A média do índice TGO/TGP foi de 1,4, semelhante ao descrito na literatura nacional. Não houve correlação entre o grau de elevação do índice TGO/TGP e a presença de alcoolismo ou cirrose nos pacientes estudados.

### 5.3.3 - Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (FA) sérica encontra-se elevada na maioria dos casos de CHP, em geral com pequeno ou nenhum aumento das bilirrubinas (241).

Ocasionalmente, os níveis de FA acham-se inexplicavelmente altos em alguns pacientes com CHP. A causa deste fenômeno é ainda desconhecida, porém existem evidências de que seja originada a partir de uma isoenzima produzida pelo tumor (351).

Apesar da elevação da FA não ser específica para o CHP, um aumento súbito de seus níveis em pacientes com diagnóstico de cirrose deve sugerir a possibilidade de desenvolvimento tumoral (297).

Greene & Schiff (112) postulam que níveis de FA acima de sete vezes o valor normal constituem evidência muito sugestiva de CHP em pacientes com quadro clínico compatível.

Kew e col. (153) revisaram os elementos diagnósticos em 73 pacientes com CHP, encontrando elevação da FA em 63 casos (86%). Em 24 casos (32%), o padrão de elevação foi superior a quatro vezes o valor normal com bilirrubinas normais ou apenas discretamente alteradas, sugestivo de lesão hepática que ocupa espaço ou doença infiltrativa do fígado. Achados semelhantes foram descritos por autores nos E.U.A. (65, 71, 98, 104, 146, 173, 230, 259), África (10, 329) e Ásia (174).

No Brasil, a média de elevação da FA em 43 pacientes com CHP foi de 4,5 vezes o normal (106).

No presente estudo, 10 pacientes com CHP apresentaram o registro da FA no prontuário. Destes, estava elevada em 8 casos (80%). Como um grupo, a média da elevação foi de 285,5 (normal até 100 UI/l), ou seja, aproximadamente 3 vezes o valor normal. No entanto, analisando-se os casos individualmente, apenas 5 pacientes (45%) apresentaram fosfatase alcalina superior a 300 UI/l, constituindo um perfil colestático. Percebe-se que os casos ditos "típicos de CHP" com FA elevada e bilirrubinas baixas não são freqüentes nas séries analisadas.

Correlacionando-se os dados clínicos e bioquímicos, observamos que os dois únicos pacientes com fosfatase alcalina normal eram também os dois únicos casos sem icterícia e ascite no quadro clínico. Este fato, de nosso conhecimento, não está descrito na literatura e pode estar relacionado ao quadro clínico mais brando apresentado por estes pacientes.

#### 5.3.4 - Outros parâmetros laboratoriais

Vários autores têm descrito uma série de alterações laboratoriais em pacientes com CHP (205, 268), destacando-se entre as mais freqüentes: 1) hipoglicemia relacionada a um aumento na taxa de metabolização da glicose pela massa tumoral e/ou produção de substância com ação semelhante à insulina (26, 34, 162, 179, 210, 211, 273, 294, 296, 345, 364); 2) hipercalcemia relacionada à secreção tumoral de substância com



ação semelhante ao paratormônio (26, 148, 163); 3) eritrocitose relacionada à produção de eritropoietina pelo tumor (26, 29, 50, 94, 109, 145, 276, 296, 343), 4) hipercolesterolemia causada provavelmente pela produção de lipoproteínas a partir da massa tumoral (294) e 5) antígenos onco-fetais como a alfa-fetoproteína e o antígeno carcinoembrionário (28, 58, 93, 121, 150, 181, 189, 194, 244, 274, 285, 331, 339, 356).

Os pacientes analisados neste estudo não possuíam registro das alterações laboratoriais descritas, cuja presença poderia ter aumentado a acurácia do diagnóstico desta neoplasia.

#### 5.4 - Aspectos imuno-histoquímicos do CHP

##### 5.4.1 - Método imuno-histoquímico

O método imuno-histoquímico tem se tornado um instrumento indispensável para muitas áreas de pesquisa biomédica e de diagnóstico histopatológico (69, 147, 324). Este método baseia-se na grande afinidade existente nas reações antígeno-anticorpo, utilizando-se um marcador visível para permitir a localização dos complexos imunológicos formados nos tecidos ou células estudados (324).

A primeira forma de imuno-histoquímica foi descrita por Coons e col. (67) em 1941, a partir da conjugação de um anticorpo

com uma substância fluorescente denominada isotiocianato de fluoresceína. Esta técnica teve sua importância prática prejudicada por uma série de problemas técnicos, tais como a impossibilidade de utilizar material processado rotineiramente e incluído em parafina (necessitando material fresco seccionado em criostato), o rápido desaparecimento da fluorescência impedindo a manutenção das lâminas coradas por tempo mais longo, a necessidade de equipamento especializado, o fato de não ser possível a comparação dos resultados obtidos com os aspectos morfológicos teciduais e, ainda, a presença de autofluorescência dificultando a interpretação dos resultados (224, 325).

Estes obstáculos estimularam a pesquisa de substâncias alternativas que pudessem ser conjugadas aos anticorpos e evitassem as desvantagens apresentadas pela imunofluorescência. Dentre os métodos testados o que provou ser o mais prático e vantajoso foi descrito por Nakane & Pierce (224) em 1967. Estes autores utilizaram a enzima peroxidase conjugada a um anticorpo, seguida da adição de diaminobenzidina (DAB) para localizar a reação no tecido.

Esta técnica, denominada imunoperoxidase, exigia inicialmente um anticorpo específico conjugado com peroxidase para cada antígeno a ser identificado, até que Sternberg e col. (314), em 1970, propuseram um método indireto sem a utilização de anticorpos primários conjugados. Desde então muitas outras

modificações foram introduzidas para aperfeiçoar o método original, proporcionando um aumento na sensibilidade e especificidade dos resultados obtidos (51, 130, 325, 342). Atualmente existem quatro métodos de imunoperoxidase disponíveis: 1) método direto; 2) método indireto; 3) método da peroxidase-antiperoxidase e 4) método da avidina-biotina (325).

No presente trabalho utilizou-se o método do complexo avidina-biotina (ABC), descrito por Hsu e col. (129) em 1981, que baseia-se na propriedade extraordinária que apresenta a molécula de avidina de se ligar com a proteína biotina. Esta ligação é de alta afinidade e cerca de um milhão de vezes mais estável que a da maioria das ligações antígeno-anticorpo. Isto permite a utilização de anticorpos mais diluídos, minimizando as reações inespecíficas e o custo do procedimento (129).

Além da seleção do método mais adequado, outro pré-requisito importante para a realização e interpretação das técnicas imunohistoquímicas é o controle da especificidade dos anticorpos. Poderia parecer, à primeira vista, que o uso dos anticorpos monoclonais tivessem solucionado este problema. Porém, a alta especificidade que apresentam por possuírem apenas uma molécula dirigida a um sítio específico do antígeno, os torna menos sensíveis que os anticorpos policlonais que reagem com vários sítios antigênicos (69). Neste trabalho utilizou-se anticorpos policlonais contra o HBsAg e contra o HBcAg. O laboratório de

origem desses anticorpos (Dako Co.) indicava não haver reatividade cruzada significativa entre ambos.

Observando-se os resultados do presente trabalho, verificamos que em nenhum caso houve concomitância de positividade para as reações imuno-histoquímicas para o HBsAg e o HBcAg, fato que indica uma boa especificidade para ambos anticorpos.

Além do controle da especificidade dos anticorpos, existem pelo menos dois outros tipos de controle em uma reação imuno-histoquímica: os controles positivos e negativos. Ambos devem ser processados junto com o material a ser pesquisado para assegurar resultados confiáveis (69).

Um controle positivo corresponde a um tecido selecionado com o propósito de obter-se uma reação positiva definida. Para tal, deve ser utilizado um tecido do qual se possua informação independente de que contém grandes quantidades do antígeno em estudo. No presente trabalho empregou-se como controles positivos cortes parafinados de fígado humano fornecidos pelo mesmo laboratório de origem dos anticorpos (Dako Co.). Os resultados foram positivos tanto para o HBsAg (Anexo B - lâmina 1), quanto para o HBcAg (Anexo B - lâmina 2).

Os controles negativos foram obtidos a partir dos cortes parafinados de fígado humano usados como controle positivo, com a diferença que o anticorpo primário foi substituído por soro normal, não havendo reação positiva em nenhum dos casos. Além deste controle negativo, desempenharam a mesma função todos aqueles casos que, investigados simultaneamente, não demonstraram imuno-reação positiva.

#### 5.4.2 - Freqüência dos marcadores do VBH em pacientes com CPH

##### A) HBsAg

A freqüência da detecção do HBsAg no tecido hepático em pacientes portadores de CPH apresenta uma distribuição peculiar de acordo com a região estudada.

Nos locais de alta incidência de CPH, como Ásia e África, a taxa de positividade do HBsAg pode chegar a mais de 90% (8, 126, 127, 137, 138, 159, 227), contrastando com a maioria dos relatos provenientes de países com média e baixa incidência que apresentam índices de positividade da ordem de 21 a 34% (37, 263, 328).

Estes dados são confirmados por diversos trabalhos que utilizam métodos distintos de detecção do HBsAg, tanto

sorológicos como o RIE e EIA (16, 21, 25, 43, 55, 63) quanto teciduais como a imunofluorescência, imunoperoxidase e orceína de Shikata (5, 6, 7, 8, 38, 63, 159, 361).

No entanto, apesar da grande variação encontrada entre as diferentes áreas, os pacientes com CHP apresentam cerca de 20 a 40 vezes maior frequência de HBsAg detectável quando comparados com controles provenientes da mesma população. Este fato ocorre de maneira idêntica nas áreas de alta e baixa incidência (320).

No Brasil, Sarno e col. (293) analisaram retrospectivamente 15 casos de CHP no Estado do Rio de Janeiro, procurando determinar a positividade para o HBsAg através do método da imunoperoxidase. Os autores encontraram 4 casos positivos (26,7%). Outros trabalhos realizados no Rio de Janeiro (185, 265), Espírito Santo (106, 262) e Minas Gerais (97) encontraram resultados semelhantes utilizando métodos sorológicos baseados na técnica do RIE.

Na presente série, o HBsAg foi detectado em 2 dos 11 pacientes com CHP (18%), estando de acordo com o percentual descrito na literatura nacional e internacional para áreas de baixa incidência.

Quanto à localização, o HBsAg é detectado apenas no citoplasma dos hepatócitos, sendo que a reação positiva ocorre em

geral no tecido não-tumoral adjacente, embora sejam observadas áreas tumorais igualmente positivas (126, 159).

Em nossa casuística a coloração positiva para o HBsAg ocorreu tanto nas células neoplásicas quanto nos hepatócitos normais. O aspecto era o de grânulos de inclusão no citoplasma, variando desde densamente até pobremente granulados no mesmo tecido (Anexo B - lâmina 3).

#### B) HBcAg

São raros os trabalhos na literatura demonstrando a frequência do HBcAg no tecido hepático dos pacientes com CHP.

Nayak e col. (227) analisaram, em 1977, 41 casos de CHP provenientes de diversas regiões da Índia, encontrando positividade para o HBcAg em 9 pacientes (22%). A localização era intranuclear em todos os casos, com intensidade de coloração variável.

Estes achados contrastam com aqueles descritos por Nazarewicz e col. (229), os quais não acharam nenhum caso de positividade para o HBcAg entre 12 casos de CHP analisados por imunofluorescência. Os autores salientam que esta técnica tem menor sensibilidade quando comparada à imunoperoxidase.

Huang & Neurath (133) sugerem que a presença do HBcAg intranuclear representa um estímulo para o sistema imunológico, permitindo a lesão hepática progressiva e continuada. A evolução de alguns casos de hepatite viral aguda para as formas crônicas, culminando em cirrose e CHP, estariam relacionadas a uma falha do sistema imune em eliminar o vírus do organismo, porém sem deixar de reconhecê-lo como agente estranho e reagir contra ele. Por outro lado, a presença do HBcAg no núcleo dos hepatócitos pode estar relacionada com a integração do genoma viral ao do hospedeiro, passo inicial na direção da carcinogênese (90, 99, 105, 113,, 171, 209, 227).

Em nossa série, 5 dos 11 casos de CHP (45%) eram positivos para o HBcAg. Quanto à localização, foi detectado tanto no citoplasma quanto no núcleo dos hepatócitos, sendo mais comumente encontrado no tecido não-tumoral adjacente (Anexo B - lâmina 4). Em nenhum dos casos houve reação positiva concomitante para o HBsAg, fato não explicado na literatura.

#### 5.5 - Correlação entre os diversos aspectos do CHP e a presença do VBH



### 5.5.1 - Aspectos epidemiológicos

A distribuição dos marcadores do VBH em pacientes com CHP pode variar de acordo com algumas características epidemiológicas da população estudada.

Quanto ao sexo, apesar do CHP ser mais freqüente em homens, a prevalência de positividade para o HBsAg não difere entre os sexos na maioria das séries de CHP (115, 336). De fato, na série descrita por Gonçalves & Pereira (106) no Espírito Santo, entre os 35 pacientes masculinos com CHP 19 eram HBsAg-positivos (54,3%), enquanto que entre as 8 pacientes femininas 4 eram HBsAg-positivas (50%).

Em nossa casuística, dos 8 pacientes masculinos com CHP 4 eram positivos para o HBsAg ou HBcAg (50%), sendo que entre as 3 pacientes femininas todas eram positivas para um dos marcadores. A diferença, no entanto, não foi considerada estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ , teste exato de Fisher).

A idade, por outro lado, parece apresentar uma relação inversamente proporcional com a positividade para os marcadores do VBH na maioria das séries de CHP. Vogel e col. (346) encontraram uma prevalência do HBsAg da ordem de 100% em pacientes com CHP e idade inferior a 20 anos, contrastando com uma taxa de no máximo 17% naqueles com mais de 50 anos. Prince e

col. (272) descreveram padrão semelhante com estudo realizado no Senegal. Entre 70 e 80% de seus pacientes com CHP e idade inferior a 40 anos eram HBsAg-positivos, contra 35 a 45% daqueles acima de 40 anos.

Estes dados estão de acordo com os encontrados em 43 casos de CHP diagnosticados no Brasil, onde a frequência de HBsAg era de 64% nos casos com idade inferior a 50 anos e 33,3% nos casos acima de 50 anos (106).

É possível que esta variação na idade de ocorrência dos CHP HBsAg-positivos comparados aos negativos esteja relacionada ao fato de que a carcinogênese hepática desenvolve-se preferencialmente nos pacientes que adquirem a infecção pelo VBH mais precocemente, ocasião em que o sistema imune ainda imaturo permite a proliferação viral e evolução para a cronificação (106, 320).

Uma consequência direta deste fenômeno é, obviamente, uma média de idade inferior nos pacientes com CHP positivos para o VBH em relação aos negativos (115). Em Uganda, a diferença observada foi de 9 anos (346), na Grécia, de 4 anos (328), no Japão, de 5,9 anos (243) e no Brasil, de 6,7 anos (106).

Na presente casuística a média de idade dos pacientes com CHP positivos para o HBsAg ou HBcAg era de 53,6 anos, enquanto

aquela encontrada nos casos negativos era de 44,3 anos. Embora esta diferença não tenha alcançado significância estatística ( $p > 0,05$ , teste "t" de Student), a tendência apresentada contraria a descrita na literatura. Uma possível explicação para isto poderia estar relacionada a uma baixa incidência de portadores do VBH em nosso meio, dificultando assim a transmissão materno-fetal do vírus que é a principal responsável pelo contágio de recém-nascidos e crianças na primeira infância nos países de alta incidência do CHP.

Quanto à distribuição racial, não existe evidência na literatura que, em uma mesma população, os pacientes portadores de CHP apresentem maior incidência de marcadores do VBH de acordo com seu grupo racial.

Com efeito, Gonçalves & Pereira (106), ao analisarem 43 casos de CHP no Espírito Santo, encontraram uma prevalência de positividade para o HBsAg da ordem de 61,5% para os pacientes brancos e de 50% para os pacientes negros e mulatos.

Em nossa série, dos 11 casos de CHP apenas 2 não eram da raça branca. A prevalência dos marcadores do VBH neste sub-grupo era de 50%, semelhante à descrita para os pacientes brancos (66%), estando de acordo com os achados da literatura.

### 5.5.2 - Aspectos clínicos

O quadro clínico dos pacientes com CHP positivo para os marcadores do VBH não difere do observado nos pacientes negativos (106). As diferenças observadas nas manifestações clínicas dos pacientes com CHP parecem estar mais relacionadas com a taxa de incidência do CHP no local do que com o padrão de positividade para o VBH (98, 172, 174).

Nas regiões de alta incidência raramente encontra-se uma história prévia de hepatopatia crônica, contrastando com o observado nas áreas de média e baixa incidência (106, 247).

Nesta série não houve diferença significativa entre o quadro clínico dos pacientes com CHP positivo e negativo para o VBH, embora tenha sido notada uma discreta tendência a sinais e sintomas sugestivos de cirrose (icterícia, ascite, esplenomegalia) nos pacientes com presença de HBsAg ou HBcAg no tecido hepático (42%) em relação aos que não possuíam estes marcadores (25%) ( $p > 0,05$ , teste exato de Fisher).

Em relação aos fatores de risco, vários autores têm discutido o papel de agentes tais como o alcoolismo, tabagismo e cirrose na gênese do CHP.

Quanto ao hábito de ingestão alcoólica, existem evidências de que possa ser um agente carcinogênico direto em neoplasias da boca, faringe, laringe e esôfago (188), porém, no caso dos tumores hepáticos postula-se uma possível ação sinérgica com o VBH, potencializando seus efeitos para a transformação maligna (219).

Com efeito, Bréchet e col. (48) encontraram o DNA do VBH integrado ao genoma das células hepáticas em todos os 20 pacientes alcoolistas com CHP testados em sua série, embora apenas 9 (45%) apresentassem positividade para os marcadores séricos do VBH. Também Onishi e col. (239), ao estudarem os efeitos da ingestão alcoólica crônica no desenvolvimento de CHP, verificaram que os pacientes alcoolistas com CHP positivo para o HBsAg eram, em média, 9 anos mais jovens do que os não-alcoolistas, sugerindo um efeito facilitador do álcool no surgimento do CHP.

Por outro lado, Walter e col. (349), utilizando a técnica da hibridização molecular, não encontraram o DNA do VBH em nenhum de seus 17 pacientes alcoolistas com CHP, concluindo pela inexistência de evidência molecular da contribuição do VBH para o desenvolvimento do CHP nos alcoolistas de sua série.

Em nossa casuística, dos 7 pacientes com CHP positivo para os marcadores do VBH, 4 eram alcoolistas (57%), enquanto que dos

4 pacientes com CHP negativo para o VBH 2 eram alcoolistas (50%) ( $p > 0,05$ , teste exato de Fisher). Não houve diferença significativa na média de idade dos dois grupos. Portanto, pelo menos na presente série, não se pode sugerir um efeito potencializador do álcool sobre o VBH, como indica a literatura.

Ao analisarmos os 6 pacientes alcoolistas desta série, verificamos que apenas um deles não possuía nenhum dos outros fatores de risco associados (VBH, cirrose, e tabagismo), dificultando a análise do álcool como fator isolado no desenvolvimento do CHP).

Quanto ao tabagismo, a literatura sugere uma relação inversamente proporcional com a positividade para os marcadores do VBH. Dois estudos independentes realizados em 1982 na China (177) e Grécia (337) encontraram uma associação positiva entre o fumo e o CHP apenas em um sub-grupo de pacientes com mais de 50 anos e marcadores negativos para o VBH. Kew e col. (152) encontraram resultados semelhantes em estudo controlado realizado em 1985 na África do Sul, envolvendo 240 pacientes com CHP.

Analisando-se a frequência do hábito de fumar em relação à positividade dos marcadores teciduais do VBH na presente série torna-se evidente que 100% dos pacientes negativos para a infecção pelo VBH eram tabagistas, contra apenas 57% dos pacientes positivos para o VBH. Este achado, embora sem

significado estatístico ( $p > 0,05$ , teste exato de Fisher), mostra uma tendência semelhante à descrita na literatura, apontando para uma maior frequência de fumo associado ao CHP em pacientes sem evidência de infecção prévia pelo VBH.

Quanto à presença de doença hepática crônica, tem sido demonstrado que o CHP ocorre em geral nos fígados com cirrose do tipo macronodular (84, 247). O principal fator etiológico, embora não o único, implicado neste tipo de cirrose, é a infecção pelo VBH.

Outra evidência que favorece a associação do VBH e cirrose na gênese do CHP é o fato de pacientes cirróticos com marcadores positivos para o VBH apresentarem uma maior frequência de displasia hepatocitária, considerada uma lesão pré-maligna em estudos experimentais (5, 347).

Akagi e col. (5), ao estudarem pacientes com cirrose e CHP, encontraram positividade para o HBsAg em 70,2% dos casos com displasia, contra apenas 32,6% dos casos sem displasia. Estes achados são semelhantes aos descritos por outros autores (275, 283), sugerindo a possibilidade de haver uma relação de causa e efeito entre a presença do VBH e o surgimento de displasia hepatocitária nos pacientes cirróticos. Alguns autores, no entanto, apresentam resultados conflitantes, permanecendo a controvérsia (62, 64).

Finalmente, deve ser ressaltado que os principais fatores de risco implicados na gênese do CHP, entre os quais o VBH e o alcoolismo, são igualmente os principais fatores etiológicos da cirrose. Este fato poderia, por si só, explicar a alta freqüência desta alteração hepática nos casos de CHP. Não explicaria, contudo, os casos de CHP associados à cirrose de etiologia não relacionada a vírus ou álcool, entre os quais destacam-se a cirrose biliar primária, a hemocromatose e a deficiência de alfa-1-antitripsina (75, 96, 158, 276, 302).

Na série aqui descrita, dos 7 pacientes com CHP positivo para o VBH 4 apresentaram cirrose associada (57%), contrastando com apenas 1 dos 4 casos de CHP negativos para o VBH (25%). Esta diferença, embora estatisticamente não-significativa ( $p > 0,05$ , teste exato de Fisher) pode sugerir que a cirrose exerça um papel intermediário no desenvolvimento do CHP a partir do VBH. Este achado é também compatível com aquele descrito no Espírito Santo (106), onde a freqüência de cirrose nos casos de CHP HBsAg-positivos era de 87%, comparada a apenas 47% nos casos HBsAg-negativos. Resultados semelhantes foram descritos na Grécia (203) e na África do Sul (156).

No presente estudo não se encontrou lesões compatíveis com displasia hepatocitária em nenhum dos pacientes com cirrose associada ao CHP. É possível que o material, obtido a partir de biopsia hepática por agulha, tenha sido insuficiente para



permitir uma avaliação adequada das condições do tecido peritumoral, que não se constituíram objetivo deste trabalho.

Outro aspecto clínico a ser considerado compreende o tipo de evolução clínica apresentada pelos pacientes com CHP positivo para o VBH em relação aos casos negativos. Manassis e col. (203), ao compararem a evolução de pacientes com CHP positivos e negativos para o HBsAg na Grécia, observaram uma sobrevida menor nos casos com evidência de infecção pelo VBH. Este achado não tem sido confirmado por outros autores (106).

Na série analisada neste estudo, os 2 pacientes que evoluíram ao óbito durante a internação eram portadores de HBsAg, sendo que nenhum dos pacientes que apresentaram alta hospitalar possuíam este marcador. Este achado não apresentou significância estatística provavelmente devido ao pequeno tamanho amostral ( $p > 0,05$ , teste exato de Fisher), porém, corrobora as afirmações de Manassis e col. (203) descritas anteriormente.

Analisando-se o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico nos dois grupos, observou-se que os 7 pacientes positivos para o VBH apresentaram em média 5,1 meses, contra 11,8 meses dos 4 pacientes negativos para o VBH, embora tenha havido considerável superposição entre os grupos sem atingir o nível de significância exigido ( $p > 0,05$ , teste "t" de Student).

### 5.5.3 - Aspectos laboratoriais

São raros, na literatura, os trabalhos comparando alterações laboratoriais em pacientes com CHP positivo e negativo para o VBH.

Prince e col. (272) estudaram 165 casos de CHP no Senegal, encontrando uma discreta elevação na média das bilirrubinas e transaminases no grupo com antigenemia positiva para o HBsAg, porém as diferenças não foram consideradas estatisticamente significativas. Reed e col. (278), em uma série de 264 pacientes com CHP diagnosticados em Londres, também falharam em demonstrar diferenças significativas em qualquer dos parâmetros laboratoriais nos dois grupos de CHP. A experiência nacional confirma estes achados (106).

Em nossa série os parâmetros laboratoriais, representados pelas bilirrubinas, transaminases e fosfatase alcalina, foram rigorosamente semelhantes nos dois grupos de CHP, de acordo com os dados descritos na literatura.

6 - CONCLUSÕES

## 6 - CONCLUSÕES

O CHP é considerado doença pouco freqüente em nosso meio. Mesmo os serviços especializados e familiarizados com o diagnóstico apresentam uma baixa incidência desta neoplasia. Este fato não é próprio da região Sul, ao contrário, reflete o índice nacional e traduz-se pela raridade das publicações brasileiras nesta área.

Por outro lado, a análise das estatísticas de saúde pública quanto ao CHP em nosso país fica prejudicada pelos problemas de preenchimento inadequado dos atestatos de óbito, baixo índice de necrópsias e falta de diferenciação entre os diferentes tumores primários do fígado, em especial o CHP e o colangiocarcinoma.

A revisão de 1000 biopsias hepáticas consecutivas realizadas num período de julho de 1981 a dezembro de 1988 na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA) e arquivadas no Departamento de Patologia da Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), permitiu a análise da freqüência de CHP diagnosticados nesta instituição. Os 11 casos de CHP encontrados representaram 1,1% do total das biopsias hepáticas, com uma média de 1 caso a cada 8,2 meses. O número de

pacientes com CHP encontrados nesta pesquisa é compatível com os dados descritos no Brasil, América Latina, Estados Unidos e maioria dos países europeus, ditos locais de baixa incidência.

O estudo dos CHP através da técnica da imunoperoxidase permitiu a análise retrospectiva dos casos quanto à presença ou não dos marcadores do VBH no tecido hepático, além de possibilitar a correlação entre os aspectos morfológicos e a localização dos antígenos no fígado.

No material estudado encontrou-se uma freqüência de marcadores do VBH (HBsAg e HBcAg) da ordem de 64%, semelhante ao descrito na literatura nacional e internacional. A localização do HBsAg foi exclusivamente citoplasmática, enquanto que o HBcAg apresentou-se tanto no citoplasma quanto no núcleo dos hepatócitos. Ambos os antígenos foram detectados no tecido tumoral e peri-tumoral indiscriminadamente.

Um achado de certo modo intrigante foi o maior número de pacientes com HBcAg em relação ao HBsAg. Como o antígeno do "core" do VBH representa o sítio de localização do DNA viral, este achado foi interpretado como evidência indireta da integração do material genético do vírus com o do hospedeiro, passo considerado fundamental na gênese da neoplasia.

Deve ser destacado, por outro lado, a raridade dos estudos do HBcAg no tecido hepático dos pacientes portadores de CHP. Na medida em que mais trabalhos sejam realizados com este enfoque poderá ser evidenciada a maior frequência do HBcAg em relação ao HBsAg.

A frequência de marcadores do VBH encontrada neste estudo foi considerada cerca de 60 vezes superior a taxa estimada de portadores assintomáticos do VBH em Porto Alegre, da ordem de 1,14%.

Além de estabelecer a frequência da associação do VBH com o CHP na ISCMPA, o presente estudo tornou possível avaliar os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais envolvidos.

Dentre os aspectos epidemiológicos estudados, observou-se que o CHP acomete preferencialmente homens, numa proporção de 2,6 : 1, semelhante ao descrito na literatura dos países de baixa incidência. A idade média dos pacientes foi de 50,2 anos, a raça predominante foi a branca em relação aos negros e mulatos, numa proporção de 4,5 : 1. Este achado reflete provavelmente a distribuição racial característica da região Sul, pois estudos realizados no Norte e Nordeste evidenciaram um padrão oposto.

Quanto aos aspectos clínicos, ficou evidenciado que a forma mais frequente de apresentação foi a dos sinais e sintomas

sugestivos de neoplasia intra-abdominal, traduzindo-se pela presença de massa palpável no abdome superior (64% dos casos). Os pacientes com clínica sugestiva de cirrose fundamentada no achado de icterícia, ascite, esplenomegalia e aranhas vasculares na ausência de massa palpável estiveram em segundo lugar, com 36%. Estes achados estão mais próximos dos descritos nas regiões de alta incidência, porém encontraram paralelo na literatura nacional (106).

Interessante notar o fato de que nenhum dos 4 pacientes com esplenomegalia apresentou massa palpável no abdome, observação esta, de nosso conhecimento, inexistente na literatura.

O período compreendido entre o início dos sintomas e o diagnóstico variou entre 1 e 24 meses, com média de 7,5 meses. A experiência dos autores é semelhante, tanto nas áreas de alta quanto baixa incidência.

Com relação aos fatores de risco associados, encontrou-se uma frequência de alcoolismo da ordem de 55%, tabagismo em 73% e cirrose em 45% dos casos. É possível que no caso específico do álcool tenha havido algum grau de omissão dos dados corretos, não apenas devido ao caráter retrospectivo da coleta como também ao preconceito existente com relação ao hábito de ingestão alcóolica. Nenhum dos pacientes estava em abstinência,

contrariando dados de literatura que sugerem ser o CHP mais freqüente em pacientes alcoolistas que pararam de beber.

A análise da evolução clínica dos pacientes com CHP mostrou que 2 casos evoluíram ao óbito durante a internação, enquanto os demais apresentaram alta hospitalar sem registro de seguimento crônico posterior.

Quanto aos exames laboratoriais do fígado, representado pela análise das bilirrubinas (BT e BDI), transaminases (TGO e TGP) e fosfatase alcalina (FA), foi evidenciado que apenas 1 dos 11 pacientes apresentou todos os registros dentro da normalidade, sendo que os demais possuíam pelo menos uma das provas alteradas. O padrão característico de lesão hepática que ocupa espaço no parênquima, caracterizado por grande elevação da FA com BT e BDI normais ou apenas discretamente alteradas foi descrito em 1 caso somente. Concluiu-se portanto que apesar de sensível para demonstrar a presença de uma alteração hepática, o exame laboratorial do fígado analisado neste trabalho carece de especificidade para revelar a natureza desta afecção.

A seguir, realizou-se também a comparação dos aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais entre os pacientes com CHP imuno-reatores positivos e negativos para os marcadores do VBH.



Quanto aos aspectos epidemiológicos, embora a análise estatística não tenha mostrado diferenças significativas, observou-se uma tendência a maior idade nos casos CHP positivos (média de 53,6 anos) em relação aos negativos (média de 44 anos). Esta relação contraria a maioria das descrições na literatura, podendo estar relacionada à baixa prevalência de portadores assintomáticos do VBH em nosso meio, reduzindo o risco de contágio em idade precoce.

Quanto aos aspectos clínicos, notou-se uma maior tendência nos casos de CHP positivos para o VBH apresentarem-se com quadro clínico sugestivo de cirrose (42%) em relação aos negativos (25%). Em relação aos fatores de risco não houve diferença quanto ao percentual de alcoolistas nos 2 grupos, porém observou-se que 100% dos pacientes com CHP negativos para o VBH eram tabagistas, contra apenas 57% dos positivos, de acordo com a literatura. O diagnóstico histológico de cirrose foi obtido em 57% dos casos positivos contra 25% dos casos negativos, sugerindo que o desenvolvimento de cirrose seja um passo intermediário na gênese do CHP a partir do VBH. Além disto, a média de duração dos sintomas foi menor no grupo positivo (5,1 meses) em relação ao negativo (11,8 meses). Quanto à evolução clínica, os 2 únicos óbitos durante a internação hospitalar ocorreram nos pacientes positivos para o HBsAg. Estes achados permitem supor que a presença do VBH acelere de alguma maneira a evolução clínica,

acarretando um pior prognóstico para os pacientes com CHP positivo para os marcadores virais.

A análise dos parâmetros laboratoriais nos 2 grupos de pacientes com CHP, imuno-reatores positivos e negativos, não permitiu concluir-se pela presença de diferenças significativas.

Finalmente, deve ser reconhecido que, embora muitas hipóteses tenham sido levantadas, a raridade do CHP em nosso meio (traduzida pelo pequeno tamanho amostral) impede um julgamento mais conclusivo das características desta neoplasia na ISCMPA.

Espera-se que trabalhos futuros, utilizando os avanços metodológicos proporcionados principalmente pela engenharia genética e biologia molecular possam elucidar a frequência e o real papel do VBH na gênese do CHP, permitindo maiores progressos no conhecimento da patogênese e do comportamento desta neoplasia.

Z - ANEXOS

7.1 - Anexo A

-----

PROTOCOLO PARA LEVANTAMENTO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E  
LABORATORIAIS DOS CASOS DE CHP

1) Identificação:

Nome: ..... Idade: ... Sexo: ... Cor: .....  
Data intern.: ..../..../... Data alta: ..../..../... Período int.: ..../..../...

2) Apresentação clínica:

Dor abdominal (local: ..... ) Anorexia/ Emagrecimento/ Febre  
Icterícia/ Hepatomegalia/ Massa Palpável (local: ..... )/ Ascite  
Esplenomegalia/ Aranhas Vasculares/ Eritema Palmar/ Ginecomastia  
Hiperpig. Cut. / Sopro Hepático

Outros: .....  
Duração dos Sintomas: .....

3) Fatores de Risco

- Álcool: .....  
- Fumo: .....  
- Cirrose: .....

4) Exames Laboratoriais

Data: ..../..../... ..../..../... ..../..../... ..../..../... ..../..../...  
BT: .....  
BDI: .....  
TGO: .....  
TGP: .....  
FA: .....

5) Laudo da Biopsia Hepática: .....  
.....

6) Evolução:

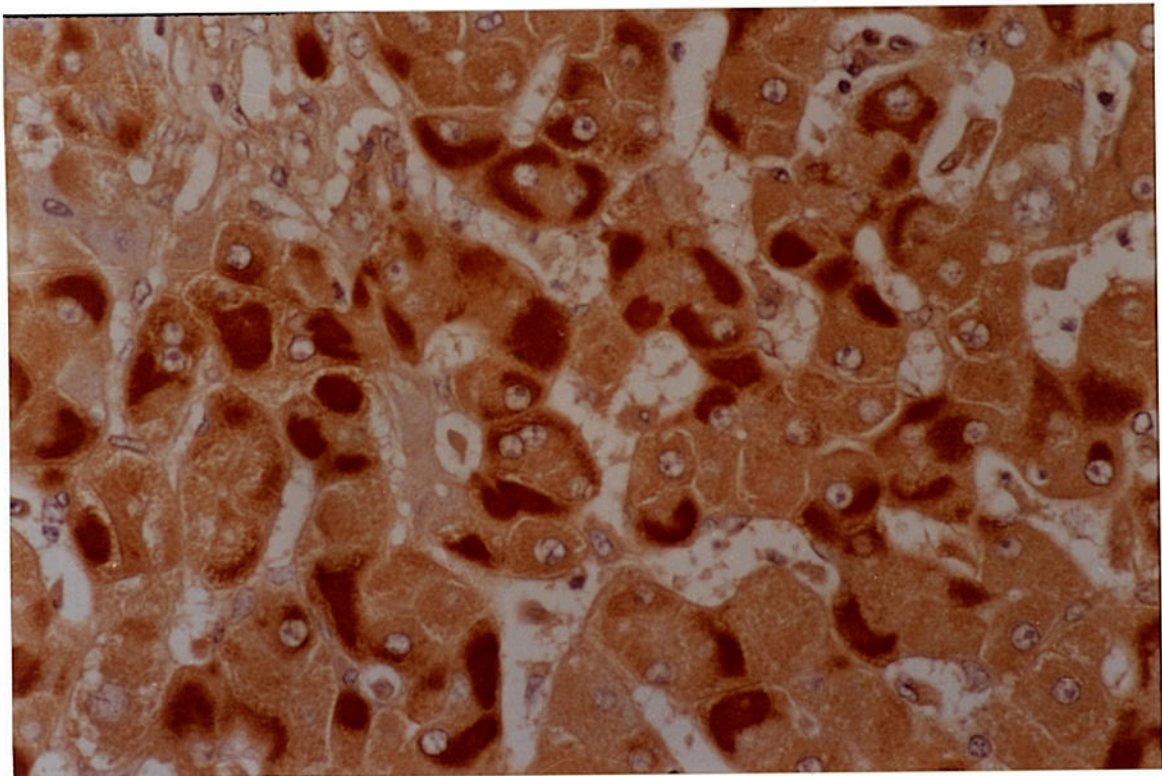
Alta

óbito

-----

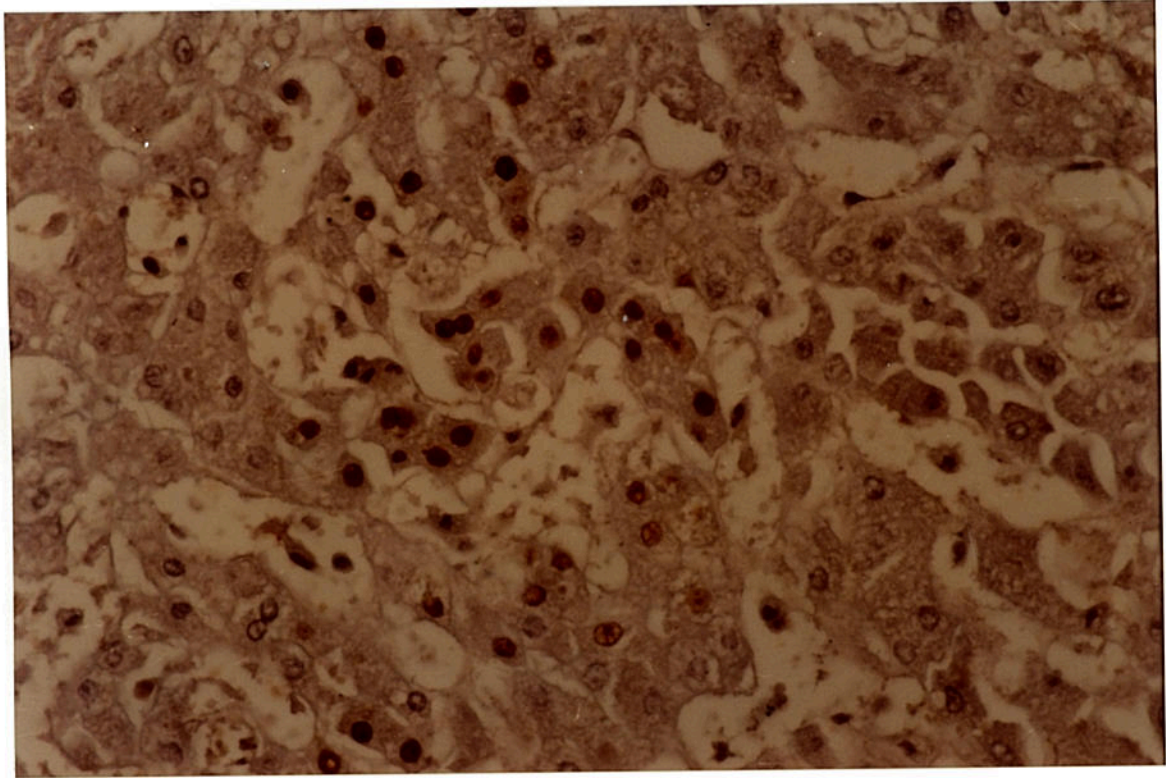
7.2 - Anexo B

LÂMINAS DE IMUNOPEROXIDASE E HISTOLOGIA DOS CASOS DE CHP



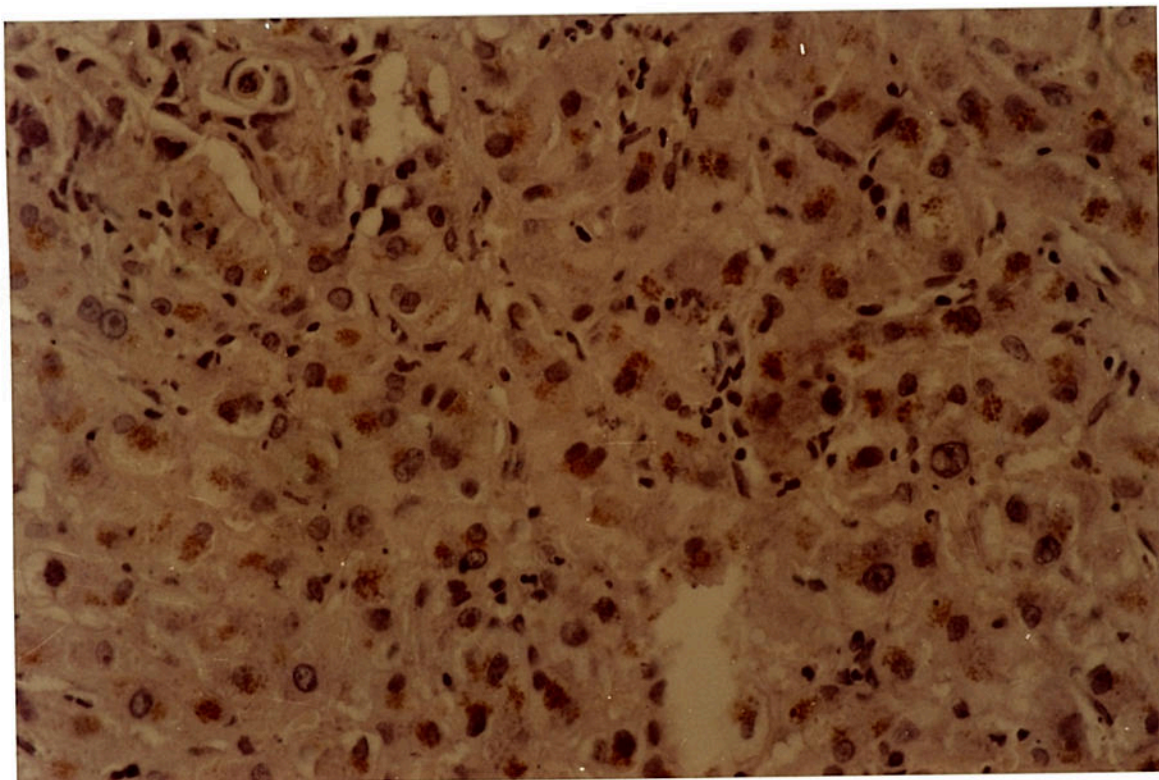
Lâmina 1

Controle positivo para HBsAg (Dako Corporation, Santa Barbara, CA., cód. nº T.1110). Fígado com cirrose e imuno-reacção positiva para o HBsAg de localização citoplasmática (aumento de 400 x).



Lâmina 2

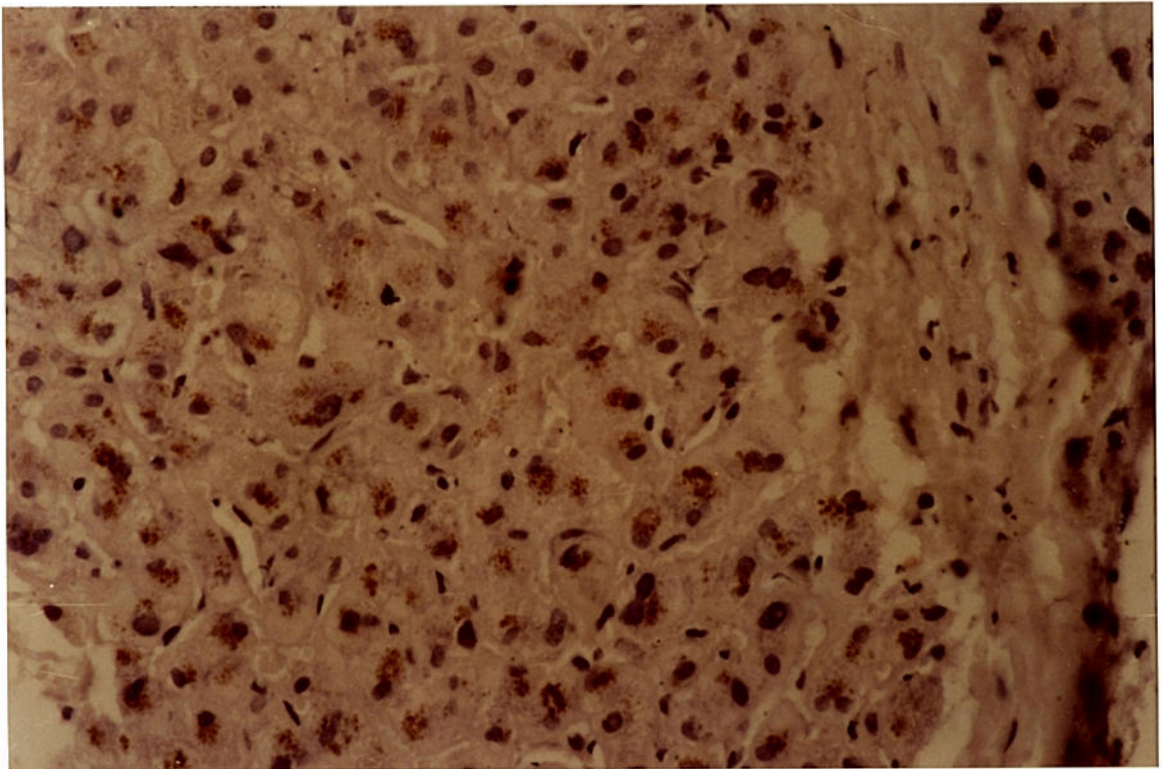
Controle positivo para HBcAg (Dako Corporation, Santa Barbara, CA. cód. nº T.1230). Fígado com cirrose e imuno-reação positiva para o HBcAg de localização intranuclear (aumento de 200 x).



Lâmina 3

Fígado com CHP e imuno-reação positiva para o HBsAg de  
localização citoplasmática

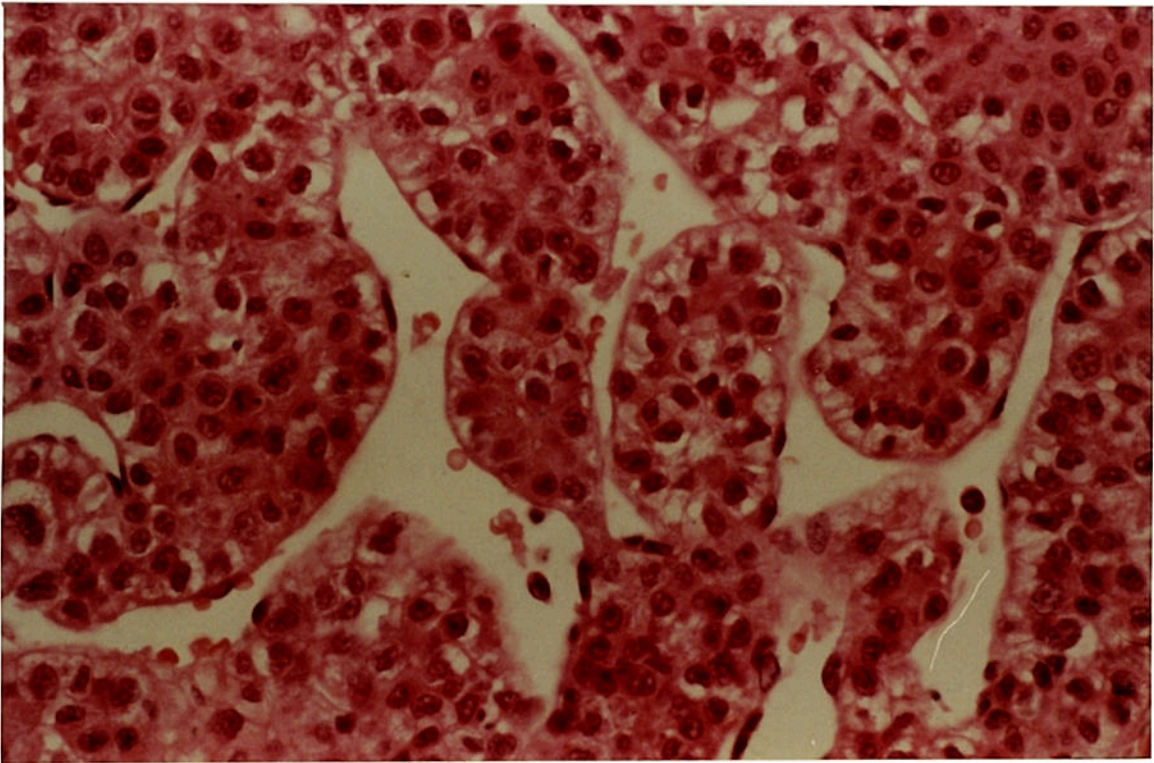
(aumento de 200 x).



Lâmina 4

Fígado com CHP e imuno-reação positiva para o HBeAg de  
localização citoplasmática e nuclear  
(aumento de 200 x).

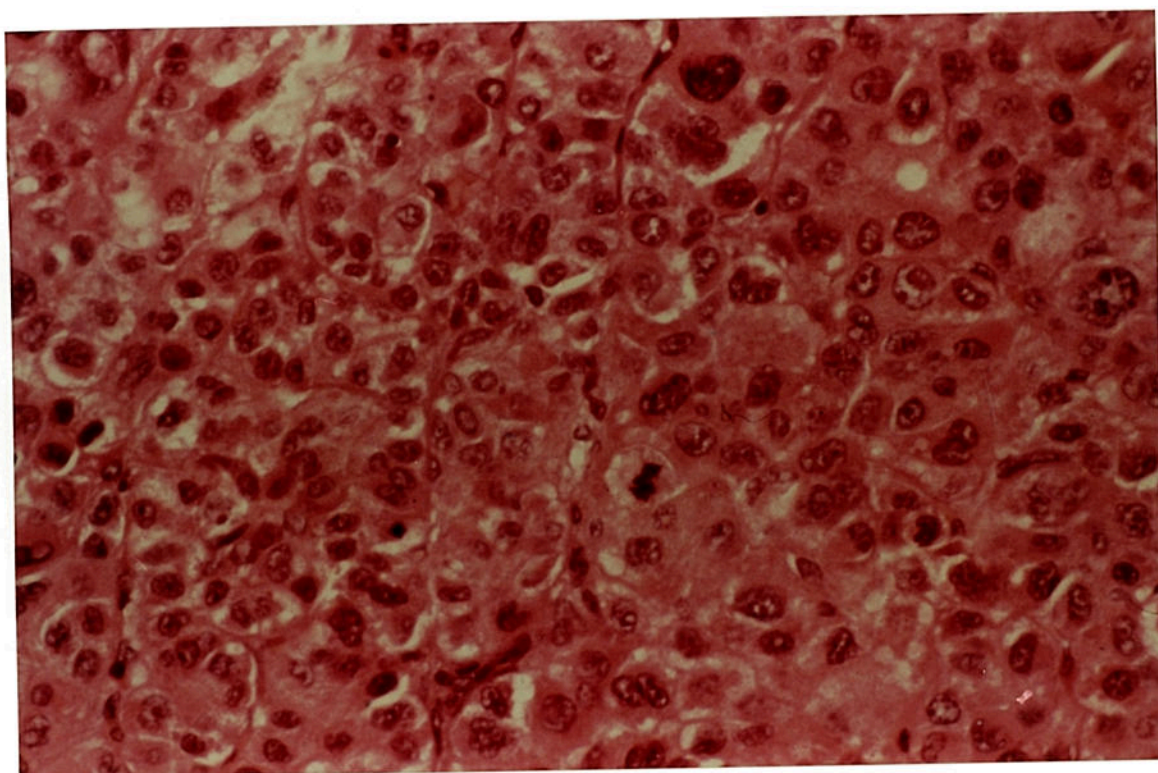




Lâmina 5

Fígado com CHP demonstrando o aspecto trabecular delimitado por sinusóides, com disposição irregular, espessura de várias células e raro estroma

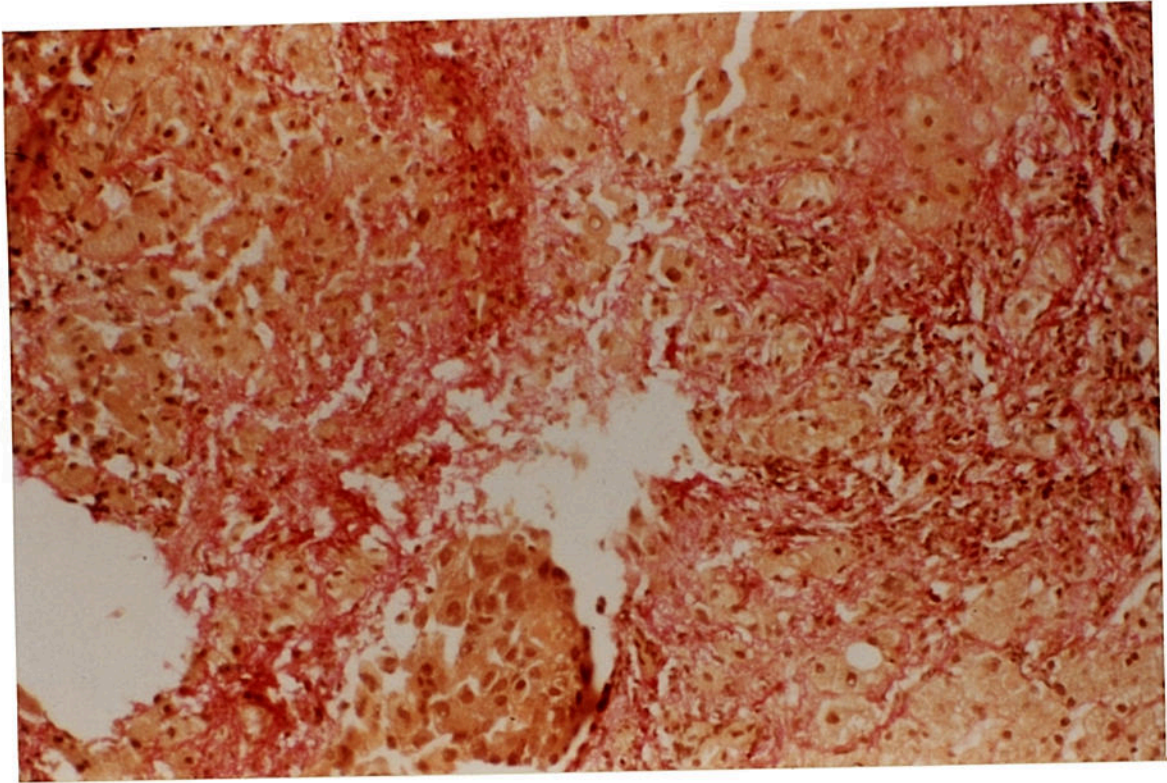
(HE - aumento de 100 x).



Lâmina 6

Fígado com CHP denominando atipias celulares (hipercromasia nuclear, aumento da relação núcleo/citoplasma) e maior atividade mitótica

(HE - aumento de 200 x).



Lâmina 7

Fígado com CHP e cirrose associada identificada pela presença de  
nódulos de regeneração e fibrose  
(Van Gieson - aumento de 100 x).

8 - RESUMO

## 8 - RESUMO

Com o objetivo de avaliar a frequência do carcinoma hepatocelular primário (CHP) em nosso meio e sua associação com a infecção pelo vírus B da hepatite (VBH), foram revisadas 1000 biopsias hepáticas consecutivas, realizadas na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA) no período de julho/81 a dezembro/88. O material obtido foi submetido ao método da imuno-peroxidase (técnica do complexo avidina-biotina) no sentido de identificar retrospectivamente a presença e a localização do antígeno de superfície do VBH (HBsAg) e do "core" do VBH (HBcAg). Foram igualmente revisados os prontuários de internação quanto aos aspectos epidemiológicos (sexo, idade e cor), clínicos (tipo e duração do quadro clínico, fatores de risco associados e evolução clínica) e laboratoriais (exame bioquímico do fígado). A análise dos resultados mostrou uma frequência de CHP da ordem de 11 casos nas 1000 biopsias (1,1%). Destes, 8 eram do sexo masculino (73%), sendo a idade média de 50,2 anos. Nove pacientes (82%) eram de cor branca. Quanto ao quadro clínico, em 7 casos (64%) foi sugestivo de neoplasia

(massa palpável no abdome superior) e em 4 casos (36%) foi sugestivo de cirrose (icterícia, ascite, esplenomegalia). A média de duração dos sintomas até o diagnóstico foi de 7,5 meses. Em relação aos fatores de risco associados, 55% dos pacientes eram alcoolistas, 73% tabagistas e 45% tinham diagnóstico histológico de cirrose. Dois casos (18%) evoluíram para óbito durante a internação. Quanto aos aspectos laboratoriais, 73% dos pacientes apresentaram hiperbilirrubinemia, 91% alteração de pelo menos uma das transaminases (com índice TGO/TGP superior a 1 em 64% dos casos) e 45% apresentaram fosfatase alcalina acima de 3 vezes o normal. A reação imuno-histoquímica mostrou 7 casos positivos para o VBH (64%), sendo 5 positivos para o HBcAg (71%) e 2 para o HBsAg (29%). A correlação entre os achados imuno-histoquímicos e os aspectos epidemiológicos clínicos e laboratoriais não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Concluiu-se que a frequência de CHP na ISCMPA é semelhante àquela descrita nos locais considerados de baixa incidência. O VBH parece ser o principal fator etiológico, em geral associado ao alcoolismo, tabagismo e cirrose. Não parece haver diferença nos diversos aspectos estudados em relação à presença ou ausência do VBH no tecido hepático.

9 - A B S T R A C T

## 9 - ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the frequency of primary hepatocellular carcinoma (PHC) and its association with the hepatitis B virus (HBV) infection at Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre hospital (ISCMPA). A total of 1000 liver biopsies were reviewed at ISCMPA in the period of July/81 to December/88. The material obtained was submitted to an imunoperoxidase method (Avidin-Biotin complex technique) in order to identify retrospectively the presence and localization of the HBV surface antigen (HBsAg) and core antigen (HBcAg). In addition, patients' records were also reviewed to disclose data related to epidemiological aspects (sex, age, race), clinical aspects (type and duration of clinical picture, associated risk factors and clinical evolution) and laboratorial aspects (liver tests). The results showed the frequency of CHP cases to be 11 out of 1000 biopsies (1,1%). Eight of these patients were males (73%), 50,2 years old in average. Nine (82%) were caucasians. The clinical picture suggested a neoplasia (palpable mass in the abdomen) in 7 cases (64%), and suggested cirrhosis (jaundice,



ascites, esplenomegaly) in the other 4 cases (36%). The average duration of symptoms until diagnosis was 7,5 months. Among the associated risk factors, 55% of the patients were alcoholic, 73% smokers and 45% had an histological diagnosis of cirrhosis. Two patients (18%) died during their hospitalization. According to the laboratorial data, 73% of the cases showed hyperbilirrubinemia, 91% an elevation of at least one of the transaminases (with a TGO/TGP index above 1 in 64% of the cases) and 45% had an alkaline phosphatase 3 times above normal value. The imunohistochemical reaction was positive for the HBV in 7 of the 11 cases (64%). Among these, 5 were HBcAg-positive (71%) and 2 HBsAg-positive (29%). The correlation of the imunohistochemical findings with the epidemiological, clinical and laboratorial data did not show any statistical significance in both groups. It was concluded that the frequency of PHC at ISCMPA is similar to the ones described in places classified as of low-incidence. The HBV seems to be the principal etiological factor, associated in general to alcoholism, smoking and cirrhosis. The presence or absence of the HBV tissue markers did not seem to influence the various aspects studied.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 1 0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 001 - AFROUDAKIS, A.P.; ASHCAVAI, M.; PETERS, R.L.; TONG, M.J. The immunohistochemical detection of HBsAg in liver tissue of serologically HBsAg-negative patients. Am. J. Clin. Pathol., 66:461-2, 1976.
- 002 - AFROUDAKIS, A.P.; LIEW, C.T.; PETERS, R.L. An immunoperoxidase technic for the demonstration of the hepatitis B surface antigen in human livers. Am. J. Clin. Pathol., 65: 533-9, 1976.
- 003 - AHMED, M.N.; HUANG, S.; SPENCE, L. Australia antigen and hepatitis: an electron microscopic study. Arch. Pathol., 92: 66-72, 1971.
- 004 - AJOUKIEWICZ, A.; CROWDEN, A.; HUDSON, E.; PYNE, C. Liver aspiration in the diagnosis of hepatocellular carcinoma in the Gambia. J. Clin. Pathol., 38: 185-92, 1985.
- 005 - AKAGI, G.; FURUYA, K.; KANAMURA, A.; CHIHARA, T.; OTSUKA, H. Liver cell dysplasia and hepatitis B surface antigen in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Cancer, 54: 315-8, 1984.
- 006 - AKAGI, G.; FURUYA, K.; OTSUKA, H. Hepatitis B antigen in the liver in hepatocellular carcinoma in Shikoku, Japan. Cancer, 49: 678-82, 1982.
- 007 - AKEYAMA, T.; KAMADA, T.; KOYAMA, M.; ABE, H. Distribution patterns of hepatitis B antigen in the liver: immunofluorescence studies. Arch. Pathol., 98: 252-6, 1974.
- 008 - AL ADNANI, M.S. & ALI, S.M. Patterns of chronic liver disease in Kuwait with special reference to localization of hepatitis B surface antigen. J. Clin. Pathol., 37: 549-54, 1984.

- 009 - ALMEIDA, J.D.; RUBINSTEIN, D.; STOTT, E.J. New antigen-antibody system in Australia-antigen positive hepatitis. Lancet, 2: 1225-7, 1971.
- 010 - ALPERT, M.E.; HUTT, M.S.R.; DAVIDSON, C.S. Primary hepatoma in Uganda: a prospective clinical and epidemiologic study of forty-six patients. Am. J. Med., 46: 794-802, 1969.
- 011 - ALPERT, M.E.; HUTT, M.S.R.; WOGAN, G.N.; DAVIDSON, C.S. Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. Cancer, 28: 253-60, 1971.
- 012 - AL-SARRAF, M.; KITHLER, K.; VAITKEVICIUS, V.K. Primary liver cancer: a review of the clinical features, blood groups, serum enzymes, therapy, and survival of 65 cases. Cancer, 33: 574-82, 1974.
- 013 - ANTHONY, P.P. Primary carcinoma of the liver: a study of 282 cases in Ugandan Africans. J. Pathol., 110: 37-48, 1973.
- 014 - ANTHONY, P.P. Tumours and tumour-like lesions of the liver and biliary tract. In: MAC SWEEN, R.N.M.; ANTHONY, P.P.; SCHEUER, P.J. Pathology of the liver, 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1987. p. 574-645.
- 015 - ANTHONY, P.P.; ISHAK, K.G.; NAYAK, N.C.; POULSEN, H.E.; SCHEUER, P.J.; SOBIN, L.H. The morphology of cirrhosis. J. Clin. Pathol., 31: 395-414, 1978.
- 016 - ANTHONY, P.P.; VOGEL, C.L.; SADIKALI, F.; BARKER, L.F.; PETERSON, M.R. Hepatitis-associated antigen and antibody in Uganda: correlation of serological testing with histopathology. Brit. Med. J., 1: 403-6, 1972.
- 017 - ARIMA, M. Epidemiology of liver cancer. Jpn. J. Clin. Med., 26: 1833-8, 1968.
- 018 - ARNOLD, W.; NIELSEN, J.O.; HARDT, F.; MEYER-ZUM-BUSCHEN-FELDE, K.H. Localization of e-antigen in nuclei of hepatocytes in HBsAg-positive liver diseases. Gut, 19: 994-6, 1977.
- 019 - ARRUDA, B.K.G. Cancer incidence in Recife, Brazil. In: WATERHOUSE, J. Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publication. Lyon, 1976. p. 124-7 (v. III).
- 020 - ATTERBURY, C.; ENRIQUEZ, R.E.; DESUTONAGY, G.I.; CONN, H.O. Comparison of the histologic and cytologic diagnosis

- of liver biopsies in hepatic cancer. Gastroenterology, 76: 1352-7, 1979.
- 021 - BARTÓK, I.; REMENÁR, É.; TÓTH, J.; DUSCHANEK, P.; KANYÁR, B. Clinicopathological studies of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in a general hospital. Hum. Pathol., 12: 794-803, 1981.
- 022 - BASSENDINE, M.F.; ARBORGH, B.A.M.; SHIPTON, U.; MONJARDINO, J.; ARANGUIBEL, F.; THOMAS, H.C.; SHERLOCK, S. Hepatitis B surface antigen and alpha-fetoprotein secreting human primary liver cell cancer in athymic mice. Gastroenterology, 79: 528-32, 1980.
- 023 - BAYER, M.E.; BLUMBERG, B.S.; WERNER, B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis. Nature, 218: 1057-9, 1968.
- 024 - BEASLEY, R.P. Hepatitis B virus: the major etiology of hepatocellular carcinoma. Cancer, 61: 1942-56, 1988.
- 025 - BEASLEY, R.P.; LIN, C.C.; HWANG, L.Y.; CHIEN, C.S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. Lancet, 2: 1129-33, 1981.
- 026 - BECKER, D.J.; STERNBERG, M.S.; KALSER, M.H. Hepatoma associated with hypoglycemia, polycythemia and hypercalcemia. J.A.M.A., 186: 1018-9, 1963.
- 027 - BECKER, F.F. Hepatoma - nature's model tumor: a review. Am. J. Pathol., 74: 179-210, 1974.
- 028 - BELL, H. Alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in patients with primary liver carcinoma, metastatic liver disease and alcoholic liver disease. Scand. J. Gastroent., 17: 897-903, 1982.
- 029 - BELL, W.; BAHR, R.; WALDMANN, T.A.; CARBONE, P.P. Cryofibrinogenemia, multiple dysproteinemias, and hypervolemia in a patient with a primary hepatoma. Ann. Intern. Med., 64: 658-64, 1966.
- 030 - BENNER, E.J. & LABBY, D.H. Hepatoma: clinical experiences with a frequently bizarre tumor. Ann. Intern. Med., 54: 620-35, 1961.
- 031 - BERMAN, C. Primary carcinoma of the liver. London, H. K. Lewis Co., Ltd., 1951.

- 032 - BERMAN, M.M.; LIBBEY, N.P.; FOSTER, J.H. Hepatocellular carcinoma: polygonal cell type with fibrous stroma - an atypical variant with a favorable prognosis. Cancer, 46: 1448-55, 1980.
- 033 - BERRY, C.L. Solitary "necrotic nodule" of the liver: a probable pathogenesis. J. Clin. Pathol., 38: 1278-80, 1985.
- 034 - BIANCHI, G. & MARCHESINI, G. Carbohydrate metabolism in hepatocellular carcinoma: where does the glucose go? Hepatology, 10: 253-5, 1989.
- 035 - BIER, O. Bacteriologia e imunologia. 20<sup>th</sup> ed. São Paulo, Melhoramentos, 1980.
- 036 - BISHOP, J.M. The molecular genetics of cancer. Science, 235: 305-11, 1987.
- 037 - BLATCHFORD JR., F.W. Primary carcinoma of the liver: a critical analysis of sixteen cases. Gastroenterology, 21: 238-44, 1952.
- 038 - BLENKINSOPP, W.K. & HAFFENDEN, G.P. Aetiology of cirrhosis, hepatic fibrosis, and hepatocellular carcinoma. J. Clin. Pathol., 30: 579-84, 1977.
- 039 - BLUM, H.E.; HAASE, A.T.; VYAS, G.N. Molecular pathogenesis of hepatitis B virus infection: simultaneous detection of viral DNA and antigens in paraffin-embedded liver sections. Lancet, 2: 771-4, 1984.
- 040 - BLUMBERG, B.S. Viruses similar to hepatitis B virus (icrons). Hum. Pathol., 12: 1107-13, 1981.
- 041 - BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J.; VISNICH, S. A "new" antigen in leukemia sera. J.A.M.A., 191: 101-6, 1965.
- 042 - BLUMBERG, B.S.; GERSTLEY, B.J.S.; HUNGERFORD, D.A.; LONDON, W.T.; STUTNICK, A.I. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. Ann. Intern. Med., 66: 923-31, 1967.
- 043 - BLUMBERG, B.S.; LAROUZÉ, B.; LONDON, W.T.; WERNER, B.; HESSER, J.E.; MILLMAN, I.; SAIMOT, G.; PAYET, M. The relation of infection with the hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma. Am. J. Pathol., 81: 669-82, 1975.

- 044 - BLUMBERG, B.S. & LONDON, W.T. Hepatitis B virus and the prevention of primary hepatocellular carcinoma. N. Engl. J. Med., 304: 782-4, 1981.
- 045 - BLUMBERG, B.S.; LONDON, W.T. Hepatitis B virus: pathogenesis and prevention of primary cancer of the liver. Cancer, 50: 2657-65, 1982.
- 046 - BRÉCHOT, C.; DEGOS, F.; LUGASSY, C.; THIERS, V.; ZAFRANI, S.; FRANCO, O.; BISMUTH, H.; TRÉPO, C.; BENHAMOU, J.P.; WANDS, J.; ISSELBACHER, K.; TIOLLAIS, P.; BERTHELOT, P. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. N. Engl. J. Med., 312: 270-6, 1985.
- 047 - BRÉCHOT, C.; HADCHOVEL, M.; SCOTTO, J.; DEGOS, F.; CHAR-NAY, P.; TREPO, C.; TIOLLAIS, P. Detection of hepatitis B virus DNA in liver and serum: a direct appraisal of the chronic carrier state. Lancet, 2: 765-8, 1981.
- 048 - BRÉCHOT, C.; NALPAS, B.; COUROUCÉ, A.M.; DUHAMEL, G.; CALLARO, P.; CARNOT, F.; TIOLLAIS, P.; BERTHELOT, P. Evidence that hepatitis B virus has a role in liver-cell carcinoma in alcoholic liver disease. N. Engl. J. Med., 306: 1384-7, 1982.
- 049 - BRÉCHOT, C.; POURCEL, C.; LOUISE, A.; RAIN, B.; TIOLLAIS, P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. Nature, 286: 533-5, 1980.
- 050 - BROWNSTEIN, M.H. & BALLARD, H.S. Hepatoma associated with erythrocytosis: report of eleven new cases. Am. J. Med., 40: 204-10, 1966.
- 051 - BURNS, J. Background staining and sensitivity of the unlabeled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. Histochemistry, 43: 291-4, 1975.
- 052 - CALEGARO, J.U.M.; CARRILHO, F.J.; MUARREK, F.J.; ZEITUNE, J.M.R.; SPIRONELLI, R.; PASSOS, E.M. Mortalidade por hepatocarcinoma em Londrina, PR. F. Med. (BR), 81: 393-5, 1980.
- 053 - CAMERON, G.F. Primary carcinoma of the liver: a review of eighteen autopsied cases. Gastroenterology, 27: 161-5, 1954.

- 054 - CARRILHO, F.J., BALDY, J.L.S., TAKATA, P.K., ADUM, S., ZEITUNE, J.M.R. Prevalência e estudo de portadores do antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs) em Londrina, Paraná. GED, 3: 13-20, 1984.
- 055 - CHAINUVATI, T., VIRANUVATTI, V., PONGPIPAT, D. Relationship of hepatitis B antigen in cirrhosis and hepatoma in Thailand: an etiological significance. Gastroenterology, 68: 1261-4, 1975.
- 056 - CHAN, C.H. Primary carcinoma of the liver. Med. Clin. N. Am., 59: 989-94, 1975.
- 057 - CHEN, D.S., SHEU, J.C., SUNG, J.L., LAI, M.Y., LEE, C.S., SU, C.T., TSANG, Y.M., HOW, S.W., WANG, T.H., YU, J.Y., YANG, T.H., WANG, C.Y., HSU, C.Y. Small hepatocellular carcinoma - a clinicopathological study in thirteen patients. Gastroenterology, 83: 1109-19, 1982.
- 058 - CHEN, D.S. & SUNG, J.L. Serum alphaprotein in hepatocellular carcinoma. Cancer, 40: 779-83, 1977.
- 059 - CHEN, M.L., GERBER, M.A., THUNG, S.N., THORNTON, J.C., CHUNG, W.K. Morphometric study of hepatocytes containing hepatitis B surface antigen. Am. J. Pathol., 114: 217-221, 1984.
- 060 - CHEN, P.J., CHEN, D.S., LAI, M.Y., CHANG, M.H., HUANG, G.T., YANG, P.M., SHEU, J.C., LEE, S.C., HSU, H.C., SUNG, J.L. Clonal origin of recurrent hepatocellular carcinomas. Gastroenterology, 96: 527-9, 1989.
- 061 - CHRISTOPHERSON, W.M., MAYS, E.T., BARROWS, G. Hepatocellular carcinoma in young women on oral contraceptives. Lancet, 2: 38-9, 1978.
- 062 - COHEN, C. & BERSON, S.D. Liver cell dysplasia in normal, cirrhotic, and hepatocellular carcinoma patients. Cancer, 57: 1535-8, 1986.
- 063 - COHEN, C., BERSON, S.D., GEDDES, E.W. Hepatitis B antigen in black patients with hepatocellular carcinoma: correlation between orcein stained liver section and serology. Cancer, 41: 245-9, 1978.
- 064 - COHEN, C., BERSON, S.D., GEDDES, E.W. Liver cell dysplasia: association with hepatocellular carcinoma, cirrhosis and hepatitis B antigen carrier status. Cancer, 44: 1671-6, 1979.



- 065 - COLEMAN, J.A.; HAINES, R.D.; PHILLIPS, C. Primary carcinoma of the liver. Gastroenterology, 27: 166-77, 1954.
- 066 - CONN, H.D. Rational use of liver biopsy in the diagnosis of hepatic cancer. Gastroenterology, 62: 142-6, 1972.
- 067 - COONS, A.H.; CREECH, H.J.; JONES, R.N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol., 47: 200-2, 1941.
- 068 - COTTONE, M.; VIRDONE, R.; FUSCO, G.; ORLANDO, A.; TURRI, M.; CALTAGIRONE, M.; MARINGHINI, A.; SCIARRINO, E.; DEMMA, I.; NICOLI, N.; TINE, F.; SAMMARCO, S.; PAGLIARO, L. Asymptomatic hepatocellular carcinoma in child's A cirrhosis. Gastroenterology, 96: 1566-71, 1989.
- 069 - COUTINHO, L.M.B. Adenomas de hipófise: estudo imunohistoquímico. Porto Alegre, 1988. 195 p. (Tese de doutorado - Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- 070 - COYNE, V.E.; MILLMAN, L.; CERDA, J.; GERSTLEY, B.J.S.; LONDON, T.; SUTNICK, A.; BLUMBERG, B.S. The localization of Australia antigen by immunofluorescence. J. Exp. Med., 133: 307-19, 1970.
- 071 - CURUTCHET, H.P.; TERZ, J.J.; KAY, S.; LAWRENCE JR., W. Primary liver cancer. Surgery, 70: 467-79, 1971.
- 072 - DANE, D.S.; CAMERON, C.H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet, 1: 695:8, 1970.
- 073 - D'AQUINO, M.; MICHIELETTI, L.; CARIOGLIO, L.; WOLF, P. Fine needle liver biopsy of hepatocellular carcinoma: is sampling simple? Gastroenterology, 97: 247-8, 1989.
- 074 - DENISON, E.K.; PETERS, R.L.; REYNOLDS, T.B. Familial hepatoma with hepatitis-associated antigen. Ann. Intern. Med., 74: 391-4, 1971.
- 075 - DEORAS, M.P. & DICUS, W. Hepatocarcinoma associated with cirrhosis: a case due to congenital bile duct atresia. Arch. Pathol., 86: 338-44, 1968.
- 076 - DESAI, H.N. Clinical aspects of hepatocellular carcinoma in man. S. Afr. Med. J., 50: 1611-3, 1976.
- 077 - DOLL, R.; MUIR, C.; WATERHOUSE, J. Cancer incidence in Five continents. Ed. Springer-Verlag. Berlin, 1970. (Unio Internationalis Contra Cancrum, v. II).

- 078 - EBARA, M.; OHTO, M.; SHINAGAWA, T.; SUGIURA, N.; KIMURA, K.; MATSUTANI, S.; MORITA, M.; SAISHO, H.; TSUCHIYA, Y.; OKUDA, K. Natural history of minute hepatocellular carcinoma smaller than three centimeters complicating cirrhosis. A study in 22 patients. Gastroenterology, 90: 289-98, 1986.
- 079 - EDGINGTON, T.S. & RITT, D.J. Intrahepatic expression of serum hepatitis virus-associated antigens. J. Exp. Med., 134: 871-85, 1971.
- 080 - EDITORIAL. Geography of primary liver cancer. Brit. Med. J., 1: 381-2, 1970.
- 081 - EDITORIAL. Link between hepatoma and hepatitis B. Brit. Med. J., 2: 718-9, 1978.
- 082 - EDITORIAL. Human virus and hepatic cancer. Lancet, 2: 1394-5, 1981.
- 083 - EDMAN, J.C.; GRAY, P.; VALENZUELA, P.; RALL, L.B.; RUTTER, W.J. Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. Nature, 286: 535-7, 1980.
- 084 - EDMONSON, H.A. & CRAIG, J.R. Neoplasms of the liver. In: SCHIFF, L.; SCHIFF, E.R. Diseases of the liver. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, J.B. Lippincott Co., 1987. p. 1109-58.
- 085 - EDMONSON, H.A. & STEINER, P.E. Primary carcinoma of the liver. Cancer, 7: 462-503, 1954.
- 086 - EL-DOMEIRI; HUVDS, A.G.; GOLDSMITH, H.S.; FOOTE, F.W. Primary malignant tumours of the liver. Cancer, 27: 7-11, 1971.
- 087 - FARBER, E.; SOLT, D.; CAMERON, R.; LAISHES, B.; OGAWA, K.; MEDLINE, A. Newer insights into the pathogenesis of liver cancer. Am. J. Pathol., 89: 477-82, 1977.
- 088 - FAUSTO, N. & SHANK, P.R. Oncogene expression in liver regeneration and hepatocarcinogenesis. Hepatology, 3: 1016-23, 1983.
- 089 - FENOGLIO, C.M. & LEFKOWITCH, J.H. Viruses and cancer. Med. Clin. N. Am., 67: 1105-27, 1983.
- 090 - FERRAZ, M.L.G.; LANZONI, V.P.; SILVA, A.E.B.; ALBERTI, V.N.; PEREIRA, C.A.; CHIFERI JR, V.; GUIMARÃES, R.X. Relação entre marcadores do vírus da hepatite B (VBH) no

soro e no tecido hepático em pacientes portadores crônicos do HBsAg. Revista da A.M.B., 35: 63-6, 1989.

- 091 - FLECK, J.F.; ROTH, B.J.; SLEDGE JR., G.W. Growth factors and differentiation - a new concept in the evaluation of germ cell tumor biological behavior. Revista HCPA, 9: 105-18, 1989.
- 092 - FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. Epidemiologia clínica. Porto Alegre, Ed. Artes Médicas, 1989.
- 093 - FOLI, A.K.; SHERLOCK, S.; ADINOLFI, M. Serum alpha 1 - fetoprotein in patients with liver disease. Lancet, 2: 1267-9, 1969.
- 094 - FRIED, W. The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. Blood, 40: 671-7, 1972.
- 095 - FRIEND, S.H.; DRYJA, T.P.; WEINBERG, R.A. Oncogenes and tumor - suppressing genes. N. Engl. J. Med., 318: 618-22, 1988.
- 096 - FURUYA, K.; NAKAMURA, M.; YAMAMOTO, Y.; TOGEI, K.; OTSUKA, H. Macroregenerative nodule of the liver: a clinico-pathologic study of 345 autopsy cases of chronic liver disease. Cancer, 61: 99-105, 1988.
- 097 - GALIZZI FILHO, J.; ANDRADE, M.O.; FARIA, O.; CABRAL, G.L.; ANDRADE FILHO, J.S.; NOGUEIRA, A.M.M.F.; BAMBIRRA, E. Carcinoma hepatocelular. In: Congresso Brasileiro de Gastroenterologia, 28., São Paulo, 1982. Temas livres.
- 098 - GALLUZI, N.J.; WEINGARTEN, W.; REGAN, F.D.; DOERNER, A.A. Evaluation of hepatic tests and clinical findings in primary hepatic cancer. J.A.M.A., 152: 15-6, 1953.
- 099 - GAYOTTO, L.C.C. Epidemiologia das hepatites. Moderna Hepatologia, (número especial) 9-15, 1987.
- 100 - GAYOTTO, L.C.C.; GOWDAK, L.H.W.; TOREZAN, L.A.R.; VIANNA, M.R. Needle liver biopsy: relationship between sampling and degree of conclusiveness of the histopathological diagnoses. GED, 8: 83-5, 1989.
- 101 - GEDDES, E.W. & FALKSON, G. Malignant hepatoma in the Bantu. Cancer, 25: 1271-8, 1970.
- 102 - GERBER, M.A.; HADZIYANNIS, S.; VISSOULIS, C.; SCHAFFNER, F.; PARONETTO, F.; POPPER, H. Electron microscopy and immunoelectronmicroscopy of cytoplasmic hepatitis B

- antigen in hepatocytes. Am. J. Pathol., 75: 489-502, 1974.
- 103 - GERBER, M.A.; HADZIYANNIS, S.; VISSOULIS, C.; SCHAFFNER, F.; POPPER, H. Immunofluorescence and electron microscopic studies of hepatitis B antigen (HBsAg) in liver tissue. Gastroenterology, 64: 732, 1972.
- 104 - GERBER, M.A. & THUNG, S.N. Enzyme patterns in human hepatocellular carcinoma. Am. J. Pathol., 98: 395-400, 1980.
- 105 - GERBER, M.A. & THUNG, S.N. The pre-s2 region of hepatitis B virus: more questions than answers. Hepatology, 9: 328-30, 1989.
- 106 - GONÇALVES, C.S. & PEREIRA, F.E.L. Estudo comparativo de carcinomas hepatocelulares HBsAg positivos e negativos diagnosticados no Estado do Espírito Santo. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo, 38: 126-9, 1983.
- 107 - GONÇALVES, C.S. & PEREIRA, F.E.L. Carcinoma hepatocelular: evidências de relação com o vírus B da hepatite e com outros fatores etiológicos. GED, 4: 5-14, 1985.
- 108 - GOODMAN, Z.D.; ISHAK, K.G.; LANGLOSS, J.M.; SESTERHENN, I.A.; RABIN, L. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: a histological and immunohistochemical study. Cancer, 55: 124-35, 1985.
- 109 - GORDON, A.S.; ZANJANI, E.D.; ZALUSKY, R. A possible mechanism for the erythrocytosis associated with hepatocellular carcinoma in man. Blood, 35: 151-7, 1970.
- 110 - GOTTFRIED, E.B.; STELLER, R.; PARONETTO, F.; LIEBER, C.S. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 82: 770-4, 1982.
- 111 - GOWANS, E.J. & BURRELL, C.J. Widespread presence of cytoplasmic HBcAg in hepatitis B infected liver detected by improved immunochemical methods. J. Clin. Pathol., 38: 393-8, 1985.
- 112 - GREENE, L.S. & SCHIFF, L. Primary carcinoma of liver: plea for earlier diagnosis with emphasis on serum alkaline phosphatase values. Gastroenterology, 40: 219-23, 1961.
- 113 - GUDAT, F. & BINCHI, L. Evidence for phasic sequences in nuclear HBcAg formation and cell membrane-directed flow of core particles in chronic hepatitis B. Gastroenterology, 73: 1194-7, 1977.

- 114 - GUSTAFSON, E.G. An analysis of 62 cases of primary carcinoma of the liver based on 24,400 necropsies at Bellevue Hospital. Ann. Intern. Med., 11: 889-900, 1937.
- 115 - HADZIYANNIS, S.J. Hepatocellular carcinoma and type B hepatitis. Clin. Gastroenter., 9: 117-34, 1980.
- 116 - HADZIYANNIS, S.; MOUSSOUROS, A.; VISSOULIS, C.; AFROUDAKIS, A. Cytoplasmic localization of Australia antigen in the liver. Lancet, 1: 976-9, 1972.
- 117 - HAMLYN, P. & SIKORA, K. Oncogenes. Lancet, 2: 326-30, 1983.
- 118 - HENLE, W. Evidence for a relation of the Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. In: NAKAHARA, W. Recent advances in human tumour virology and immunology. University of Tokyo Press, 1971. p. 361.
- 119 - HESS, G.; NIELSEN, J.O.; ARNOLD, W.; MEYER-ZUM-BÜSCHENFELDE, K.H. e-system and intrahepatocellular HBcAg and HBsAg in HBsAg positive patients with liver diseases and healthy carriers. Scand. J. Gastroenter., 12: 325-30, 1977.
- 120 - HEYWARD, W.L.; BENDER, T.R.; LANIER, A.P.; FRANCIS, D.P.; McMAHON, B.J.; MAYNARD, J.E. Serological markers of hepatitis B virus and alpha-fetoprotein levels preceding primary hepatocellular carcinoma in Alaskan eskimos. Lancet, 2: 889-91, 1982.
- 121 - HEYWARD, W.L.; LANIER, A.P.; McMAHON, B.J. Early detection of primary hepatocellular carcinoma. J.A.M.A., 254: 3052-4, 1985.
- 122 - HIRSCHMAN, S.Z. Unclassified viruses: hepatitis viruses. In: BRAUDE, A.I.; DAVIS, C.E.; FLERER, J. Microbiology. Philadelphia, W.B. Sanders Co., 1982. p. 627-34.
- 123 - HORIE, Y.; KATOH, S.; YOSHIRA, H.; IMAOKA, T.; SUOU, T.; HIRAYAMA, C. Pedunculated hepatocellular carcinoma: report of three cases and review of the literature. Cancer, 51: 746-51, 1983.
- 124 - HOYNE, R.M. & KERNOHAN, J.W. Primary carcinoma of the liver: a study of thirty-one cases. Arch. Intern. Med., 79: 532-54, 1947.
- 125 - HSU, H.C.; LAI, M.Y.; SU, I.J.; CHEN, D.S.; CHANG, M.H.; YANG, P.M.; WU, C.Y.; HSIEH, H.C. Correlation of

hepatocyte HBsAg expression with virus replication and liver pathology. Hepatology, 8: 749-54, 1988.

- 126 - HSU, H.C.; LIN, W.S.J.; TSAI, M.J. Hepatitis B surface antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan: with special reference to types and localization of HBsAg in the tumor cells. Cancer, 52: 1825-32, 1983.
- 127 - HSU, H.C.; SHEU, J.C.; LIN, Y.H.; CHEN, D.S.; LEE, C.S.; HWANG, L.Y.; BEASLEY, R.P. Prognostic histologic features of resected small hepatocellular carcinoma (HCC) in Taiwan: a comparison with resected large HCC. Cancer, 56: 672-80, 1985.
- 128 - HSU, H.C.; WU, T.T.; SHEU, J.C.; WU, C.Y.; CHIOU, T.J.; LEE, C.S.; CHEN, D.S. Biologic significance of the detection of HBsAg and HBcAg in liver and tumor from 204 HBsAg-positive patients with primary hepatocellular carcinoma. Hepatology, 9: 747-50, 1989.
- 129 - HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. Am. J. Clin. Pathol., 75: 734-8, 1981.
- 130 - HSU, S.M. & REE, H.J. Self sandwich method: an improved immunoperoxidase technic for the detection of small amounts of antigen. Am. J. Clin. Pathol., 74: 32-40, 1980.
- 131 - HUANG, S.N. Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. Lab. Invest., 33: 88-95, 1975.
- 132 - HUANG, S.N.; GROH, V.; BEAUDDIN, J.G.; DAUPHINEE, W.D.; GUTTMANN, R.D.; MOREHOUSE, D.D.; ARONOFF, A.; GAULT, H. A study of the relationship of virus-like particles and Australia antigen in liver. Hum. Pathol., 5: 209-22, 1974.
- 133 - HUANG, S.N. & NEVRATH, A.R. Immunohistologic demonstration of hepatitis B viral antigens in liver with reference to its significance in liver injury. Lab. Invest., 40: 1-17, 1979.
- 134 - HUEBNER, R.J. & TODARO, G.J. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 64: 1087-94, 1969.

- 135 - HUNT, D.D. Primary liver-cell carcinoma with a protracted clinical course-report of a case. J.A.M.A., 184: 160-2, 1963.
- 136 - IHDE, D.C.; SHERLOCK, P.; WINAWER, S.J.; FORTNER, J.E. Clinical manifestation of hepatoma. A review of a 6 year-experience at a cancer hospital. Am. J. Med., 56: 83-91, 1974.
- 137 - ILARDI, C.F.; YING, Y.Y.; ACKERMAN, L.V.; ELIAS, J.M. Hepatitis B surface antigen and hepatocellular carcinoma in the People's Republic of China. Cancer, 46: 1612-6, 1980.
- 138 - ISAACSON, C.; PATERSON, A.C.; BERSON, S.D. Hepatitis B surface antigens and hepatocellular carcinoma in Southern Africa. Virchows Arch. Path. Anat. and Histol., 385: 61-6, 1979.
- 139 - JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. Review of medical microbiology. 15<sup>th</sup> ed. California, Lange Medical Publications, 1982.
- 140 - JOHNSON, P.J. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus markers in Europe and U.S.A. Lancet, 1: 434, 1979 (letter).
- 141 - JOHNSON, P.J.; KRASNER, N.; PORTMANN, B.; EDDLESTON, A.L. W.F.; WILLIAMS, R. Hepatocellular carcinoma in Great Britain: influence of age, sex, HBsAg status, and aetiology of underlying cirrhosis. Gut, 19: 1022-6, 1978.
- 142 - JOHNSON, P.J.; MELIA, W.M.; PALMAR, M.K. Relationship between serum alpha fetoprotein, cirrhosis and survival in hepatocellular carcinoma. Brit. J. Cancer, 44: 502-5, 1981.
- 143 - JORI, G.P. & PESCHILE, C. Combined peritoneoscopy and liver biopsy in the diagnosis of hepatic neoplasm. Gastroenterology, 63: 1016-9, 1972.
- 144 - KAMEDA, H. Study of long survival cases of hepatocellular carcinoma. In: Annual Congress of Japan Hepatol. Soc., 18<sup>th</sup>, Tokyo, 1982. Lecture.
- 145 - KAN, Y.W.; McFADZEAN, A.J.S.; TODD, D.; TSO, S.C. Further observation on polycythemia in hepatocellular carcinoma. Blood, 18: 592-8, 1961.

- 146 - KAY, C.J. Primary hepatic cancer: review of ninety-six cases. Arch. Int. Med., 113: 96-103, 1964.
- 147 - KEEGAN-ROGERS, V. & WU, G.Y. Immunotargeting in the diagnosis and treatment of liver cancer. Hepatology, 9: 646-8, 1989.
- 148 - KELLER, R.T.; GOLDSCHNEIDER, I.; LAFFERTY, F.W. Hypercalcemia secondary to a primary hepatoma. J.A.M.A., 192: 112-4, 1965.
- 149 - KEMENY, F.; VADROT, J.; WU, A.; SMADJA, C.; MEAKINS, J.L.; FRANCO, D. Morphological and histological features of resected hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients in the west. Hepatology, 9: 253-7, 1989.
- 150 - KEW, M.C. Alpha-fetoprotein in primary liver cancer and other diseases. Gut, 15: 814-21, 1974.
- 151 - KEW, M.C. Hepatocellular carcinoma with and without cirrhosis. A comparison in Southern African blacks. Gastroenterology, 97: 136-9, 1989.
- 152 - KEW, M.C.; DIBISCEGLIE, A.M.; PATERSON, A.C. Smoking as a risk factor in hepatocellular carcinoma: a case-control study in Southern African blacks. Cancer, 56: 2315-7, 1985.
- 153 - KEW, M.C.; DOS SANTOS, H.A.; SCHERLOCK, S. Diagnosis of primary cancer of the liver. Brit. Med. J., 4: 408-11, 1971.
- 154 - KEW, M.C.; DUSHEIKO, G.M.; HADZIHANNIS, S.J.; PATTERSON, A. Does delta infection play a part in the pathogenesis of hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma? Brit. Med. J., 288: 1727, 1984.
- 155 - KEW, M.C.; GEAR, A.J.; BAUMGARTEN, I.; DUSHEIKO, G.M.; MAIER, G. Histocompatibility antigens in patients with hepatocellular carcinoma and their relationship to chronic hepatitis B virus infection in these patients. Gastroenterology, 77: 537-9, 1979.
- 156 - KEW, M.C.; GEDDES, E.W.; MacNAB, G.M.; BERSOHN, I. Hepatitis-B antigen cirrhosis in Bantu patients with primary liver cancer. Cancer, 34: 539-41, 1974.
- 157 - KEW, M.C. & MACEROLLO, P. Effect of age on the etiologic role of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma in blacks. Gastroenterology, 94: 439-42, 1988.



- 158 - KEW, M.C.; McKNIGHT, A.; HODKINSON, J.; BUKOFZER, S.; ESSER, J.D. The role of membranous obstruction of the inferior vena cava in the etiology of hepatocellular carcinoma in Southern African blacks. Hepatology, 9: 121-5, 1989.
- 159 - KEW, M.C.; RAY, M.B.; DESMET, V.J.; DESMYTER, J. Hepatitis-B surface antigen in tumour tissue and non-tumorous liver in black patients with hepatocellular carcinoma. Brit. J. Cancer, 41: 399-406, 1980.
- 160 - KEW, M.C.; ROSSOUW, E.; PATERSON, A.; HODKINSON, J.; WHITCUTT, M.; DUSHEIKO, G. Hepatitis B virus status of black women with hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 84: 693-6, 1983.
- 161 - KLEIN, G. The approaching era of the tumor suppressor genes. Science, 238: 1539-45, 1987.
- 162 - KLEIN, H. & KLEIN, S.P. Spontaneous Hypoglycemia associated with massive hepatoma: review of current concepts and report of a case. Arch. Int. Med., 103: 117-22, 1959.
- 163 - KNILL-JONES, R.P.; BUCKLE, R.M.; PARSONS, V.; CALNE, R.Y.; WILLIAMS, R. Hypercalcemia and increased parathyroid-hormone activity in a primary hepatoma. N. Engl. J. Med., 282: 704-8, 1970.
- 164 - KOFF, R.S. & GALAMBOS, J.T. Viral hepatitis. In: SCHIFF, L. & SCHIFF, E.R. Diseases of the liver. 7<sup>th</sup> ed., Philadelphia, J.B. Lippincott Co., 1987. p. 457-581.
- 165 - KOJIMA, M.; UDO, K.; TAKHASHI, Y.; YUOSHIZAWA, H.; TSUDO, F.; ITOH, Y.; MIYASKAWA, Y.; MAYUMI, M. Correlation between titer of antibody to hepatitis B core antigen and presence of viral antigens in the liver. Gastroenterology, 73: 664-7, 1977.
- 166 - KOJIRO, M.; KAWABATA, K.; KAWANO, Y.; SHIRAI, F.; TAKE-MOTO, N.; NAKASHIKMA, T. Hepatocellular carcinoma presenting as intrabiliary duct tumor growth: a clinicopathologic study of 24 cases. Cancer, 49: 2144-7, 1982.
- 167 - KONDO, F.; WADA, K.; NAGATO, Y.; NAKAJIMA, T.; KONDO, Y.; HIROOKA, N.; EBARA, M.; OHTO, M.; OKUDA, K. Biopsy diagnosis of well-differentiated hepatocellular carcinoma based on new morphologic criteria. Hepatology, 9: 751-5, 1989.

- 168 - KORBA, B.E.; WELLS, F.V.; BALDWIN, B.; COTE, P.J.; TENNANT, B.C.; POPPER, H.; GERIN, J.L. Hepatocellular carcinoma in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks: presence of viral DNA in tumor tissue from chronic carriers and animals serologically recovered from acute infections. Hepatology, 9: 461-70, 1989.
- 169 - KRAWCZYNSKI, K.; NAZAREWICZ, T.; BRZOSKO, W.J.; NOWOSLAWSKI, A. Cellular localization of hepatitis-associated antigen in livers of patients with different forms of hepatitis. J. Infect. Dis., 126: 372-7, 1972.
- 170 - KRINGSHOLM, B.; MOLLER, A.M.; PRAETORIUS-CLAUSEN, P.; MATHIESEN, L.R. Methods for localization of hepatitis B surface antigen in liver tissue: an evaluation of different staining and tissue preparation methods. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand., 91: 329-34, 1983.
- 171 - KUBO, Y.; OKUDA, K.; HASHIMOTO, M.; NAGASAKI, Y.; EBATA, H.; NAKAJIMA, Y.; MUSHA, H.; SAKUMA, K.; OHTAKE, H. Antibody to hepatitis B core antigen in patients with hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 72: 1217-20, 1977.
- 172 - KUBO, Y.; OKUDA, K.; MUSHA, H.; NAKASHIMA, T. Detection of hepatocellular carcinoma during a clinical follow-up of chronic liver disease: observations in 31 patients. Gastroenterology, 74: 578-82, 1978.
- 173 - LACK, E.E.; NEAVE, C.; VAWTER, G.F. Hepatocellular carcinoma: review of 32 cases in childhood and adolescence. Cancer, 52: 1510-5, 1983.
- 174 - LAI, C.L.; LAM, K.C.; WONG, K.P.; WU, P.C.; TODD, D. Clinical features of hepatocellular carcinoma: review of 211 patients in Hong Kong. Cancer, 47: 2746-55, 1981.
- 175 - LAI, C.L.; WU, P.C.; LAM, K.C.; TODD, D. Histologic prognostic indicators in hepatocellular carcinoma. Cancer, 44: 1677-83, 1979.
- 176 - LAM, K.C. & YEUNG, R.T.T. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a case study. Cancer, 50: 332-6, 1982.
- 177 - LAM, K.C.; YU, M.C.; LEUNG, J.W.C.; HENDERSON, B.E. Hepatitis B virus and cigarette smoking: risk factors for hepatocellular carcinoma in Hong Kong. Cancer Res., 42: 5246-8, 1982.

- 178 - LAMOTHE, F.; LAURENCIN-PICHÉ, J.; CÔTÉ, J.; GUÉVIN, R.; VIALLET, A.; RICHER, G. Detection of surface and core antigens of hepatitis B virus in the liver of 164 human subjects. Gastroenterology, 71: 102-8, 1976.
- 179 - LANDAU, B.R.; WILLS, N.; CRAIG, J.W.; LEONARDS, J.R.; MORIWAKI, T. The mechanism of hepatoma-induced hypoglycemia. Cancer, 15: 1188-96, 1962.
- 180 - LAROUZE, B.; SAIMOT, G.; LUSTBADER, E.D.; LONDON, W.T.; WERNER, B.G.; PAYES, M.; BLUMBERG, B.S. Host responses to hepatitis B infection in patients with primary hepatic carcinoma and their families: a case/control study in Senegal, West Africa. Lancet, 2: 534-8, 1976.
- 181 - LEBLANC, L.; TUYNS, A.J.; MASSEYEFF, R. Screening for primary liver cancer. Digestion, 8: 8-14, 1973.
- 182 - LEE, F.I. Cirrhosis and hepatoma in alcoholics. Gut, 7: 77-85, 1966.
- 183 - LEE, H.S.; RAJAGOPALAN, M.S.; VYAS, G.N. A lack of direct role of hepatitis B virus in the activation of RAS and c-myc oncogenes in human hepatocellular carcinoma. Hepatology, 8: 1116-20, 1988.
- 184 - LEE, H.S.; SAROSI, I.; VYAS, G.N. Aflatoxin B<sub>1</sub> formamido-pyrimidine adducts in human hepatocarcinogenesis: a preliminary report. Gastroenterology, 97: 1281-7, 1989.
- 185 - LEITE, A.M.P.S. & MENDES, T.F. Vírus B e carcinoma hepatocelular. Moderna Hepatologia, (número especial): 22-3, 1987.
- 186 - LEMMER, K.E. Primary carcinoma of the liver. Arch. Surg., 61: 599-609, 1950.
- 187 - LIAW, Y.F.; TAI, D.I.; CHU, C.M.; LIN, D.Y.; SHEEN, I.S.; CHIEN, T.J.; PAO, C.C. Early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. Gastroenterology, 90: 263-7, 1986.
- 188 - LIEBER, C.S.; SEITZ, H.K.; GARRO, A.J.; WORTNER, T.M. Alcohol-related diseases and carcinogenesis. Cancer Res., 39: 2863-86, 1979.
- 189 - LIN, T.Y.; CHU, S.H.; CHEN, M.F.; CHEN, C.H. Serum alpha-fetoglobulin and primary cancer of the liver in Taiwan. Cancer, 30: 435-43, 1972.

- 190 - LING, C.M. & OVERBY, L.R. Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmune assay with  $^{125}\text{I}$ -antibody. J. Immunol., 109: 834, 1972.
- 191 - LINGAO, A.L.; DOMINGO, E.O.; NISHIOKA, K. Hepatitis B virus profile of hepatocellular carcinoma in the Philippines. Cancer, 48: 1590-5, 1981.
- 192 - LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN. Primary liver cancer in Japan. Cancer, 54: 1747-55, 1984.
- 193 - LOESCH, J. Primary carcinoma of the liver. Arch. Pathol., 28: 223-35, 1939.
- 194 - LOK, A.S.F. & LAI, C.L. Alpha-fetoprotein monitoring in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection: role in the early detection of hepatocellular carcinoma. Hepatology, 9: 110-5, 1989.
- 195 - LONDON, W.T. Primary hepatocellular carcinoma-etiology, pathogenesis and prevention. Hum. Pathol., 12: 1085-97, 1981.
- 196 - LOPEZ-CORELLA, E.; RIDAURA-SANZ, C.; ALBORES-SAAVEDRA, J. Primary carcinoma of the liver in Mexican adults. Cancer, 32: 678-85, 1968.
- 197 - LUTWICK, L. Relation between aflatoxin, hepatitis B virus, and hepatocellular carcinoma. Lancet, 1: 755-7, 1979.
- 198 - MacDONALD, R.A. Cirrhosis and primary carcinoma of the liver: changes in their occurrence at the Boston City Hospital, 1897-1954. N. Engl. J. Med., 255: 1179-83, 1956.
- 199 - MacDONALD, R.A. Primary carcinoma of the liver: a clinicopathologic study of one hundred eight cases. Arch. Int. Med., 99: 266-79, 1957.
- 200 - MacDONALD, R.A. & MALLORY, G.K. The natural history of postnecrotic cirrhosis: a study of 221 autopsy cases. Am. J. Med., 29: 334-57, 1958.
- 201 - MAGNIUS, L.O. & ESPMARK, J.A. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from Le Bouvier determinants. J. Immunol., 107: 1017-21, 1972.
- 202 - MANDERSON, W.G.; PATRICK, R.S.; PETERS, E.E. Incidence of primary carcinoma of the liver in the west of Scotland between 1949 and 1965. Gut, 9: 480-4, 1968.

- 203 - MANESSIS, E.; HADZIYANNIS, S.J.; KARVOUTZIS, G.; MAUSSOUROS, A.; MERIKAS, G. HBsAg positive and HBsAg negative hepatocellular carcinoma in Greece. Arch. Hellen. Med. Soc., 3: 4-7, 1977.
- 204 - MANIFOLD, I.H.; TRIGER, D.R.; UNDERWOOD, J.C.E. Kupffer-cell depletion in chronic liver disease: implications for hepatic carcinogenesis. Lancet, 2: 431-3, 1983.
- 205 - MANGOLIS, S. & HOMCY, C. Systemic manifestations of hepatoma. Medicine, 51: 381-91, 1972.
- 206 - MATHIESEN, L.R.; FAUERHOLDT, L.; MOLLER, A.M.; ALDERSHVILE, J.; DIETRICHSON, D.; HARDT, F.; NIELSEN, J.O.; SKINHOJ, P. and THE COPENHAGEN HEPATITIS ACUTA PROGRAMME. Immunofluorescence studies for hepatitis A virus and hepatitis B surface and core antigen in liver biopsies from patients with acute viral hepatitis. Gastroenterology, 77: 623-8, 1979.
- 207 - MATSUI, T.; TAKANO, M.; MIYAMOTO, K.; ITOH, Y.; YOSHIZAWA, H.; KOLKE, M.; MOCHIZUKI, T.; TANAKA, E.; OKAMOTO, H.; IMAI, M.; MISHIRO, S.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Nude mice bearing human primary hepatocellular carcinoma that produces hepatitis B surface, core and e antigens, as well as deoxyribonucleic acid polymerase. Gastroenterology, 90: 135-42, 1986.
- 208 - MATSUMOTO, Y.; SUZUKI, T.; ASADA, I. Clinical classification of hepatoma in Japan according to serial changes in alpha-fetoprotein levels. Cancer, 49: 354-60, 1982.
- 209 - MAUPAS, P.; WERNER, B.; LAROUZÉ, B.; MILLMAN, I.; THOMAS-LONDON, W.; O'CONNELL, A.; BLUMBERG, B.S.; SAIMOT, G.; PAYET, M. Antibody to hepatitis-B core antigen in patients with primary hepatic carcinoma. Lancet, 2: 9-11, 1975.
- 210 - McFADZEAN, A.J.S. & TSE, Y.T. Hypoglycemia in primary carcinoma of the liver. Arch. Int. Med., 98: 720-31, 1956.
- 211 - McFADZEAN, A.J.S. & YEUNG, R.T.T. Further observation on hypoglycaemia in hepatocellular carcinoma. Am. J. Med., 47: 220-35, 1969.
- 212 - MELNICK, J.L. Classification of hepatitis A virus as enterovirus type 52 and of hepatitis B virus as hepadnavirus type 1. Intervirology, 18: 105-6, 1982.

- 213 - MENDES, T.F. Horizontes novos para uma doença antiga. Moderna Hepatologia (número especial): 2-5, 1987.
- 214 - MENDES, T.F.; PITTELLA, A.M.; MEXAS, P.P.F. História natural da hepatite. Moderna hepatologia, 13: 1-37, 1988.
- 215 - MENDES, T.F.; PITTELLA, A.M.; SIMONETTI, J.P. Marcadores virais no diagnóstico da hepatite. Serviço de Hepatologia da Santa Casa do Rio de Janeiro, 1986.
- 216 - MICHALAK, T.I.; SNYDER, R.L.; CHURCHILL, N.D. Characterization of the incorporation of woodchuck hepatitis virus surface antigen into hepatocyte plasma membrane in woodchuck hepatitis and in the virus-induced hepatocellular carcinoma. Hepatology, 10: 44-55, 1989.
- 217 - MIES, S.E. & LOSCHER, W.H. Hepatite e carcinoma hepatocelular. In: SILVA, L.C. Hepatites agudas e crônicas. São Paulo, Sarvier, 1986. p. 179-85.
- 218 - MILLER, R.H.; KANEKO, S.; CHUNG, C.T.; GIRONES, R.; PURCELL, R.H. Compact organization of the hepatitis B virus genome. Hepatology, 9: 322-7, 1989.
- 219 - MINCIS, M. Interação entre vírus B da hepatite e álcool? GED, 3: 67-8, 1984.
- 220 - MIRRA, A.P.; FREITAS, J.P.A.; LAURENTI, R.; PASTORELO, E.F.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.A. Cancer incidence in São Paulo, Brazil, 1969. In: WATERHOUSE, J. Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publication, 1976 (v. III, 15: 128-31).
- 221 - MORGAN, A.G.; WALKER, W.C.; MASON, M.K.; HERLINGER, H.; LOSOWSKY, M.S. A new syndrome associated with hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 63: 340-5, 1972.
- 222 - MORI, W. Cirrhosis and primary cancer of the liver: comparative study in Tokyo and Cincinnati. Cancer, 5: 627-31, 1967.
- 223 - NAGORNEY, D.M.; ADSON, M.A.; WEILAND, L.H.; KNIGHT, C.D.; SMALLEY, S.R.; ZINSMEISTER, A.R. Fibrolamellar hepatoma. Am. J. Surg., 149: 113-9, 1985.
- 224 - NAKANE, P.K. & PIERCE JR., G.B. Enzyme-labeled antibodies preparation and application for the localization of antigens. J. Histochem. Cytochem., 14: 929-31, 1967.

- 225 - NAKANUMA, Y. & OHTA, G. Expression of mallow bodies in hepatocellular carcinoma in man and its significance. Cancer, 57: 81-6, 1986.
- 226 - NAKASHIMA, T.; OKUDA, K.; KOJIRO, M.; JIMI, A.; YAMAGUCHI, R.; SAKAMOTO, K.; IKARI, T. Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan: 232 consecutive cases autopsied in ten years. Cancer, 51: 863-77, 1983.
- 227 - NAYAK, N.C.; DHAR, A.; SACHDEVA, R.; MITTAL, A.; SETH, H.N.; SUDARSANAM, D.; REDDY, B.; WAGHOLIKAR, U.L.; REDDY, C.R.R.M. Association of human hepatocellular carcinoma and cirrhosis with hepatitis B virus surface and core antigens in the liver. Int. J. Cancer, 20: 643-54, 1977.
- 228 - NAYAK, N.C. & SACHDEVA, R. Localization of hepatitis B surface antigen in conventional paraffin sections of the liver: comparison of immunofluorescence, immunoperoxidase, and orcein staining methods with regard to their specificity and reliability as antigen marker. Am. J. Pathol., 81: 479-92, 1975.
- 229 - NAZAREWICZ, T.; KROWCZYNSKI, K.; SLUSARCZYK, J.; NOWOSLAWSKI, A. Cellular localization of hepatitis B virus antigen in patients with liver cirrhosis. J. Inf. Dis., 135: 298-302, 1977.
- 230 - NELSON, R.S., ELIZALDE, R.; HOWE, C.D. Clinical aspects of primary carcinoma of the liver. Cancer, 19: 533-7, 1966.
- 231 - NEUMAYR, A. & WEISS, W. Liver Tumours - new aspects. Hepato-gastroentol., 28: 1-5, 1981.
- 232 - NOMURA, A.; STEMMERMANN, G.N.; WASNICH, R.D. Presence of hepatitis B surface before primary hepatocellular carcinoma. J.A.M.A., 247: 2247-9, 1982.
- 233 - NORKIN, S.A. & CAMPAGNA-PINTO, D. Cytoplasmic Hyaline inclusions in hepatoma: histochemical study. Arch. Pathol., 86: 25-32, 1968.
- 234 - NORREDAM, K. Primary carcinoma of the liver: a histological study of 52 cases from Denmark. Acta Path. Microbiol. Scand., 87: 227-36, 1979.
- 235 - NOWOSLAWSKI, A.; KRAWCZYNSKI, K.; BRZOSCO, W.J.; MADALINSKI, K. Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. Am. J. Pathol., 68: 31-55, 1972.

- 236 - OBATA, H.; HAYASHI, N.; MOTOIKE, Y.; HISAMITSU, T.; OKUDA, H.; KOBAYASHI, S.; NISHIOKA, K. A prospective study on the development of hepatocellular carcinoma from liver cirrhosis with persistent hepatitis B virus infection. Int. J. Cancer, 25: 741-7, 1980.
- 237 - OHBAYASHI, A.; OKOCHI, K.; MAYUMI, M. Familial clustering of asymptomatic carriers of Australia antigen and patients with chronic liver disease or primary liver cancer. Gastroenterology, 62: 618-25, 1972.
- 238 - OHLSSON, E.G.H. & NORDÉN, J.G. Primary carcinoma of the liver: a study of 121 cases. Acta Path. Microbiol. Scand., 64: 430-40, 1965.
- 239 - OHNISHI, K.; IIDA, S.; IWAMA, S.; GOTO, N.; NOMURA, F.; TAKASHI, M.; MISHIM, A.; KONO, K.; KIMURA, K.; MUSA, H.; KOTOTA, K.; OKUDA, K. The effect of chronic habitual alcohol intake on the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: relation to hepatitis B antigen carriage. Cancer, 49: 672-7, 1982.
- 240 - OKOCHI, J. & MURAKAMI, S. Observation on Australia antigen in Japanese. Vox Sang., 15: 374-5, 1968.
- 241 - OKUDA, K. Clinical aspects of hepatocellular carcinoma - analysis of 134 cases. In: OKUDA, K. & PETERS, R.L. Hepatocellular carcinoma. New York, Willey, 1976. p. 387-436.
- 242 - OKUDA, K. Primary liver cancer. Quadrennial review lecture. Dig. Dis. Sci., 31: 133-46, 1986.
- 243 - OKUDA, K. and THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN. Primary liver cancers in Japan. Cancer, 45: 2663-9, 1980.
- 244 - OKUDA, K.; KOTODA, K.; OBATA, H.; HAYASHI, N.; HISAMITSU, T.; TAMIYA, M.; KUBO, Y.; YAKUSHIJI, F.; NAGATA, E.; JINNOUCHI, S.; SHIMOKAWA, Y. Clinical observation during a relatively early stage of hepatocellular carcinoma with special reference to serum alpha-fetoprotein levels. Gastroenterology, 69: 226-34, 1975.
- 245 - OKUDA, K.; KUBO, Y.; OKAZAKI, N.; ARISHIMA, T.; HASHIMOTO, M.; JINNOUCHI, S.; SAWA, Y.; SHIMOKAWA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NOGUCHI, T.; NAKANO, M.; KOJIRO, M.; NAKASHIMA, T. Clinical aspects of intrahepatic bile duct carcinoma including hilar carcinoma: a study of 57 autopsy-proven cases. Cancer, 39: 232-46, 1977.



- 246 - OKUDA, K.; MUSA, H.; NAKAJIMA, Y.; KUBO, Y.; SHIMOKAWA, Y.; NAGASAKI, Y.; SAWA, Y.; JINNOUCHI, S.; KANEKO, T.; OBATA, H.; HISAMITSU, T.; MOTOIKE, Y.; OKAZAKI, N.; KOJIRO, M.; SAKAMOTO, K.; NAKASHIMA, T. Clinicopathologic features of encapsulated hepatocellular carcinoma: a study of 26 cases. Cancer, 40: 1240-5, 1977.
- 247 - OKUDA, K. & NAKASHIMA, T. Primary carcinomas of the liver. In: BERK, J.E. Bockus gastroenterology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1985. v. 5, p. 3315-76.
- 248 - OKUDA, K.; NAKASHIMA, T.; KOJIRO, M.; KONDO, Y.; WADA, K. Hepatocellular carcinoma without cirrhosis in Japanese patients. Gastroenterology, 97: 140-6, 1989.
- 249 - OKUDA, K.; NAKASHIMA, T.; OBATA, H.; KUBO, Y. Clinicopathological studies of hepatocellular carcinoma: analysis of 20 cases, including 4 with hepatic resection. Gastroenterology, 73: 109-15, 1977.
- 250 - OKUDA, K.; NAKASHIMA, T.; SAKAMOTO, K.; IKARI, T.; HIDAKA, H.; KUBO, Y.; SAKUMA, K.; MOTOIKE, Y.; OKUDA, H.; OBATA, H. Hepatocellular carcinoma arising in noncirrhotic and highly cirrhotic livers: a comparative study of histopathology and frequency of hepatitis B markers. Cancer, 49: 450-5, 1982.
- 251 - OKUDA, K.; OHTSUKI, T.; OBATA, H.; TOMIMATSU, M.; OKAZAKI, N.; HASEGAWA, H.; NAKAJIMA, Y.; OHNISHI, K. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. Cancer, 56: 918-28, 1985.
- 252 - OKUDA, K.; PETERS, R.L.; SIMSON, I.W. Gross anatomic features of hepatocellular carcinoma from three disparate geographic areas: proposal of new classification. Cancer, 54: 2165-73, 1984.
- 253 - OMATA, M.; AFROUDAKIS, A.; LIEW, C.T.; ASHCAVAI, M.; PETERS, R.L. Comparison of serum hepatitis B surface (HBsAg) and serum anticore with tissue HBsAg and hepatitis B core antigen (HBcAg). Gastroenterology, 75: 1003-9, 1978.
- 254 - OMATA, M.; ASHCAVAI, M.; LIEW, C.T.; PETERS, R.L. Hepatocellular carcinoma in the U.S.A., etiologic considerations: localization of hepatitis B antigens. Gastroenterology, 76: 279-87, 1979.

- 255 - OMATA, M.; ASHCAVAI, M.; PETERS, R.L. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus markers in Europe and U.S.A. Lancet, 1: 433-4, 1979 (letter).
- 256 - OMATA, M.; UCHIUMI, K.; ITO, Y.; YOKOSUKA, O.; MORI, J.; TERAQ, K.; WEI-FA, Y.; O'CONNELL, A.P.; LONDON, W.T.; OKUDA, K. Duck hepatitis B virus and liver diseases. Gastroenterology, 85: 260-7, 1983.
- 257 - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Genebra, 1983. Prevenção del cáncer de hígado. Informe técnico nº 691.
- 258 - OTU, A.A. Hepatocellular carcinoma, hepatic cirrhosis, and hepatitis B virus infection in Nigeria. Cancer, 60: 2581-5, 1987.
- 259 - PATTON, R.B.; HORN JR., R.C. Primary liver carcinoma: autopsy study of 60 cases. Cancer, 17: 757-68, 1964.
- 260 - PAUL, J. Oncogenes. J. Pathol., 143: 1-10, 1984.
- 261 - PEREIRA, F.E.L.; BONI, E.S.; CASTRO FILHO, A.K.; LEAL FILHO, J.; GONÇALVES, C.S. Freqüência de carcinomas primitivos do fígado em necrópsias realizadas em Vitória (Espírito Santo). Revista da AMB, 23: 421-2, 1977.
- 262 - PEREIRA, F.E.L.; GONÇALVES, C.S.; BONI, E.S. The association of hepatitis B surface antigen (HBsAg) with hepatocellular carcinoma in Espírito Santo State, Brazil. Brazilian J. Med. Biol. Res., 14: 277-80, 1981.
- 263 - PETERS, R.L.; AFROUDAKIS, A.P.; TATTER, D. The changing incidence of association of hepatitis B with hepatocellular carcinoma in California. Am. J. Clin. Pathol., 68: 1-7, 1977.
- 264 - PITOT, H. The natural history of neoplastic development: the relation of experimental models to human cancer. Cancer, 49: 1206-11, 1982.
- 265 - PITTELLA, A.M.M.; MÉXAS, P.P.F.; TORRES, P.R.R.; HERBERT, B.A.; VASCONCELOS, M.C.L.; MENDES, T.F. Vírus da hepatite B e câncer do fígado. J.B.M., 41: 86-99, 1981.
- 266 - POPPER, H. Clinical pathologic correlation in viral hepatitis: the effect of the virus on the liver. Am. J. Pathol., 81: 609-28, 1975.
- 267 - PORTMANN, B.; GALBRAITH, R.M.; EDDLESTON, A.L.W.F.; ZUCKERMAN, A.J.; WILLIAMS, R. Detection of HBsAg in fixed liver tissue - use of a modified immunofluorescent

- technique and comparison with histochemical methods. Gut, 17: 1-9, 1976.
- 268 - PRAT, J.R.; OBRADORS, M.S.; NOGUERA, R.B.; CANADAS-SAURAS, E. Anemia hemolítica asociada à hepatocarcinoma. Rev. Esp. Enf. Ap. Dig., 39: 577-82, 1973.
- 269 - PRIMACK, A.; VOGEL, C.L.; BARKER, L.F. Immunological studies in Ugandan patients with hepatocellular carcinoma. Brit. Med. J., 1: 16-9, 1973.
- 270 - PRIMACK, A.; VOGEL, C.L.; KYALWAZI, S.K.; ZIEGLER, J.L.; SIMON, R.; ANTHONY, P.P. A staging system for hepatocellular carcinoma: prognostic factors in Ugandan patients. Cancer, 35: 1357-64, 1975.
- 271 - PRINCE, A.M. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60: 814-21, 1968.
- 272 - PRINCE, A.M.; SZMUNESS, W.; MICHON, J.; DEMAILLE, J.; DIEBOLT, G.; LINHARD, J.; QUENUN, C.; SANKALE, M. A case/control study of the association between primary liver cancer and hepatitis B infection in Senegal. Int. J. Cancer, 16: 376-83, 1975.
- 273 - PUN, K.K.; YOUNG, R.T.T.; WANG, C.; TAM, C.F.; HO, P.W.M. The use of glucagon challenge tests in the diagnostic evaluation of hypoglycemia due to hepatoma and insulinoma. J. Clin. Endocrinol. Metab., 67: 546-50, 1988.
- 274 - PURVES, L.R.; BERSOHN, I.; PATH, F.C.; GEDDES, E.W. Serum alpha-fetoprotein and primary cancer of the liver in man. Cancer, 25: 1261-70, 1970.
- 275 - QUEIROZ, A.C.; MOREIRA, D.E.Q.; ANDRADE, M.L.A. Displasia de células hepáticas. Lesão pré-maligna relacionada ao carcinoma hepatocelular e à infecção pelo vírus B da hepatite. Arq. Gastroenterol., 24: 80-3, 1987.
- 276 - RAPHAEL, B.; COOPERBERG, A.A.; NILOFF, P. The triad of hemochromatosis, hepatoma and erythrocytosis. Cancer, 43: 690-4, 1979.
- 277 - RAY, M.B.; DESMET, V.J.; BRADBURNE, A.F.; DESMYTER, J.; FEVERY, J.; DE GROOTE, J. Differential distribution of hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in the liver of hepatitis B patients. Gastroenterology, 71: 462-7, 1976.

- 278 - REED, W.D.; STERN, R.B.; EDDLESTON, A.L.W.F.; WILLIAMS, R.; ZUCKERMAN, A.J.; BOWES, A.; EARL, P.M. Detection of hepatitis-B antigen by radioimmunoassay in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Great Britain. Lancet, 2: 690-4, 1973.
- 279 - REYS, L.L.; PURCELL, R.H.; HOLLAND, P.V.; ALTER, H.J. The relationship between hepatitis B virus infection and hepatic cell carcinoma in Mozambique. Trop. Geogr. Med., 29: 251-6, 1977.
- 280 - ROBERTSON, M. Oncogenes and multistep carcinogenesis. Brit. Med. J., 287: 1084-6, 1983.
- 281 - ROBINSON, W.S.; CLAYTON, D.A.; GREENMAN, R.L. DNA of a human hepatitis B virus candidate. J. Virol., 14: 384-91, 1974.
- 282 - ROBINSON, W.S. & LTWICK, L.I. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). N. Engl. J. Med., 295: 1168-75, 1976.
- 283 - RONCALLI, M.; BORZIO, M.; BIAGI, G.; FERRARI, A.R.; MACCHI, R.; TOMBESI, V.M.; SERVIDA, E. Liver cell dysplasia in cirrhosis: a serologic and immunohistochemical study. Cancer, 57: 1515-21, 1986.
- 284 - RODS, C.M.; FELTKAMP-VROOM, T.M.; HELDER, A.W. The localization of hepatitis B antigen and immunoglobulin in liver tissue: an immunofluorescence, light and electron microscopic study. J. Pathol., 118: 1-8, 1975.
- 285 - RUOSLAHTI, E.; SALASPURO, M.; PIHKO, H.; ANDERSSON, L.; SEPPALA, M. Serum alpha-fetoprotein: diagnostic significance in liver disease. Brit. Med. J., 2: 527-9, 1974.
- 286 - SAIBARA, T.; ONISHI, S.; SAKAEDA, H.; YAMAMOTO, Y. Defective function of lymphokine-activated killer cells and natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology, 9: 471-6, 1989.
- 287 - SAKUMA, K.; SAITOH, N.; KASAI, M.; JITSUKAWA, H.; YOSHINO, I.; YAMAGUCHI, M.; NOBUTOMO, K.; YAMUMI, M.; TSUDA, F.; KOMAZAWA, T.; NAKAMURA, T.; YOSHIDA, Y.; OKUDA, K. Relative risks of death due to liver disease among Japanese male adults having various statuses for hepatitis B s and e antigen/antibody in serum: a prospective study. Hepatology, 8: 1642-6, 1988.
- 288 - SAKUMA, K.; TAKAHARA, T.; OKUDA, K.; TSUDA, F.; MAYUMI, M. Prognosis of hepatitis B virus antigen carriers in

- relation to routine liver function tests: a prospective study. Gastroenterology, 83: 114-7, 1982.
- 289 - SANDLER, D.P.; SANDLER, R.S.; HORNEY, L.F. Primary liver cancer mortality in the United States. J. Chron. Dis., 36: 227-36, 1983.
- 290 - SANGALLI, G.; LIVRAGHI, T.; GIORDANO, F. Fine needle biopsy of hepatocellular carcinoma: improvement in diagnosis by microhistology. Gastroenterology, 96: 524-6, 1989.
- 291 - SANGALLI, G.; LIVRAGHI, T.; GIORDANO, F. Fine needle liver biopsy of hepatocellular carcinoma: is sampling simple? Gastroenterology, 97: 248, 1989.
- 292 - SARAGOÇA, A.; BARROS, B.; SOARES, C.S. Primary neoplasms of the liver. Am. J. Digest. Dis., 67: 337-44, 1964.
- 293 - SARNO, E.N.; VIEIRA, L.M.M.; FAULHABER, D.M. Antígeno de superfície do vírus da hepatite B (Ag<sub>s</sub>HB) e carcinoma primitivo de fígado: um estudo retrospectivo. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 22: 20-3, 1980.
- 294 - SASAKI, K.; OKUDA, S.I.; TAKAHASHI, M.; SASAKI, M. Hepatic clear cell carcinoma associated with hypoglycemia and hypercholesterolemia. Cancer, 47: 820-2, 1981.
- 295 - SCHEVER, P.J. Neoplasms and nodules. In: SCHEVER, P.J. Liver biopsy interpretation. 4<sup>th</sup> ed. London, Baillière Tindall, 1988. p. 147-172.
- 296 - SCHONFELD, A.; BABBOTT, D.; GUNDERSEN, K. Hypoglycemia and polycythemia associated with primary hepatoma. N. Engl. J. Med., 265: 231-3, 1964.
- 297 - SCHONLAND, M.M.; MILLWARD-SADLER, G.H.; WRIGHT, D.H.; WRIGHT, R. Hepatic tumours. In: WRIGHT, R.; MILLWARD-SADLER, G.H.; ALBERTI, K.G.M.M.; KARRAN, S. Liver and biliary disease: pathophysiology, diagnosis, management. 2<sup>nd</sup> ed. London, Baillière Tindall, 1985. p. 1137-84.
- 298 - SCHREIBER, W.M.; KATO, H.; ROBERTSON, J.D. Primary carcinoma of the liver in Hiroshima and Nagasaki, Japan. Cancer, 26: 69-75, 1970.
- 299 - SCHUPBACH, H.J. & CHAPPELL, R.B. Primary carcinoma of the liver. Ann. Intern. Med., 89: 436-44, 1952.
- 300 - SHAFRITZ, D.A.; SHOUVAL, D.; SHERMAN, H.I.; HADZIYANNIS, S.J.; KEW, M.C. Integration of hepatitis B virus DNA

- into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma: studies in percutaneous liver biopsies and post-mortem tissue specimens. N. Engl. J. Med., 305: 1067-73, 1981.
- 301 - SHERLOCK, P.; KIM, Y.S.; KOSS, L.G. Cytologic diagnosis of cancer from aspirated material obtained at liver biopsy. Am. J. Dig. Dis., 12: 396-402, 1967.
- 302 - SHERLOCK, S. Hepatic tumours. In: SHERLOCK, S. Diseases of the liver and biliary system. 8<sup>th</sup> ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1989. p. 482-505.
- 303 - SHERLOCK, S.; NIAZI, S.P.; FOX, R.A.; SCHEUER, P.J. Chronic liver disease and primary liver-cell cancer with hepatitis associated (Australia) antigen in serum. Lancet, 1: 1243-7, 1970.
- 304 - SHERMAN, H.I. & HARDISON, J.E. The importance of a coexistent hepatic rub and bruit: a clue to the diagnosis of cancer in the liver. J.A.M.A., 241: 1495-6, 1979.
- 305 - SHIKATA, T.; UZAWA, T.; YOSHIWARA, N.; AKATSUKA, T.; YAMAZAKI, S. Staining methods of Australia antigens in paraffin sections: detection of cytoplasmic inclusion bodies. Japan J. Exp. Med., 44: 25-36, 1974.
- 306 - SHIMOKAWA, Y.; OKUDA, K.; KUBO, Y.; KANEKO, A.; ARISHIMA, T.; NAGATA, E.; HASHIMOTO, M.; SAWA, Y.; NAGASAKI, Y.; KOJIRO, M.; SAKAMOTO, K.; NAKASHIMA, T. Serum glutamic oxalacetic transaminase/glutamic pyruvic transaminase ratios in hepatocellular carcinoma. Cancer, 40: 319-24, 1977.
- 307 - SHINAGAWA, T.; OHTO, M.; KIMURA, K.; TSUNETOMI, S.; MORI-TA, M.; SAISHO, H.; TSUCHIYA, Y.; SAOTOME, N.; KARASAWA, E.; MIKI, M.; VENO, T.; OKUDA, K. Diagnosis and clinical features of small hepatocellular carcinoma with emphasis on the utility of real-time ultrasonography: a study in 51 patients. Gastroenterology, 86: 495-502, 1984.
- 308 - SILVA, L.C. & GRANATO, C. Características dos vírus e dos marcadores sorológicos - importância clínica. In: SILVA, L.C. Hepatites agudas e crônicas. São Paulo, Sarvier, 1986. p. 9-20.
- 309 - SIMONS, M.J.; YAP, E.H.; SHANMUGARAINAM, K. Australia antigen in Singapore Chinese patients with hepatocellular carcinoma and comparison groups: influence of technique sensitivity on differential frequencies. Int. J. Cancer, 10: 320-5, 1972.

- 310 - SKINHOJ, P.; HANSEN, J.P.H.; NIELSEN, N.H.; MIKKELSEN, F. Occurrence of cirrhosis and primary liver cancer in an eskimo population hyperendemicallly infected with hepatitis B virus. Am. J. Epidem., 108: 121-5, 1978.
- 311 - SMITH, J.B. & BLUMBERG, B.S. Viral hepatitis, postnecrotic cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Lancet, 2: 953, 1969.
- 312 - STEINER, P.E. Cancer of the liver and cirrhosis in Trans-Saharan Africa and the United States of America. Cancer, 13: 1085-166, 1960.
- 313 - STEINER, P.E. & DAVIES, J.N.P. Cirrhosis and primary liver carcinoma in Uganda Africans. Brit. J. Cancer, 11: 523-34, 1958.
- 314 - STERNBERGER, L.A.; HARDY JR, P.H.; CUCULIS, J.J.; MEYER, H.G. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. J. Histochem. Cytochem., 18: 315-33, 1970.
- 315 - STRAUSS, E.; LACET, C.M.; MAFFEI JR., R.A.; SILVA, E.C.; FUKUSHIMA, J.T.; GAYOTTO, L.C.C. Etiologia e apresentação da cirrose hepática em São Paulo: análise de 200 casos. GED, 7: 119-23, 1988.
- 316 - STROMEYER, F.W.; ISHAK, K.G.; GERBER, M.A.; MATHEW, T. Ground-glass cells in hepatocellular carcinoma. Am. J. Clin. Pathol., 74: 254-8, 1980.
- 317 - SUMMERS, J. Three recently described animal virus models for human hepatitis B virus. Hepatology, 1: 179-83, 1981.
- 318 - SUMMERS, J. & MASON, W.S. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell, 28: 403-15, 1982.
- 319 - SUTNICK, A.I.; LONDON, W.T.; BLUMBERG, B.S. Australia antigen and the quest for a hepatitis virus. Am. J. Dig. Dis., 14: 189-94, 1969.
- 320 - SZMUNESS, W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. Prog. Med. Virol., 24: 40-69, 1978.
- 321 - SZMUNESS, W.; STEVENS, C.E.; IKRAM, H.; MUCH, M.I.; HARLEY, E.J.; HOLLINGER, B. Prevalence of hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Chinese-Americans. J. Infect. Dis., 137: 822-9, 1978.

- 322 - TAMBURRO, C.H. & LEE, H.M. Primary hepatic cancer in alcoholics. Clin. Gastroenterol., 10: 457-77, 1981.
- 323 - TAPP, E. & JONES, D.M. HBsAg and HBcAg in the livers of asymptomatic hepatitis B antigen carriers. J. Clin. Pathol., 30: 671-7, 1977.
- 324 - TAYLOR, C.R. Immunoperoxidase techniques: practical and theoretical aspects. Arch. Pathol. Lab. Med., 102: 113-21, 1978.
- 325 - TAYLOR, C.R. A diagnostic tool for the surgical pathologist. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1986.
- 326 - TERÉS, J., GUARDIA, J., BRUGUERA, M., RODES, J. Hepatitis-associated antigen and hepatocellular carcinoma. Lancet, 2: 215-6, 1971.
- 327 - THEODOROPOULOS, G.; ARCHIMANDRITIS, A.; ANGELOPOULOS, B. Australia antigen and malignant hepatoma. Ann. Intern. Med., 82: 809, 1975.
- 328 - THEODOROPOULOS, G.; NAKOPOULOU, L.; REPANTI, M.; PAPACHARALAMPOUS, N.; MELISSINOS, K. Detection of hepatitis B surface antigen in fixed tissues of patients with cirrhosis and hepatoma. Virchows Arch. Path. Anat. and Histol., 382: 293-300, 1979.
- 329 - THOMAS, G.E.; WICKS, A.C.B.; CLAIN, D.J.; LOON, N.; SEG-GIE, J.; BRAMSTOM, B. Hepatocellular carcinoma in the Rhodesian African. Dig. Dis. Sci., 22: 573-81, 1977.
- 330 - THOMSEN, P. & CLAUSEN, P.P. Occurrence of hepatitis B-surface antigens in a consecutive material of 1539 livers biopsies. Acta Path. Microbiol. Scand., 91: 71-5, 1983.
- 331 - TONG, M.J. Diagnosis of primary hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 91: 1306-7, 1986.
- 332 - TONG, M.J.; SUN, S.C.; SCHAEFFER, B.T.; CHANG, N.K.; LO, K.J.; PETERS, R.L. Hepatitis associated antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan. Ann. Intern. Med., 65: 687-91, 1971.
- 333 - TONG, M.J.; WEINER, J.M.; ASHCAVAI, M.W.; REDEKER, A.G.; COMPARINI, S.; VYAS, G.N. A comparative study of hepatitis B viral markers in the family members of Asian and non-Asian patients with hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma and with



- chronic hepatitis B infection. J. Infec. Dis., 140: 506-12, 1979.
- 334 - TONG, M.J.; WEINER, J.M.; ASHCAVAI, M.W.; VYAS, G.N. Evidence for clustering of hepatitis B virus infection in families of patients with primary hepatocellular carcinoma. Cancer, 44: 2338-42, 1979.
- 335 - TORLONI, H. & BRAMINI, R. Registro Nacional de Tumores. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, Divisão Nacional de Doenças Crônico-Degenerativas, 1978.
- 336 - TRICHOPOULOS, D. The causes of primary carcinoma in Greece. Prog. Med. Virol., 27: 14-7, 1981.
- 337 - TRICHOPOULOS, D.; MacMAHON, B.; SPARROS, L.; MCRİKAS, G. Smoking and hepatitis B negative primary hepatocellular carcinoma. J. Natl. Cancer Inst., 65: 111-4, 1982.
- 338 - TRICHOPOULOS, D.; PAPAEVANGELOU, G.; VIOLAKI, M.; VISSOULIS, C.; SPARROS, L.; MANOUSOS, D.N. Geographic correlation between mortality from primary hepatic carcinoma and prevalence of hepatitis B surface antigen in Greece. Brit. J. Cancer, 34: 83-7, 1976.
- 339 - TRICHOPOULOS, D.; SIZARET, P.; TABOR, E.; GERETY, R.J.; MARTEL, N.; MUNOZ, N.; THEODOROPOULOS, G. Alpha-fetoprotein levels of liver cancer patients and controls in a European population. Cancer, 43: 736-40, 1980.
- 340 - TSUDA, H.; HIROHASHI, S.; SHIMOSATO, Y.; TERADA, M.; HASEGAWA, H. Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 94: 1664-6, 1988.
- 341 - UCHIDA, T.; MIYATA, H.; SHIKATA, T. Human hepatocellular carcinoma and putative precancerous disorders. Arch. Pathol. Lab. Med., 105: 180-6, 1981.
- 342 - VAITUKAITIS, J.; ROBBINS, J.B.; NIESCHLAG, E.; ROSS, G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr., 33: 988-91, 1971.
- 343 - VAN DER WALT, J.A.; GOMPERS, E.D.; KEW, M.C. Hemostatic factors in primary hepatocellular cancer. Cancer, 40: 1593-603, 1977.
- 344 - VECCHIO, F.M.; FABIAND, A.; GHIRLANDA, G.; MANNA, R.; MASSI, G. Fibrolamellar carcinoma of the liver: the

- malignant counterpart of focal nodular hyperplasia with oncocytic change. Am. J. Clin. Pathol., 81: 521-6, 1984.
- 345 - VINIK, A.I. & POOLER, W. Carbohydrate metabolism in patients with primary hepatocellular carcinoma. Clin. Sci. Mol. Med., 45: 387-96, 1973.
- 346 - VOGEL, C.L.; MODY, N.; ANTHONY, P.P.; BARKER, L.F. Hepatitis-associated antigen in Ugandan patients with hepatocellular carcinoma. Lancet, 2: 621-4, 1970.
- 347 - WADA, K.; KONDO, F.; KONDO, Y. Large regenerative and dysplastic nodules in cirrhosis livers: a histopathologic study. Hepatology, 8: 1684-8, 1988.
- 348 - WALLERSTEDT, S.; OLSSON, R.; WALDENSTRÖM, J. The diagnostic significance of a high ASAT/ALAT (GOT/GPT) ratio in patients with very high serum aminotransferase levels. Acta Med. Scand., 195: 227-9, 1974.
- 349 - WALTER, E.; BLUM, H.E.; MEIER, P.; HUONKER, M.; SCHMID, M.; MAIER, K.P.; OFFENSBERGER, C.U.B.; OFFENSBERGER, S.; GEROK, W. Hepatocellular carcinoma in alcoholic liver disease: no evidence for a pathogenic role of hepatitis B virus infection. Hepatology, 8: 745-8, 1988.
- 350 - WANG, K.K. & CZAJA, A.J. Hepatocellular carcinoma in corticosteroid-treated severe auto-immune chronic active hepatitis. Hepatology, 8: 1679-83, 1988.
- 351 - WARNOCK, M.L. & REISMAN, R. Variant alkaline phosphatase in human hepatocellular cancers. Clin. Chim. Acta, 24: 5-11, 1969.
- 352 - WARVI, W.N. Primary tumours of the liver. Surg. Gyn. Obst., 80: 643-50, 1945.
- 353 - WATERSON, A.P. Human cancers and human viruses. Brit. Med. J., 284: 446-8, 1982.
- 354 - WEBB, A.C. Primary carcinoma of the liver. Arch. Pathol., 40: 382-6, 1945.
- 355 - WELLS, R.F. & LUNDBERG, G.D. Hepatoma: review of 43 cases with comments on syphilis as an etiologic factor. Gastroenterology, 44: 598-601, 1963.
- 356 - WEPSIC, H.T. & KIRKPATRICK, A. Alpha-fetoprotein and its relevance to human disease. Gastroenterology, 77: 787-96, 1979.

- 357 - WILLIAMS, A.L.B. & HOOFNAGLE, J.H. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. A relationship to cirrhosis. Gastroenterology, 95: 734-9, 1988.
- 358 - WOLTERS, G.; KUIJPERS, L.P.C.; KACAKI, J.; SCHUURS, H.W.M. Enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis B surface antigen. J. Infect. Dis., 136: 311-7, 1977.
- 359 - WROBLEWSKI, F. & LA DUE, J.S. Serum glutamic-oxalacetic-transaminase activity as an index of liver cell injury from cancer. A preliminary report. Cancer, 8: 1155-63, 1955.
- 360 - WROBLEWSKI, F. & LA DUE, J.S. Serum glutamic pyruvic transaminase (SGP-T) in hepatic disease: a preliminary report. Ann. Intern. Med., 45: 801-11, 1956.
- 361 - WU, P.C. Patterns of hepatitis B surface antigen: localization in cells of hepatocellular carcinoma. Arch. Pathol. Lab. Med., 103: 165-8, 1979.
- 362 - YAMADA, G.; TAKAHASHI, T.; MIZUNO, M.; SAKAMOTO, Y.; KAGA, K.; KOBAYASHI, T.; NAGASHIMA, H. Immunoelectron microscopic observation of hepatitis B surface antigen on the surface of liver cells from patients with hepatitis B virus infection. Acta Med. Okayama, 34: 175-87, 1980.
- 363 - YARRISH, R.L.; WERNER, B.G.; BLUMBERG, B.S. Association of hepatitis B virus infection with hepatocellular carcinoma in American patients. Int. J. Cancer, 26: 711-5, 1980.
- 364 - YEUNG, R.T.T.; YEUNG, D.C.Y.; AU, K.S. Hypoglycemia associated with lipid accumulation in primary hepatocellular carcinoma. Cancer, 32: 1482-9, 1973.
- 365 - YOKOSUKA, O.; OMATA, M.; IMAZEKI, F.; ITO, Y.; OKUDA, K. Hepatitis B virus RNA transcripts and DNA in chronic liver disease. N. Engl. J. Med., 315: 1187-92, 1986.
- 366 - YOSHIDA, M.C.; SASAKI, M.R.; TAKEICHI, N.; KOBAYASHI, H.; DEMPO, K.; MORLI, M. New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat. J. Hered., 78: 361-5, 1987.
- 367 - YU, M.C.; MACK, T.; HANISH, R.; PETERS, R.L.; HENDERSON, B.E.; PIKE, M.C. Hepatitis, alcohol consumption, cigarette smoking, and hepatocellular carcinoma. Cancer Res., 43: 6077-9, 1983.