

Josefo João Ferro

**Expressão da Proteína p53, Instabilidade
Genética (Instabilidade de Microssatélites) e
Proliferação Celular em Hepatocarcinomas
de Doentes do Sul de Moçambique e do
Norte de Portugal.**

**MESTRADO DE ONCOBIOLOGIA
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

NOVEMBRO, 1998

Josefo João Ferro

A
Capacity Building:
Obrigado pelo Bom
de estudos
Ferro 2013/14

**Expressão da Proteína p53, Instabilidade
Genética (Instabilidade de Microssatélites) e
Proliferação Celular em Hepatocarcinomas
de Doentes do Sul de Moçambique e do
Norte de Portugal**

Porto, Novembro de 1998

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre
apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto

Artigo 48º, § 3º - A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação. (Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto- Decreto Lei nº 19 337, de 29 de Janeiro de 1931).

Agradecimentos

Os meus primeiros agradecimentos vão para o Senhor Professor Manuel Sobrinho-Simões, por ter tornado possível a realização deste trabalho no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto e na Faculdade de Medicina do Porto, fruto da colaboração existente entre estas instituições e o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane - Moçambique e o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central de Maputo.

À Professora Fátima Carneiro a minha gratidão pela orientação e por todos os prestimosos conhecimentos que me transmitiu durante a realização deste trabalho.

À Doutora Raquel Seruca e à Dra Cláudia Santos agradeço o apoio prestado no estudo molecular.

Ao Professor Carlos Lopes agradeço o apoio logístico e profissional concedido durante as minhas estadias em Portugal.

À Paula Silva e ao Matos Alberto, os meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade e amizade e pelo apoio técnico que me prestaram na fase laboratorial deste trabalho.

Aos colegas do IPATIMUP agradeço o apoio na superação de algumas dificuldades surgidas ao longo deste trabalho.

À Fundação Calouste Gulbenkian agradeço o suporte financeiro às visitas de trabalho dos Professores do IPATIMUP e Faculdade de Medicina do Porto ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, no âmbito do contrato-programa em curso entre a Universidade do Porto e a Universidade Eduardo Mondlane. No âmbito do mesmo contrato-programa quero agradecer o financiamento dos estágios de capacitação dos Técnicos do nosso Departamento que me apoiaram na fase laboratorial deste trabalho.

Aos Serviços de Anatomia Patológica e de Gastrenterologia do Hospital São João – Porto por terem facultado material e informações sobre os casos de Portugal.

Ao Capacity Building Project (Universidade Eduardo Mondlane) agradeço a concessão da Bolsa de Mestrado.

À Inocência uma palavra de sincera gratidão pelo incentivo e encorajamento.

À Edy um agradecimento especial por ter compreendido a minha ausência do seu convívio diário.

Por último, os meus agradecimentos a toda a minha família pela compreensão demonstrada durante os períodos da minha ausência.

Prefácio

Nem sempre é fácil escolher um tema para uma tese de mestrado ou doutoramento que seja simultaneamente interessante para o candidato e relevante para o esclarecimento de um “problema” específico da zona de onde o mesmo provém. Esta dificuldade resulta, muitas vezes, do facto das teses serem feitas em centros vocacionados para linhas específicas de investigação, por vezes afastadas de problemas que são pertinentes para os candidatos e/ou para o seu meio.

Assim, a escolha do tema da tese é frequentemente feita em função dos interesses/condições do centro onde os trabalhos a ela conducentes se desenvolvem. No presente caso isso não se verificou e foi possível trabalhar num assunto para o qual o candidato tem particular interesse e que é de extrema importância para Moçambique.

Ao escolher o carcinoma hepatocelular como objecto do meu estudo fi-lo motivado pelo conhecimento de que este tipo de neoplasia constitui um dos principais problemas de saúde pública na população moçambicana e pelo desejo de contribuir para a sua investigação à luz dos actuais avanços biotecnológicos. Foi, por isso, um desafio que valeu a pena enfrentar.

Porto, Novembro de 1998

Índice

Abreviaturas	7
1. Introdução	8
I. Epidemiologia	8
II. Condições e lesões pré-malignas do CHC	12
III. Factores etiológicos do CHC	14
IV. Alterações estruturais e de expressão do gene p53 no CHC	25
V. Instabilidade de sequências microsatélites e CHC	26
VI. Alterações da proliferação celular em lesões pré-malignas e CHC	28
2. Objectivos	30
3. Material e Métodos	31
4. Resultados	36
5. Discussão	49
6. Conclusões principais	59
7. Bibliografia	60
8. Resumo	75

Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico
AgHBc – Antígeno do “core” do vírus da hepatite B
AgHBe – Antígeno “e” do vírus da hepatite B
AgHBs – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
AgHBx – Antígeno X do vírus da hepatite B
AgNORs – Silver staining of nucleolar organizer regions
Anti-HCV – Anticorpo contra o vírus da hepatite C
Anti-HBc – Anticorpo contra o antígeno do “core” do vírus da hepatite B
Anti-HBe – Anticorpo contra o antígeno “e” do vírus da hepatite B
Anti-Hbs – Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
ARN – Ácido ribonucleico
CA-repeats – Sequências repetitivas de dinucleotídeos de Citosina e Adenina
CDK – Ciclin Dependent Kinases
CHC – Carcinoma hepatocelular
DHBV – (Pekin) Duck hepatitis B virus
GSHV – Ground squirrel hepatitis virus
G-C – Guanina e citosina
HE – Hematoxilina eosina
IARC – International Agency for Research in Cancer
IGF – Insulin-like growth factor
IP – Índice proliferativo
ISM – Instabilidade de sequência microssatélites
IWP – International Working Party
ORF – Open reading frame
PCR – Polymerase chain reaction
TGF- α – Tumor growth factor- α
VHB – Vírus da hepatite B
VHC – Vírus da hepatite C
WHV – Woodchuck hepatitis virus

1. INTRODUÇÃO

I. EPIDEMIOLOGIA

O hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular (CHC) é, no âmbito das neoplasias primárias do fígado, a neoplasia epitelial maligna mais frequente, que se desenvolve a partir do hepatócito (Gayotto e Bogliolo, 1994; Ishak e Markin, 1996).

Apesar da sua relativa raridade nos Estados Unidos da América e na Europa, o CHC encontra-se entre as dez neoplasias malignas mais frequentes do mundo (London, 1981; Wands e Blum, 1991; Okuda, 1992; Aterman, 1995; Nagai et al, 1998).

Estima-se que aproximadamente metade da população mundial vive em áreas de incidência elevada de CHC, nomeadamente Sudeste Asiático e África ao Sul do Saara, onde ocorrem entre 25 a 150 novos casos de CHC por 100 000 habitantes e por ano, calculando-se que a incidência mundial se situa entre 300 000 a 1 200 000 novos casos por ano (London, 1981; Wands e Blum, 1991; Idilman et al, 1998).

Há uma grande variação da incidência do CHC consoante as regiões geográficas (Tabela 1). De acordo com Colombo (1995), há regiões de baixa incidência de CHC (menos de 6 casos por 100 000 habitantes por ano): Europa do Norte, EUA, Canadá, Hungria, Alemanha, Jugoslávia, Israel, Iraque, Tunísia, Cuba, Índia e Austrália; regiões de incidência intermédia (6 - 11 casos por 100 000 habitantes por ano): Itália, Suíça, Roménia, França, Tanzânia, Quénia, Brasil e Argentina; áreas de incidência elevada (11 - 30 casos por 100 000 habitantes por ano): Grécia, Nigéria, Senegal, África do Sul, Filipinas, Singapura e Japão; e zonas de incidência "elevadíssima" (30 - 150 casos por 100 000 habitantes por ano): Moçambique, Gâmbia, Bali, China e Tailândia. Os dados epidemiológicos de Portugal são escassos, havendo alguma evidência que aponta para uma incidência intermédia do CHC.

Dados mais recentes, publicados pela IARC em 1992, mostram que os países da região ao Sul do Saara continuam a ter incidências elevadas de CHC. As incidências por 100 000 habitantes e por ano são para o Mali e Gâmbia (África) de 47,9 e 36,0, respectivamente. Nesta publicação não estão incluídos dados relativos a Moçambique. Em Quidong (China) e Tailândia as incidências são de 98,9 e 90,0, respectivamente. Em contrapartida, nos países europeus como França e Inglaterra (Oxford), as incidências de CHC não ultrapassam 3 casos por 100 000 habitantes e por ano.

O CHC é uma neoplasia muito agressiva e a sobrevida global aos 5 anos nos casos sem tratamento é de 3% nos EUA (Carriaga e Henson, 1995; Barwick e Rosai, 1996; Chlebowski et al, 1996). As causas de morte são essencialmente relacionadas com a disseminação intra - hepática (insuficiência hepática), metástases pulmonares, rotura de varizes esofágicas (hemorragia digestiva alta) e necrose com rotura de nódulos neoplásicos para a cavidade peritoneal (hemoperitонеu) (Chearanai et al, 1983; Barwick e Rosai, 1996; Ishak e Markin, 1996).

Tabela 1. Taxas de incidência de CHC ajustadas por idade.

Região geográfica	Nº de casos por 100 000 habitantes/ano	
	Homens	Mulheres
América do Sul		
Argentina	6,0	2,5
Brasil (Recife)	9,2	8,3
Brasil (São Paulo)	3,8	2,6
Colômbia	2,8	1,4
Costa Rica	5,1	2,2
Perú	4,0	2,9
África		
África do Sul (Cidade do Cabo) – Brancos	1,2	0,6
África do Sul (Cidade do Cabo) – Negros	26,3	8,4
Argélia	1,6	1,4
Gâmbia	33,1	12,6
Moçambique	112,9	30,8
Nigéria	15,4	3,2
Senegal	25,6	9,0
Suazilândia	10,5	3,0
Ásia		
Burma	25,5	8,8
China (Shangai)	34,4	11,6
Coreia	13,8	3,2
Filipinas	19,9	6,2
Índia (Bombaim)	4,9	2,5
Índia (Madrás)	2,1	0,7
Japão	7,2	2,2
Tailândia	6,8	2,3
Europa		
Alemanha (Hamburg)	4,5	1,7
Espanha (Navarra)	7,9	4,7
França	6,9	1,2
Israel (Naturais da África)	7,4	1,5
Israel (Naturais da Europa)	3,4	4,7
Itália (Varese)	7,1	2,7
Noruega	1,8	1,1
Reino Unido	1,6	0,8

[Adaptado de Muir, 1989. Cancer Incidence in Five Continents. IARC Scientific Publications. vol. V, 88. Lyon, France: International Agency for Research in Cancer, 1989].

Em 1990, dos 50 milhões de óbitos ocorridos no mundo, 10 milhões ocorreram em indivíduos adultos dos quais mais de 1 milhão foram devidos a hepatopatias associadas a infecção crónica por vírus da hepatite B (VHB), incluindo o CHC (Montesano et al, 1997).

Os CHCs das áreas de maior incidência, sobretudo os desenvolvidos em África, têm características particulares que os tornam distintos dos CHCs que ocorrem em áreas de menor incidência (Yoshida et al, 1994; Szilagyi e Alpert, 1995). Os primeiros tendem a ser mais agressivos o que em parte se deve ao facto do diagnóstico ser tardio na maior parte dos casos, assim como à multicentricidade das neoplasias não oferecendo, por isso, condições de ressectabilidade (Yoshida et al, 1994). Os CHCs desenvolvidos em indivíduos africanos ocorrem em indivíduos jovens (com pico de incidência nas terceira e quarta décadas da vida) (Falk, 1982; Muñoz e Bosch, 1987) e a associação à cirrose hepática é menos marcada do que nas outras regiões geográficas. A cirrose, quando ocorre, é normalmente do tipo macronodular e há um franco predomínio de doentes do género masculino.

Nas áreas de menor incidência, o CHC apresenta-se mais frequentemente como nódulo único, bem delimitado e por vezes encapsulado. Em casos seleccionados é possível a ressecção completa do tumor, numa fase relativamente precoce do desenvolvimento neoplásico (Yoshida et al, 1994; Szilagyi e Alpert, 1995). Nestas áreas, o CHC afecta indivíduos de idade avançada (sétima e oitava décadas da vida), está mais vezes associado à cirrose de tipo micronodular e há menor predomínio de doentes do género masculino.

CHC em Moçambique

A proximidade geográfica de Moçambique com a África do Sul e o início da exploração das minas de ouro neste último país, nos finais do século passado, estiveram na origem de correntes migratórias de moçambicanos para a África do Sul, através de contratos e acordos entre os governos dos dois países.

O recrutamento dos mineiros exigia inspecção médica adequada nos locais de origem. Esta era posteriormente confirmada, de forma sistemática, na África do Sul através de acompanhamento médico ao longo do contrato (Harington et al, 1975).

Decorrente destas medidas, uma das primeiras referências à elevada prevalência de CHC nos mineiros provenientes de Moçambique (sobretudo da região sul) surgiu com Berman (1935) e, mais tarde, Des Ligneris (1936) confirmou estas observações.

Em 1954, no decurso do Congresso de Patologia Geográfica na cidade de São Paulo (Brasil), foram apresentados e discutidos dados importantes relativos à distribuição da patologia neoplásica em África. Na sequência dessa reunião, a Comissão Executiva da União Internacional Contra o Cancro propôs a criação de duas sub-comissões, uma para a América Latina e outra para o continente Africano. A última, face ao notável contraste entre a prevalência de certos tipos de neoplasias malignas em África e em outras partes

do mundo, propôs e implementou várias iniciativas com o objectivo de obter informações mais precisas sobre a patologia neoplásica maligna no continente africano.

Posteriormente, a Comissão Executiva da Associação Nacional do Cancro da União Sul Africana convidou Moçambique a juntar-se-lhe na realização de estudos de incidência de neoplasias malignas em várias regiões da África do Sul e na cidade de Maputo (ex-Lourenço Marques).

Assim, com o apoio das autoridades portuguesas da época e da Associação Nacional do Cancro da União Sul Africana, criou-se uma brigada de prospecção dos tumores malignos em Maputo. Neste processo distinguiram-se Prates e Torres nos anos 50 e 60, tendo sido possível demonstrar que o sul de Moçambique apresentava taxas de incidência de CHC que eram das mais elevadas em todo mundo (Prates e Torres, 1965). As taxas de incidência eram na época superiores a 100 casos por 100 000 habitantes e por ano e o CHC ocorria numa população relativamente jovem. Observou-se também que, em Maputo, o CHC era responsável por mais de metade (54,4%) de todas as neoplasias malignas (Prates e Torres, 1965).

Em 1975, Harington et al publicaram os resultados de um estudo prospectivo de 8 anos (1961 a 1968) sobre neoplasias malignas desenvolvidas em trabalhadores africanos de várias proveniências, a trabalhar nas minas de ouro da África do Sul. Harington et al (1975) observaram que do total de casos de CHC diagnosticados durante o período de estudo, 69% ocorreram em indivíduos provenientes de Moçambique, 10% do Transkei (África do Sul), 4% do Malawi e 17% das restantes proveniências. A amostra populacional estudada para cada um dos países referidos foi de 709 987, 548 853, 421 497 e 1 246 124 indivíduos, respectivamente.

Em Moçambique, depois dos resultados publicados por Prates e Torres em 1965, o interesse pelo problema aumentou progressivamente, levando à realização de vários trabalhos sobre a matéria, de que se destaca o estudo prospectivo e comparativo de Van Rensburg et al (1985), realizado numa província do sul de Moçambique (Inhambane), de onde provinha um número considerável de mineiros moçambicanos, alguns distritos do norte de Maputo e a região de Transkei (África do Sul), entre 1968 e 1974. Este estudo foi feito na tentativa de encontrar as causas da elevada incidência de CHC nestas regiões relativamente às observadas noutras zonas. Os resultados revelaram-se muito semelhantes aos obtidos nos estudos anteriores feitos em Moçambique (Prates e Torres, 1965; Torres, 1966). Os estudos de Van Rensburg et al (1985) permitiram verificar uma associação entre a ocorrência de CHC e ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas, nomeadamente em Inhambane.

Moçambique tornou-se independente em 1975 e razões sócio-políticas e limitações logísticas de vária ordem não têm permitido avançar no estudo epidemiológico do CHC no país.

Como consequência desta realidade, os dados recentes sobre a epidemiologia do CHC em Moçambique são escassos e limitam-se aos provenientes do Registo do Cancro do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central de Maputo: 1970 – 1990, n=13305 (dados não publicados). Apesar das limitações inerentes ao facto de se tratar de um Registo de Cancro de base hospitalar, a informação disponível mostra que, à semelhança

do verificado nas décadas de 50 e 60 por Prates e Torres, o CHC continua a ser a neoplasia maligna mais frequente. Com base nestes dados verifica-se ainda que o CHC continua a ocorrer em indivíduos relativamente jovens e afecta mais os homens do que as mulheres. Nesta casuística, considerando conjuntamente indivíduos dos géneros masculino e feminino, o CHC contribui para 14,7% de todas as neoplasias malignas, ocupando assim o primeiro lugar. Quando analisados separadamente, em função do género dos indivíduos, verifica-se que nos homens o CHC ocupa o primeiro lugar (20,4%) e, nas mulheres, passa para a terceira posição (9,7%), superado pelo carcinoma do colo do útero (que é a neoplasia mais frequente na mulher no nosso meio) e pelo carcinoma da pele.

Estes factos levam a supor que a população do sul de Moçambique está sujeita a factores carcinogénicos potentes, com actuação precoce.

II. CONDIÇÕES E LESÕES PRÉ-MALIGNAS DO CHC

Tal como noutros órgãos, as alterações que precedem o CHC são susceptíveis de ser classificadas em condições pré-malignas e lesões pré-malignas. Nas primeiras incluem-se situações com risco aumentado de desenvolvimento de CHC ao longo do tempo. As lesões pré-malignas são consideradas precursores morfológicos de carcinoma, isto é são lesões neoplásicas (benignas) com potencialidade de evolução para lesões malignas.

No fígado, a condição pré-maligna por excelência é a **cirrose**. Todas as formas de cirrose podem associar-se ao desenvolvimento de CHC. Contudo, a associação entre CHC e cirrose é muito variável, dependendo da idade e género dos indivíduos, da região geográfica e, sobretudo, do tipo, duração e etiologia da cirrose (Bioulac-Sage, 1998). As cirroses com risco mais elevado de desenvolvimento de CHC são de tipo macronodular ou misto, desenvolvidas em indivíduos do género masculino, com idade superior a 50 anos e secundárias a infecção por VHB ou VHC.

Impõe-se no entanto salientar que a maior parte das cirroses não evoluem para CHC e, por outro lado, o CHC pode desenvolver-se em fígado não-cirrótico como ocorre em 20% a 40% dos casos (Bioulac-Sage, 1998).

No âmbito da cirrose desenvolvem-se nódulos que se individualizam pelo tamanho e características macroscópicas e microscópicas. O desenvolvimento crescente dos métodos de imagem tem permitido um avanço considerável na identificação deste tipo de lesões nodulares do fígado frequentemente desenvolvidos, como atrás se referiu, em fígados cirróticos (Ferrel et al, 1993; Terada et al, 1993).

Lesões regenerativas nodulares do fígado

As **lesões nodulares do fígado** são actualmente consideradas lesões precursoras do CHC. Contudo, na literatura há uma grande discrepância relativamente aos critérios de diagnóstico e nomenclatura destas lesões nodulares, no contexto da cirrose (Ferrel et al, 1993). Na Tabela 2 resumem-se as classificações mais importantes.

Tabela 2. Comparação da nomenclatura de lesões nodulares do fígado que ocorrem no contexto de cirrose hepática.

Edmondson e Steiner (1954)	Furuya et al (1988)	Eguchi et al (1992)	Ferrel et al (1993)
Hiperplasia adenomatosa	Macronódulo regenerativo I	Grande nódulo regenerativo	Macronódulo regenerativo
Paraplasia/CHC grau I	Macronódulo regenerativo II	Hiperplasia adenomatosa (típica ou atípica)	Nódulo "borderline"
CHC grau I a II	CHC bem diferenciado	CHC bem diferenciado	CHC bem diferenciado

Mais recentemente foi proposta uma nova classificação das lesões nodulares do fígado (IWP, 1995). De acordo com esta proposta as lesões nodulares são classificadas em dois grandes grupos: lesões regenerativas e lesões displásicas/neoplásicas. O último grupo compreende as seguintes entidades: adenoma (com risco muito baixo de transformação maligna); foco displásico; nódulos displásicos (de baixo grau e alto grau); CHC. Como se depreende desta classificação, a **displasia** é, tal como noutros modelos, a lesão pré-maligna por excelência. Ocorre no contexto de lesões nodulares do fígado (nódulos displásicos) assim como em pequenos focos. De acordo com Watanabe et al (1983) a displasia hepatocelular corresponde a dois tipos morfológicos: a displasia de grandes células (células atípicas com citoplasma amplo e relação núcleo-citoplasmática equilibrada) e displasia de pequenas células (células atípicas com núcleo hipercromático, citoplasma escasso e relação núcleo-citoplasmática elevada). De acordo com Watanabe et al (1983), a displasia de pequenas células é a que tem risco mais elevado de transformação maligna.

Os dois tipos de displasia hepatocelular associam-se ao desenvolvimento de CHC, tal como demonstrado por exemplo no estudo prospectivo realizado por Borzio et al (1995), em que se demonstrou a ocorrência de CHC em 60% dos doentes com displasia hepatocitária. No entanto, a natureza pré-maligna destas lesões tem sido questionada por alguns autores (Henmi et al, 1985; Hytioglou et al, 1995; Su et al, 1997) com base na verificação de que alterações semelhantes ocorrem em lesões regenerativas do fígado não associadas ao risco de desenvolvimento de CHC. Como consequência da falta de consenso sobre o significado biológico destas lesões, foi proposto que as mesmas fossem entretanto designadas como "alteração de grandes células" (large cell change) e "alteração de pequenas células" (small cell change) (Su et al, 1997; Bioulac-Sage, 1998).

Recentemente, a "regeneração irregular dos hepatócitos" (caracterizada por anisocitose, pleomorfismo e distribuição em mapa geográfico) foi identificada como o factor de risco mais importante do que a displasia hepatocitária para o desenvolvimento de CHC no contexto de cirrose associada a infecção VHC (Shibata et al, 1998).

III. FACTORES ETIOLÓGICOS DO CHC

Os factores mais frequentemente associados ao desenvolvimento de CHC compreendem: o género masculino; utilização de hormonas esteróides; consumo de álcool; doenças metabólicas (hemocromatose, doença de Wilson, tirosinemia, etc); cirrose hepática e/ou displasia hepatocitária; exposição a aflatoxinas e infecção crónica por vírus da hepatite B (VHB) e/ou vírus da hepatite C (VHC).

A evidência existente sugere como factores etiológicos mais importantes do CHC em Moçambique as aflatoxinas e a infecção por vírus hepatotrópicos, nomeadamente o vírus da hepatite B (VHB).

Micotoxinas

Há vários tipos de micotoxinas tais como *sterigmatocystin*, *luteoskirin* e aflatoxinas, entre outras (Anthony, 1994). Destas, as aflatoxinas são as mais importantes relativamente à toxicidade hepática. Produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, e em menor escala, por *Aspergillus parasiticus*, reconhecem-se cinco tipos de aflatoxinas: B1, B2, G1, G2 e M1 (Anthony, 1994; Montesano et al, 1997). As do tipo B1, G1 e M1 são as mais activas biologicamente e, por isso, as mais hepatotóxicas. Encontram-se amplamente distribuídas no solo e em alguns alimentos como oleaginosas e cereais, sendo contaminantes frequentes dos alimentos em climas quentes e húmidos (Anthony, 1994). Em Moçambique, vários estudos permitiram verificar a presença de teores muito elevados de aflatoxinas nos alimentos (Van Rensburg et al, 1985).

A hepatotoxicidade das aflatoxinas foi comprovada em animais, tendo-se verificado que estas micotoxinas condicionam lesões necro-inflamatórias assim como displásicas e CHC (Svoboda et al, 1966; Kaplanski et al, 1997).

A literatura fornece evidência que aponta fortemente para a possibilidade das aflatoxinas serem também hepatotóxicas para o fígado humano (Van Rensburg et, 1985; Lunn et al, 1997; Montesano et al, 1997).

A exposição a aflatoxinas, avaliada pela quantificação de aflatoxina ligada à albumina sérica, varia consideravelmente consoante as regiões. Em países africanos como Gâmbia, Senegal e Quênia, os níveis serológicos desta substância são muito altos variando entre 40 a 50 pg/mg de albumina. No Sudeste Asiático os valores variam entre de 10 e 40 pg/mg, enquanto na europa, EUA e Egipto são inferiores a 8 pg/mg (Montesano et al, 1997).

Num estudo feito na Gâmbia (África Ocidental) foram identificados produtos do metabolismo de aflatoxinas no sangue de fetos de mães expostas a estas micotoxinas durante a gravidez (Wild et al, 1991). Esta verificação sugere que o efeito hepatotóxico destas substâncias começa a actuar precocemente, durante a vida intra-uterina.

A acção carcinogénica das aflatoxinas, nomeadamente as do tipo B1, parece depender da toxicidade induzida por um produto intermediário do seu metabolismo, aflatoxina 8,9-

epóxido (McGlynn et al, 1995). Esta substância é metabolizada por duas enzimas designadas na literatura anglo-saxónica por “microsomal epoxide hydrolase” e “glutathione S-transferase”, cuja actividade enzimática é condicionada geneticamente.

Estudos feitos em indivíduos com deficiência destas enzimas revelaram que estes têm um risco muito aumentado de desenvolvimento de CHC e que a frequência de mutações do codão 249 do gene p53 é elevada nos tumores (McGlynn et al, 1995).

Vírus hepatotrópicos

Vírus da hepatite B

Entre os vírus hepatotrópicos há a destacar o vírus da hepatite B (VHB) e, em menor escala, o vírus da hepatite C (VHC). O VHB é o mais conhecido e melhor estudado. São inúmeros os estudos epidemiológicos, de biologia e genética molecular que associam fortemente a infecção por VHB com CHC (Kew, 1981; Yeh et al, 1989; Wang et al, 1990; Kim et al, 1991; Goldblum et al, 1993; Ikeda et al, 1993; Teramoto et al, 1994; Kaczanski et al, 1995; Feitelson e Duan, 1997; Jakubczak et al, 1997; Su et al, 1997).

O VHB pertence ao grupo dos vírus animais conhecidos por hepadnavirus, designação resultante de características comuns aos elementos constitutivos do grupo: vírus de ADN com marcado hepatotropismo (Tiollais et al, 1985; Summers, 1987; Robinson et al, 1987). Os outros membros do grupo são o vírus da hepatite da *Marmota monax*, o vírus da hepatite do Esquilo Selvagem e o vírus da hepatite do Pato de Pequim, respectivamente designados na literatura anglo-saxónica por Woodchuck hepatitis virus (WHV), Ground squirrel hepatitis virus (GSHV) e Pekin duck hepatitis virus (DHBV) (Robinson et al, 1987; Summers, 1987).

O virião completo do VHB, também conhecido por partícula de Dane, mede 42 nm e é constituído por:

- envólucro externo composto por proteínas, lipídeos e hidratos de carbono. As proteínas encontram-se na forma glicosilada e não-glicosilada entre as quais se identifica uma proteína “major” (codificada pelo gene S) e menores quantidades de 2 outros polipeptídeos, um codificado pela região pré-S2 e gene S e outro codificado pelas regiões pré-S1, pré-S2 e gene S, ambos com um comprimento variável entre 398 e 400 aminoácidos, variabilidade esta que determina os diferentes serótipos do VHB (Tiollais et al, 1985).

- nucleocápside que contém uma proteína “major” - (peptídeo do “core”), intimamente ligada ao genoma vírico (Michael e Tiollais, 1987).

- genoma de ADN que é circular, parcialmente de cadeia dupla, constituído por uma cadeia externa de ADN (longa) com 3200 nucleotídeos de comprimento, descontínua num ponto (“nick”) e por uma cadeia interna de ADN (curta) (50% a 100% do comprimento total da anterior) (Hoofnagle e Schafer, 1986; Miller et al, 1989). A configuração circular é mantida pela sobreposição de aproximadamente 225 pares de bases nas extremidades 5’ das duas cadeias simples de ADN.

A totalidade da informação genética do VHB encontra-se na cadeia longa, localizada em quatro regiões sem codões de terminação, designadas na literatura anglo-saxónica por "open reading frames" (ORF): S- codifica a proteína "major" do envólucro externo ("surface"); C- codifica a proteína P22c da nucleocápside ("core"); P- codifica a polimerase do ADN dependente do ARN (transcriptase inversa); X- codifica uma pequena proteína com função transactivadora. Para além destas regiões, já foram identificadas mais duas ORFs: ORF5 localizada na cadeia longa de ADN e ORF6 localizada na cadeia curta de ADN (Miller et al, 1989; Goodman, 1997).

Em circulação podem encontrar-se partículas víricas compreendendo viriões completos ou partículas de Dane com 42 nm (com total capacidade de transmissão da doença) e material do envólucro vírico em excesso, de configuração esférica (22 nm) ou filamentosa (22 nm X 50 -100 nm) que não contém ADN e, por tal, não é infeccioso.

No soro dos doentes infectados por VHB podem-se detectar várias partículas víricas: antigénios de superfície (AgHBs), antigénio resultante da clivagem da proteína do "core" (AgHBe) assim como os respectivos anticorpos: anti-HBs e anti-HBe. Podem ainda detectar-se anticorpos anti-HBc e anti-HBx, partículas de ADN e a polimerase do VHB (Gayotto e Bogliolo, 1994; Goodman, 1997). A expressão serológica destas substâncias depende da fase da infecção. Na fase precoce, aguda ou replicativa, observam-se geralmente os seguintes marcadores: AgHBs, AgHBe, anti-Hbe, anti-HBc, anti-HBx e polimerase do ADN viral. Em fases tardias da doença alguns casos exprimem AgHBs/anti-HBs e/ou anti-HBc e anti-HBe (Gerber e Thung, 1987). Na fase terminal pode não haver nenhum marcador serológico da infecção. Nestes casos a única forma de documentar a infecção pelo VHB é a demonstração de ADN viral integrado no ADN do hospedeiro através de técnicas de genética molecular (Moriarty et al, 1985; Wang et al, 1990; Goodman, 1997).

Nas zonas endémicas de infecção por vírus da hepatite B a infecção ocorre precocemente, sendo muitas vezes transmitida verticalmente (da mãe para filho). Nessas áreas, mais de 8% da população é portadora crónica de infecção por VHB (Goodman, 1997). Moçambique é uma área endémica relativamente à infecção por VHB e a prevalência de portadores crónicos é de cerca de 20 %, independentemente da região do país (Barreto et al, 1991).

Evidência que apoia a associação entre a infecção crónica por VHB e CHC

1. Evidência Epidemiológica

1.1. Distribuição geográfica

Há uma grande coincidência entre a distribuição geográfica do CHC e a áreas endémicas de infecção por VHB, esta avaliada pela elevada prevalência de portadores de AgHBs, facto que constitui uma evidência a favor do papel do VHB na carcinogénese hepática (Kew et al, 1980; London, 1981; Miyagawa et al, 1996; Goodman, 1997; Tsai et al, 1997; Bréchet et al, 1998; Okada et al, 1998).

1.2. Estudos retrospectivos

Estudos retrospectivos dos marcadores séricos de infecção por VHB permitiram verificar que tanto nas áreas de incidência elevada de infecção como nas de incidência intermédia, o CHC se desenvolve mais frequentemente em indivíduos portadores de AgHBs, ou com sinais de infecção passada pelo VHB, do que nos controlos (Tabela 3), (London, 1981; Muñoz e Bosch, 1987; Feitelson e Duan, 1997).

Tabela 3. Infecção por VHB e desenvolvimento de CHC (estudo de caso-controlo).

Regiões Geográficas	Nº indivíduos		AgHBs +		Risco Relativo
	CHC	Controlo	CHC	Controlo	
Zonas de Alto Risco					
África do Sul	289	213	61,6	11,3	12,6
China	50	50	86,0	22,0	17,0
Filipinas	104	84	70,0	18,0	10,8
Hong Kong	107	107	82,0	22,0	21,3
Senegal	165	328	61,2	11,3	21,4
Zonas de Risco Intermediário					
Grécia	194	451	45,9	7,3	10,7
Zonas de Baixo Risco					
EUA	86	161	17,9	0,0	ND

[Adaptado de Muñoz N, Bosch X. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. ND valor não determinável por causa do valor (0,0) do controlo. In: Okuda K, Ishak KA, eds. Neoplasms of the liver. New York, Springer - Verlag, 1987].

Esta situação não é uniforme em todo o mundo já que em algumas regiões como a Gronelândia e o Egipto, assim como em algumas zonas da América do Sul, apesar da elevada prevalência de infecção pelo VHB, a incidência de CHC é relativamente baixa (London, 1981; Muñoz e Bosch, 1987; Anthony, 1994). As causas subjacentes a esta verificação epidemiológica não estão esclarecidas. Estes factos podem ser indicativos de que a infecção por VHB não é suficiente para o desenvolvimento CHC e que, em determinadas circunstâncias, há necessidade da participação de outro(s) agente(s) carcinogénico(s) (London, 1981; Melbye et al, 1984; Anthony, 1994).

1.3. Estudos prospectivos

Em estudos prospectivos como o conduzido por Beasley et al (1981), que incluiu 22 707 chineses de Taiwan, verificou-se que os indivíduos portadores de AgHBs possuem um risco relativo de desenvolvimento de CHC de 223, que é um risco extremamente elevado.

1.4. Estudos comparativos

Estudos comparativos entre grupos de doentes AgHBs "positivos" e grupos de controlo (constituídos por indivíduos AgHBs "negativos") realizados em regiões geográficas distintas, mostraram um risco relativo elevado de desenvolvimento de CHC em doentes AgHBs "positivos" (Lam et al, 1982; Lu et al, 1988; Sakuma et al, 1988). Por exemplo, Goodman (1997) refere que o risco de desenvolvimento de CHC em indivíduos portadores crónicos do VHB é 100 vezes mais elevado do que em indivíduos não-portadores.

Recentemente, verificou-se que o risco de desenvolvimento de CHC em doentes com cirrose e AgHBs "positivos" é 10 vezes maior do que o de doentes sem cirrose mas com sinais de infecção crónica por VHB (Idilman et al, 1998).

1.5. CHC em crianças

O CHC é raro nas crianças, mesmo nas regiões endémicas. Quando ocorre na idade pediátrica, o CHC afecta quase exclusivamente crianças com sinais de infecção por VHB, geralmente nascidas de mães portadoras de AgHBs (Tanaka et al, 1986; De Potter et al, 1987; Hsu et al, 1987).

Moore et al (1997), num estudo de 6 crianças (média de idades de 13 anos) com CHC, detectaram AgHBs no soro em 3 casos (50%).

Em Taiwan (área de incidência elevada), introduziu-se um programa de vacinação contra o VHB em crianças no período entre 1981 e 1994 (Chang et al, 1997). No fim do programa observou-se que a incidência de CHC em crianças diminuiu para 0,70, para 0,57 e 0,36 casos por 100 000 crianças por ano, incidências estas correspondentes, respectivamente, aos períodos de 1981 a 1986, de 1986 a 1990 e, finalmente, de 1990 a 1994.

2. Evidência morfológica

2.1. Presença de antígenos do VHB

Através de técnicas de imunocitoquímica tem-se demonstrado a expressão de antígenos virais, nomeadamente AgHBs e AgHBc, no tecido hepático adjacente a CHCs. Esta associação é muito evidente em áreas endémicas como Taiwan e China (Ilardi et al, 1980; Hsu et al, 1983) com taxas que vão desde 84,1% até 100% (esta última em fígados cirróticos).

Nas áreas de baixa incidência de CHC, nomeadamente nos EUA, observou-se a expressão de AgHBs no fígado adjacente a CHCs, em 5% de fígados não-cirróticos e 21% de fígados cirróticos (Peters et al, 1977).

Hsia et al (1992) detectaram AgHBs em tecido hepático adjacente a CHCs em 87% de doentes chineses (Qidong – área de prevalência “elevadíssima” de infecção por VHB) e em 20% de doentes dos EUA (área de incidência baixa de infecção por VHB).

Em alguns estudos foi também possível demonstrar a expressão de antígenos do VHB em células neoplásicas de CHC. A expressão de AgHBs nas células tumorais não ultrapassa 25% na África do Sul (Kew et al, 1980) e 37% em Taiwan (Hsu et al, 1988). A expressão concomitante de AgHBc nas células neoplásicas também foi demonstrada, embora numa percentagem inferior (Hirohashi et al, 1982; Suzuki et al, 1985; Hsu et al, 1988).

2.2. Associação à cirrose hepática e lesões precursoras do CHC

A maior parte dos CHCs (60% a 80%) desenvolve-se em fígados com cirrose (Colombo, 1995; Szilagyi e Alpert, 1995; Ishak e Markin, 1996; Goodman, 1997).

Contudo, a associação da cirrose com CHC varia consoante as populações em estudo. No Sudeste Asiático, a associação é mais forte do que na África ao Sul do Saara e a cirrose é do tipo macronodular. Nas áreas de menor incidência de CHC, como a Europa do norte e EUA, esta associação é muito mais forte e a cirrose é do tipo micronodular (Falk, 1982; Yoshida et al, 1994).

Em Moçambique, 60% dos CHC associam-se a cirrose de tipo macronodular (Torres, 1966).

É também no contexto de cirrose hepática que surge a maior parte das designadas lesões precursoras do CHC. Em cirroses hepáticas associadas a infecção por VHB, Terada et al (1993) observaram hiperplasia adenomatosa (nódulo displásico de baixo grau), hiperplasia adenomatosa atípica (nódulo displásico de alto grau) e CHC em 16%, 1,9% e 69,9% dos casos, respectivamente. No mesmo estudo, os valores correspondentes para a cirrose de etiologia alcoólica foram de 3,8%, 0%, e 38,5%, respectivamente. Estes resultados sugerem que as lesões nodulares do fígado, que surgem no contexto da cirrose hepática associada à infecção por VHB, têm risco aumentado para o desenvolvimento de CHC e indicam que estas lesões são de natureza pré-neoplásica (Theise et al, 1992), correspondendo provavelmente a neoplasias benignas já iniciadas, isto é, a lesões pré-malignas.

3. Modelos animais (Patologia Experimental)

A infecção por hepadnavírus em animais fornece dados importantes para a compreensão da associação entre a infecção por VHB e CHC. Como já foi anteriormente referido, o grupo dos hepadnavírus inclui, para além do VHB, o vírus da hepatite da *Marmota monax*, o vírus da hepatite do Esquilo Selvagem e o vírus da hepatite do Pato de Pequim (Summers, 1987). As três espécies de vírus condicionam lesões semelhantes às observadas na infecção por VHB, no homem, que vão desde o estado de portador, passando por hepatite aguda, hepatite crónica e, finalmente, CHC (Popper et al, 1982).

Todos os animais que acabam por desenvolver CHC são portadores crónicos do vírus da hepatite, não se tendo observado CHC em animais com infecções transitórias (Popper et al, 1987).

Em ratinhos transgénicos foi demonstrada uma associação entre o aumento da expressão do polipeptídeo “major” do envólucro do VHB e CHC. Neste modelo observou-se também que a malignização se relacionava com a duração da infecção, intensidade da inflamação e hiperplasia regenerativa (Chisari et al, 1989). No mesmo estudo observou-se que, sob o efeito do polipéptido “major” do envólucro, os ratinhos transgénicos desenvolviam CHC ao fim de 24 meses.

4. Evidência molecular

Actualmente, com a possibilidade de uso de técnicas de biologia molecular, tem sido demonstrada a presença do ADN do VHB em estado episomal e/ou integrado nas células neoplásicas e não neoplásicas adjacentes a CHCs (Rijntjes et al, 1985; Tozuka et al, 1989; Lai et al, 1990; Kaplasnski et al, 1997).

Bréchet et al (1998) detectaram ADN de VHB no soro (33%) e tecido hepático (47%) de doentes AgHBs “negativos”, numa série de 503 doentes com CHC. No mesmo estudo as taxas correspondentes em doentes AgHBs “positivos”, foram de 82% e 91%, respectivamente.

Apesar de haver resultados discordantes entre várias séries no que diz respeito à percentagem de casos com ADN viral integrado, há evidência de que uma elevada percentagem de CHCs associados a infecção por VHB contém ADN viral integrado no genoma do hospedeiro, quer em doentes AgHBs “negativos” quer em doentes AgHBs “positivos” (Bréchet et al, 1998). No entanto, não tem sido possível demonstrar padrões específicos de integração de ADN viral no CHC (Dejean et al, 1986; Imazeki et al, 1986; Bréchet, 1998).

Porém, o uso de sondas sub-genómicas permitiu demonstrar que as sequências de ADN viral que codificam a proteína X e/ou as proteínas truncadas do envólucro Pré S2/S são as que se encontram presentes na maior parte dos casos (Chen et al, 1988; Bréchet, 1998; Bréchet et al, 1998).

A integração do ADN do VHB no genoma do hospedeiro sugere que possa haver desregulação da expressão de oncogenes ou genes oncosuppressores. Por exemplo, na hepatite viral da *Marmota monax* (por WVH) e do Esquilo selvagem (por GSHV) verificou-se *cis*-activação de oncogenes, nomeadamente *N-myc* e *C-myc* (Bréchet, 1998; Bréchet et al, 1998).

No fígado humano, a integração do ADN do VHB no genoma do hospedeiro é aleatória, e a activação de oncogenes não é comum. Contudo, já foi verificada a integração de ADN viral na vizinhança de determinados genes, como o gene da ciclina A e genes dos receptores de ácido retinóico (Lee et al, 1988; Okuda 1992; Feitelson e Duan, 1997). Verificou-se também a integração de fragmentos sub-genómicos de ADN viral perto da região que codifica receptores de glicocorticóides e hormonas esteróides, o que pode

explicar a maior incidência do CHC em indivíduos do género masculino (Dejean et al, 1986).

A integração de ADN do VHB no genoma do hospedeiro associa-se ocasionalmente a perda de heterozigotia (cromossoma 8p), sugerindo a existência de instabilidade genómica (Becker et al, 1996).

A proteína X do VHB (AgHBx), codificada pelo gene X do VHB, liga-se a vários factores de transcrição, actuando como co-activadora em células infectadas (Feitelson e Duan, 1997). Esta proteína tem papel primordial na activação dos genes do VHB, acção crucial para o estabelecimento e a persistência da infecção. Por exemplo, o WHV sem a proteína X é incapaz de estabelecer uma infecção crónica em animais de experiência (Feitelson e Duan, 1997).

A acção da proteína X é actualmente considerada crucial, sendo mediada por vários mecanismos: 1) estimulação directa da proliferação celular; 2) inactivação de factores de regulação da proliferação celular, como o gene p53, neste caso ligando-se ao produto deste gene com constituição de complexos p53-AgHBx, sem causar mutações, pelo menos nos exões 5 a 8 (Greenblatt et al, 1997); 3) aumento da resistência das células AgHBx “positivas” à apoptose; 4) inactivação de um ou mais mecanismos de reparação de ADN, permitindo a acumulação de mutações adicionais durante os processos de regeneração celular (Benn e Schneider, 1994; Natoli et al, 1994; Benn e Schneider, 1995).

A activação de factores de transcrição através da proteína X não envolve a ligação directa a sequências específicas do ADN do hospedeiro. É, outrossim, mediada pela activação de outros factores de transcrição tais como as proteínas *NF-kB*, AP-1 e CREB (Bréchet, 1998).

Recentemente demonstrou-se que a proteína X se liga a uma sub-unidade do complexo de proteosoma sugerindo que este também pode ser alvo funcional da proteína em células infectadas por VHB (Ciechanover et al, 1991; Palombella et al, 1994).

Para além das alterações anteriormente referidas, a proteína X aumenta a expressão de receptores do tipo I e II do IGF “insulin-like growth factor” em linhas celulares de CHC. A confirmar-se esta associação *in vivo*, em CHCs, é de presumir que a acção da proteína X poderá contribuir para a regulação autócrina da proliferação celular (Kim et al, 1996)

Na Figura 1 esquematiza-se o modelo da hepatocarcinogénese associado a infecção por VHB.

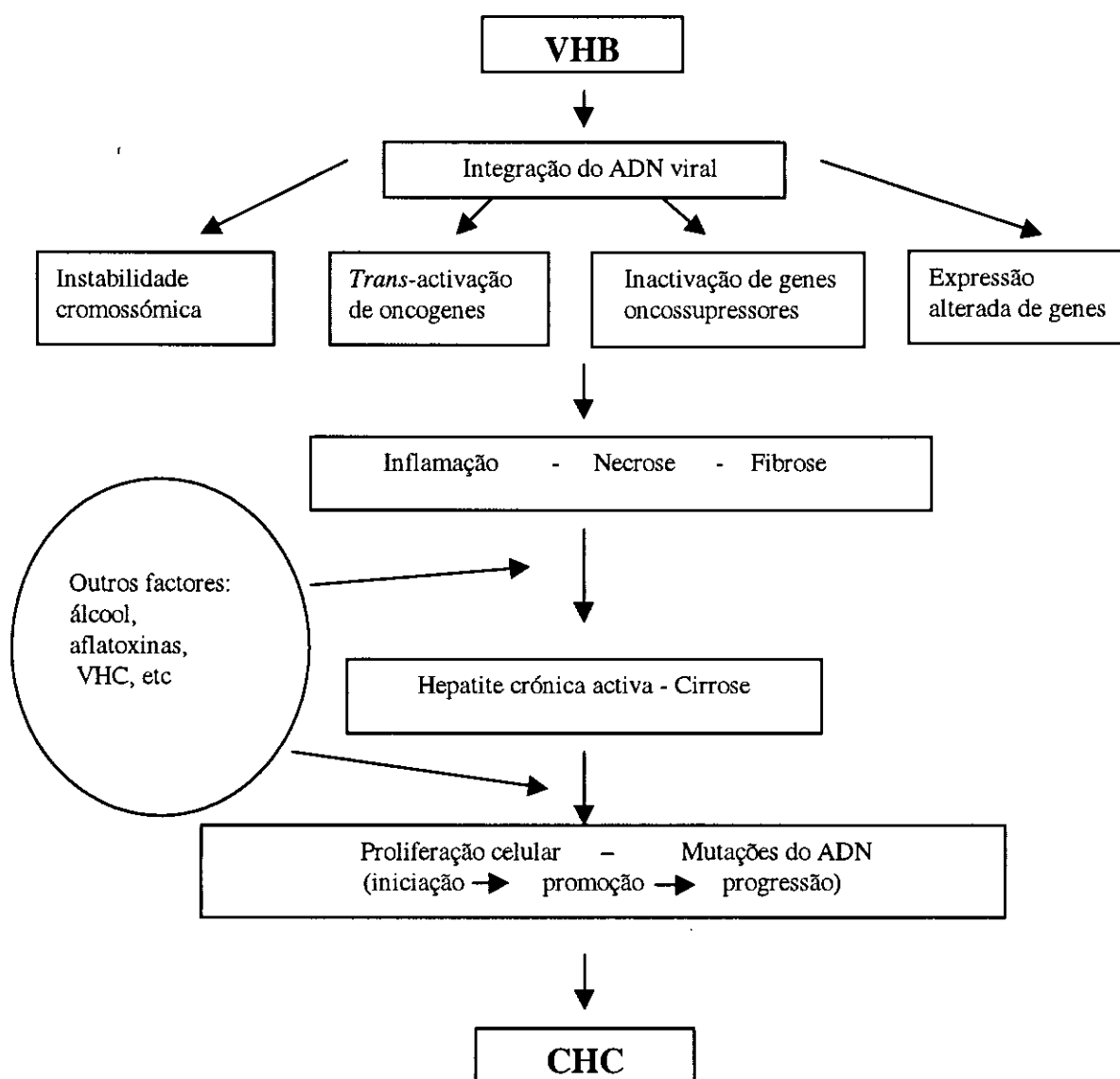


Figura 1. Modelo de hepatocarcinogénese por VHB. [Adaptado de Idilman et al, 1998].

Vírus da Hepatite C

Em relação ao VHC foi também demonstrada uma associação com o CHC, sobretudo em países como Japão, Espanha e Itália, entre outros (Tsukuma et al, 1993; Caselmann e Alt, 1996; Saito et al, 1997; Tsai et al, 1997). Nos países da bacia mediterrânica como Itália, Espanha e França, as taxas de infecção por VHC em CHCs variam entre 58% e 75% (Bruix et al, 1989; Tsukuma et al 1993; El-Refaie et al, 1996; Giacosa e Hill, 1996; Miyagawa et al, 1996; Idilman et al, 1998).

O VHC é um vírus de ARN com cerca de 30 a 40 nm, constituído por uma nucleocápside (composta por unidades do core) (Takahashi et al, 1992) envolvida por um envólucro lipoproteico (Kanto et al, 1994, Goodman, 1997) onde se encontram duas glicoproteínas (E1 e E2). Este complexo glicoproteico envolve uma cadeia simples de ARN (Shindo et al, 1994). As proteínas do core, E1 e E2 são proteínas estruturais do

VHC. Além destas, o genoma do VHC codifica outro tipo de proteínas, estas não-estruturais, que são essenciais para a translação e replicação do vírus (Takahashi et al, 1992; Kanto et al, 1994; Shindo et al, 1994; Goodman, 1997).

Em indivíduos infectados por VHC podem detectar-se anticorpos anti-VHC no soro (Goritsas et al, 1995; Goodman, 1997). Estes anticorpos podem circular sob a forma de complexos, ligados a lipoproteínas (van Doorn et al, 1994).

Niu et al (1995) observaram sinais de replicação do VHC, em tecido neoplásico e não-neoplásico de um doente com CHC, facto que suporta a hipótese da associação entre VHC e CHC. Neste mesmo estudo, assim como num outro mais recente efectuado por Bréchet et al (1998), verificou-se que o subtipo do VHC mais frequentemente associado ao desenvolvimento de CHC é o 1b.

O VHC não possui oncogenes conhecidos e, no decurso da replicação viral não há integração do vírus no genoma do hospedeiro (Schluger e Bodenheimer, 1995). Foi por isso sugerido que a acção carcinogénica fosse mediada pelo desenvolvimento de cirrose (Colombo, 1995; Goritsas et al, 1995; Niu et al, 1995; Saito et al, 1997). De facto, Takano et al (1995), estudaram prospectivamente 124 doentes com infecção crónica por VHC e, do total de 13 doentes que desenvolveram CHC, 12 (92,3%) apresentavam cirrose.

O intervalo de tempo que decorre entre a infecção por VHC e o diagnóstico de CHC varia entre 7 a 30 anos, indicando que nestes casos a carcinogénese associada a VHC é um processo de longa duração (Giacosa e Hill, 1996).

Em contrapartida, El-Refaie et al (1996) detectaram a presença de ARN do VHC em quatro CHCs desenvolvidos em fígado não-cirrótico. Esta verificação levanta a possibilidade do VHC poder ser, por si só, carcinogénico para o fígado humano. Esta hipótese é reforçada pela demonstração recente de que a extremidade 5' da sequência que codifica a proteína não estrutural do VHC, conhecida como NS3, tem potencial oncogénico pois tem capacidade de transformação *in vitro* de fibroblastos de rato transfectados (Sakamuro et al, 1995). Recentemente Moriya et al (1998) demonstraram que a expressão da proteína do "core" do VHC no tecido hepático induz alterações morfológicas e bioquímicas que resultam no desenvolvimento de CHC em modelos animais (ratinhos transgénicos). Estes resultados apoiam a hipótese do envolvimento directo VHC na carcinogénese hepática.

Na Figura 2 apresenta-se, de forma esquemática, o modelo de hepatocarcinogénese associado a infecção por VHC.

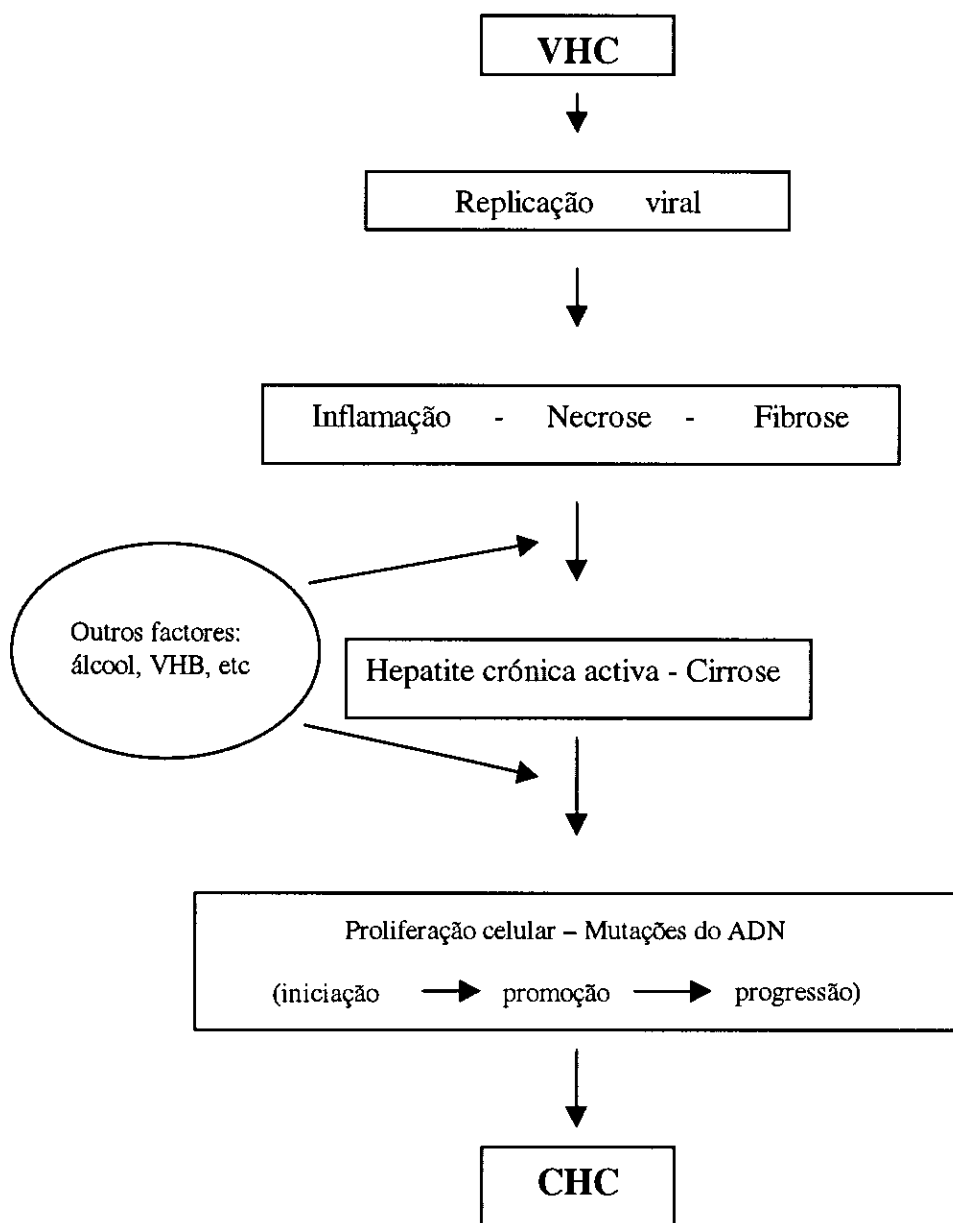


Figura 2. Modelo de hepatocarcinogénese por VHC. [Adaptado de Idilman et al, 1998].

IV. ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E DE EXPRESSÃO DO GENE p53 NO CHC

1. Estrutura e função do gene p53 e da proteína por ele codificada

O gene da proteína p53 foi identificado em 1979 por um grupo de virologistas no decurso de experiências com o vírus SV40 (Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine, 1979). Este gene localiza-se no cromossoma 17p13 e é constituído por 11 exões (Isobe et al, 1986). Na sua forma "selvagem" (wild-type), o gene p53 codifica uma proteína de 393 aminoácidos e 53 KiloDaltons (a proteína p53). Esta proteína desempenha funções extremamente importantes na regulação do ciclo celular (Harris, 1996), nomeadamente através da sua frenagem no fim da fase G1 sempre que ocorrem lesões do ADN. Esta paragem do ciclo celular permite que as células procedam à reparação dos referidos erros do ADN. Se os mesmos não forem corrigidos, a proteína p53 induz a apoptose (morte programada de células) protegendo assim as células, os tecidos e o organismo, da ocorrência de erros genómicos que poderiam mais tarde originar clones neoplásicos. O reconhecimento da importância do gene p53 na vigilância da integridade genómica levou a que este gene fosse designado como o "guardião" do genoma (Lane, 1992; Lane et al, 1994) e a proteína por ele codificada foi considerada, em 1993, como a "proteína do ano".

A inactivação do gene p53 verifica-se quando há alteração de ambos os alelos. O conjunto das características referidas permite classificar o gene p53 como gene oncosupressor.

O gene oncosupressor p53 é o que mais frequentemente se encontra mutado em neoplasias humanas tais como as do pulmão, mama, cólon, esófago, estômago e outras (Bartek et al, 1991; Caron e Soussi, 1992; Vogelstein e Kinzler, 1992; Levine et al, 1993; Greenblatt et al, 1994; Harris, 1996; Kang et al, 1998).

Mutações que alteram as funções do gene p53 ocorrem especialmente na porção hidrofóbica e intermédia do gene, sobretudo entre os aminoácidos 110 e 290, (Hollstein et al, 1991; Levine et al, 1991; Greenblatt et al, 1994).

A maior parte destas mutações são do tipo "misense" e surgem através do mecanismo designado na literatura anglo-saxónica por "slipped mispairing" levando a deleções e/ou inserções de bases (Krawczak e Cooper, 1991; Jegou et al, 1993).

Normalmente a proteína p53 não é detectável por imunocitoquímica porque tem um "turn-over" muito rápido. A sua vida média é de cerca de 6 a 20 minutos (Nagao et al, 1995). No entanto, em determinadas circunstâncias há expressão aumentada da proteína p53 "selvagem" (wild-type) o que permite a sua detecção por imunocitoquímica. Tal verifica-se por exemplo em células hematopoiéticas humanas irradiadas com raios gama que provocam lesões do ADN. Neste caso pode observar-se positividade nuclear "para" p53 em algumas destas células (Kuerbitz et al, 1992).

Quando há mutações do gene p53, a proteína por ele codificada tem uma estrutura alterada e é funcionalmente inactiva. Simultaneamente, como é anormal, a proteína p53

não se “gasta” e é detectada por técnicas de imunocitoquímica (Nagao et al, 1995). Daqui resulta um aparente paradoxo: quando se observa imunorreactividade marcada “para” p53 isto geralmente significa que a proteína é inactiva.

2. Alterações do gene p53 em CHCs

Vários estudos mostraram que, no CHC, a prevalência das alterações do gene oncosupressor p53 variam de acordo com a região geográfica e com os factores de risco para o desenvolvimento neoplásico. As mutações do gene p53 são frequentes (≈50%) em CHCs desenvolvidos em regiões de elevada incidência desta neoplasia, onde a infecção por VHB e a exposição a aflatoxinas são particularmente elevadas (Bressac et al, 1991; Hsu et al, 1991; Ozturk, 1991; Scorsone et al, 1992; Unsal et al, 1994).

No Japão, onde a infecção por VHB é muito prevalente mas a exposição a aflatoxinas é baixa, foi observada uma frequência de mutações do gene p53 de 29% (Oda et al, 1992). Resultados semelhantes foram encontrados em casos de CHC de doentes oriundos da China e África do Sul (Unsal et al, 1994). Em contrapartida, as mutações do gene p53 são raras nos países europeus (10 a 15%), onde a infecção por VHB e a exposição a aflatoxinas são muito baixas (Kress et al, 1992; Montesano et al, 1997).

Em CHCs associados à exposição a aflatoxinas, a mutação mais frequente (de tipo transversão) afecta o codão 249 do exão 7 do gene p53 (Hsu et al, 1991). Esta mutação tem assim sido apontada como um “marcador” molecular da exposição às aflatoxinas (Ozturk, 1991; Harris, 1996; Montesano et al, 1997). A sua ocorrência em CHCs de doentes oriundos de Moçambique sugere que as aflatoxinas desempenham um papel importante na carcinogénese hepática naquela região (Unsal et al, 1994).

Alterações do gene p53 também podem ocorrer em CHCs associados a infecção por VHC, tal como verificado numa série de 8 CHCs em que foi identificada a transversão G-T no codão 249 do gene p53 (Teramoto et al, 1994).

V. INSTABILIDADE DE SEQUÊNCIAS MICROSSATÉLITES E CHC

Já se referiu o papel do gene p53 e da proteína por ele codificada na regulação do ciclo celular através da frenagem do mesmo - dando oportunidade que as enzimas de reparação do ADN actuem - ou através da indução da apoptose, sempre que as alterações genómicas “ultrapassem” um certo limiar. Muitos outros genes, para além do p53, estão envolvidos neste processo de “estabilização genética”.

Ao longo dos últimos anos acumulou-se evidência de que vários tipos de genes envolvidos na reparação de erros de replicação do ADN, designados na literatura anglo-saxónica por “mismatch repair genes”.

No homem foram identificados seis genes principais de reparação dos erros de replicação do ADN: *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, *hMSH3* e *GTBP*. A mutação destes genes em células germinativas está associada ao carcinoma hereditário do cólon e recto não associado à polipose e, em menor escala, ao carcinoma esporádico, também do cólon e

do recto, assim como a carcinomas de outros órgãos (Fishel et al, 1993; Bronner et al, 1994; Chung e Rustgi, 1995; Fishel e Kolodner, 1995; Liu et al, 1995; Palombo et al, 1995; Konishi et al, 1996).

Quando há alteração nestes genes de reparação dos erros de replicação do ADN ou nas proteínas por eles codificadas ou quando, sem haver alterações dos genes ou das proteínas, existem factores ambientais que provocam um aumento do número de erros de replicação, as células proliferadas apresentam instabilidade genética, isto é, passam a transmitir às células filhas, e estas às suas filhas, e assim sucessivamente, ADNs diferentes (ADNs com erros de replicação).

Este tipo de instabilidade genética afecta, de forma particular, sequências de ADN designadas por "microsatélites". É por isso designada por instabilidade de sequências microsatélites (ISM).

Os microsatélites são sequências repetitivas de 2 a 6 nucleotídeos, localizados principalmente nas regiões não codificantes do genoma eucariótico e cuja função exacta se desconhece. Os microsatélites mais abundantes do genoma são constituídos por sequências repetitivas de dinucleotídeos, nomeadamente citosina e adenina (CA – "repeats"). Na replicação do genoma em geral, e das sequências de microsatélites em particular, podem ocorrer erros de alinhamento das cadeias de ADN, por deficiência da polimerase do ADN (Henderson e Petes, 1992; Kunkel, 1993; Strand et al, 1993). Estes erros, se não forem reparados (por falência do sistema de reparação do ADN) condicionam o aparecimento de alelos de tamanhos diferentes, susceptíveis de serem identificados por métodos moleculares, nomeadamente através de electroforese em gel dos produtos de amplificação de sequências microsatélites, obtidos por PCR.

Apesar dos microsatélites serem muito polimórficos na população geral, o seu padrão é altamente conservado no mesmo indivíduo. O conhecimento destes factos levou ao desenvolvimento de métodos de pesquisa de ISM. Pelo método "clássico", a ISM é pesquisada através da comparação dos produtos de PCR obtidos de um tumor com o tecido normal (usado como controlo) após electroforese em gel. O aparecimento de novos alelos na(s) amostra(s) de tumor permite identificar a presença de ISM. Mais recentemente foram identificados marcadores monomórficos (BAT-26, por exemplo) que são muito estáveis em tecidos normais. Em neoplasias, quando há ISM observa-se o aparecimento de novos alelos que se distinguem claramente dos alelos normais. Este facto permite a pesquisa de ISM, pelo BAT-26, usando apenas tecido tumoral (sem requerer a utilização de um controlo de tecido normal).

A ocorrência de ISM caracteriza o designado fenótipo "mutador" ou fenótipo positivo para erros de replicação (RER +). Este fenótipo é característico de carcinomas do cólon e recto hereditários que ocorrem no contexto da síndrome de Lynch (Aaltonen et al, 1994; Lothe, 1997). O fenótipo RER+ tem sido também identificado em neoplasias malignas esporádicas (Peltomaki et al, 1993; Santos et al, 1996) e recentemente foi descrito em condições pré-malignas do tubo digestivo, nomeadamente na colite ulcerosa (Brentnall et al, 1996) e metaplasia intestinal que ocorre na mucosa gástrica (Semba et al, 1996; Hamamoto et al, 1997).

Tanto quanto é do nosso conhecimento, são escassos os trabalhos publicados sobre a pesquisa de ISM em CHC. Num dos trabalhos mais recentes, realizado por Kazachkov et al (1998), verificou-se a presença de ISM em 4 de 10 CHCs (40%). Nesta série verificou-se que dos 4 casos de CHC com ISM só um é que tinha alterações do gene p53. Estes resultados sugerem que não há correlação entre a ISM e as alterações do gene p53 como aliás se verificou anteriormente em relação ao carcinoma do estômago e do cólon (Strickler et al, 1994; Kahlenberg et al, 1996; Konishi et al, 1996).

MacDonald et al (1998), no estudo de uma série de 46 CHCs, detectaram ISM em 16 casos (34,8%).

A demonstração de ISM em lesões pré-malignas de vários órgãos justificou que se prestasse uma atenção particular à situação que, no homem, frequentemente se associa ao CHC - a cirrose hepática. Salvucci et al (1996) detectaram ISM em 60% de casos de cirrose hepática associada a infecção por VHB sugerindo que, nestes casos, a ocorrência de ISM pudesse constituir um factor de risco para o desenvolvimento de CHC.

VI. ALTERAÇÕES DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM LESÕES PRÉ-MALIGNAS E CHC

O crescimento de uma neoplasia depende, em grande parte, do equilíbrio entre dois processos: proliferação celular (geralmente aumentada) e apoptose (por vezes diminuída). O aumento da proliferação celular ocorre também em condições e lesões pré-malignas, constituindo um factor de risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas. No fígado esta verificação foi confirmada por Borzio et al (1998), no estudo de uma série de 176 doentes com cirrose hepática, alguns deles com displasia. Borzio et al (1998) avaliaram a proliferação celular através do estudo de AgNORs (marcação pela prata de "nucleolar organizer regions"). Os autores verificaram que o índice proliferativo (IP) era significativamente mais elevado nos casos de cirrose com displasia do que naqueles em que a displasia estava ausente. Borzio et al (1998) verificaram, ainda, que um IP elevado era um factor de risco independente para o desenvolvimento de CHC.

O aumento da proliferação celular em CHCs foi verificado por vários autores (Nagao et al, 1995; Nolte et al, 1998). Nagao et al (1995) estudaram a expressão de MIB-1 (anticorpo monoclonal que reconhece o antigénio Ki-76, associado à proliferação celular) numa série de CHCs. Neste estudo, os autores observaram uma forte associação entre a expressão de MIB-1 e o grau de diferenciação das neoplasias sendo significativamente mais elevada nos CHCs pouco diferenciados. No mesmo estudo observou-se ainda que os CHCs pouco diferenciados exprimiam a proteína p53 com maior frequência. Estes resultados coadunam-se com a verificação de que a proteína p53 alterada interfere com o ciclo celular, contribuindo para o aumento da proliferação celular.

Em modelos experimentais, de ratinhos transgénicos, verificou-se que a expressão de *TGF α* (potente mitogénio para o hepatócito) está aumentada nos hepatócitos de animais infectados por VHB. Neste modelo observou-se também um aumento do índice proliferativo e da ocorrência de CHC (Jakubczak et al, 1997). Os resultados deste estudo

coadunam-se com a evidência anteriormente obtida de que há aumento da proliferação celular no processo de carcinogénese hepática.

2. OBJECTIVOS

Tal como há mais de 40 anos, o cancro do fígado (carcinoma hepatocelular) continua a constituir um problema sério de saúde pública em Moçambique. Justifica-se, por isso, retomar a investigação nesta área com recurso aos meios actualmente disponíveis e à luz das “novas” evidências epidemiológicas e moleculares.

Neste contexto, o objectivo geral deste trabalho é o de analisar o perfil clínico-patológico e vários tipos de alterações “moleculares” (expressão da proteína p53, instabilidade de microssatélites e proliferação celular) de CHCs de doentes do Sul de Moçambique (zona de incidência “elevadíssima” de CHC) e do Norte de Portugal (zona de incidência intermédia de CHC).

Especificamente, pretende-se:

1. Pesquisar as alterações da expressão do gene oncosupressor p53 e a presença da instabilidade de sequências de microssatélites em CHCs de doentes oriundos de duas regiões geográficas distintas.
2. Verificar se as alterações da expressão da proteína p53 e/ou instabilidade de microssatélites se associam ao índice proliferativo ou um tipo histológico e/ou grau de diferenciação particular das neoplasias.
3. Analisar, sempre que possível, a relação entre as alterações previamente referidas e factores etiológicos, nomeadamente a presença de sinais de infecção por VHB.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Material

O presente estudo incidiu sobre 83 CHCs, desenvolvidos em doentes moçambicanos (n=65) e doentes portugueses (n=18).

Dos 65 casos de Moçambique, 52 foram diagnosticados em autópsias realizadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central de Maputo entre 1995 e 1997 e os 13 restantes foram identificados em biópsias per-cutâneas por agulha ou biópsias cirúrgicas realizadas nos Serviços de Medicina III e de Cirurgia do Hospital Central de Maputo, entre 1994 e 1995.

Os 18 casos de Portugal foram diagnosticados em biópsias percutâneas por agulha (n=14) e hepatectomias (n=4) realizadas nos Serviços de Gastreenterologia e de Cirurgia II do Hospital de S. João, Porto- Portugal, entre 1992 e 1997.

Os CHCs de Moçambique desenvolveram-se em indivíduos de raça negra, com idades compreendidas entre 12 e 76 anos, 39 do género masculino e 26 do género feminino.

Os CHCs de Portugal desenvolveram-se em doentes de raça caucasiana, com idades compreendidas entre 50 e 83 anos, 16 do género masculino e 2 do género feminino.

Em todos casos de ambas as séries o diagnóstico foi confirmado por exame histológico.

Nos casos portugueses foi possível obter informação sobre os marcadores serológicos de infecção por VHC. Não foi possível obter esta informação em nenhum dos casos da série moçambicana.

Estudo histológico

Todo o material obtido foi fixado em formol a 10% e incluído em parafina. O estudo histológico foi realizado em cortes de 4 µm de espessura, corados pela hematoxilina e eosina (HE).

A classificação histológica foi efectuada de acordo com a classificação da OMS (Ishak et al, 1994).

A graduação da diferenciação foi feita segundo os critérios propostos por Edmondson e Steiner (1954) em 4 graus: I, II, III e IV.

Estudo Imunocitoquímico

Método:

Para o estudo imunocitoquímico utilizaram-se cortes seriados de 4 µm de espessura, obtidos do mesmo material usado para o estudo histológico. Depois de obtidos, os

cortes secaram em estufa, a 37°C, durante, pelo menos, 24 horas. Utilizaram-se lâminas previamente preparadas com gelatina para evitar o descolamento dos cortes.

Seguidamente, os cortes foram processados da seguinte forma:

1. Desparafinação e hidratação - consistiu em três banhos consecutivos em xilol (10 minutos cada). De seguida, os cortes foram passados por três banhos consecutivos de etanol a 100%, 90% e 70% sendo, finalmente, lavados em água corrente (10 minutos).
2. Bloqueio da peroxidase endógena - efectuado com uma solução de peróxido de hidrogénio a 3% em metanol (10 minutos).
3. Incubação com soro normal de coelho - foi utilizada uma solução de soro normal não imune, para a eliminação de ligações inespecíficas (20 minutos). Utilizou-se soro normal de coelho (DAKO, Código X0902) na diluição de 1:5 numa solução de BSA (Albumina Sérica Bovina) a 10% em TBS (solução salina tamponada de Tris).
4. Incubação com anticorpo primário - efectuada em câmara húmida, "over-night", (cerca de 18 h).
Os anticorpos utilizados, bem com as respectivas diluições, serão descritos mais adiante.
5. Incubação com anticorpo secundário - utilizou-se um anticorpo de coelho anti-ratinho biotinilado (DAKO, Código E0354) na diluição de 1:200, numa solução de BSA a 5% em TBS (30 minutos).
6. Incubação com complexo avidina-biotina - foi utilizado o complexo avidina-biotina conjugado com peroxidase (DAKO, código K0355), na diluição indicada pelo fabricante, numa solução de BSA a 5% em TBS.
7. Revelação - a reacção imunocitoquímica foi revelada com uma solução de diaminobenzidina (3,3',4,4'tetra-aminobifenil) numa concentração de 1mg/ml, preparada com solução tamponada de Tris/HCl 0,05%M, pH 7,6±0,2, contendo H₂O₂ a 1% (7 minutos).
8. Contraste nuclear - os núcleos foram contrastados com hematoxilina de Mayer (1 minuto) sendo os cortes posteriormente lavados em água corrente (10 minutos).
9. Desidratação - consistiu num banho em etanol a 95% (3 minutos) seguido de passagens consecutivas em dois banhos de etanol a 100% e em 2 banhos de xilol.
10. Montagem - as lâminas foram montadas com Entellan.

Para a detecção p53 e MIB-1 os cortes foram submetidos a pré-tratamento em micro-ondas (potência de 850 W) com tampão citrato, pH 6,0, durante 20 minutos, findos os quais se mantiveram no mesmo tampão, fora do micro-ondas, durante 20 minutos.

Para se assegurar a especificidade dos anticorpos utilizados utilizaram-se, em todos os estudos imunocitoquímicos, controlos positivos e negativos. Nos controlos negativos, o anticorpo primário foi substituído por uma fracção de imunoglobulina de coelho com a mesma concentração proteica do anticorpo primário (DAKO, código X 0903, diluição 1:10000). O "background" que por vezes se observou, a traduzir reacções inespecíficas resultantes de interacções iónicas e hidrofóbicas entre o anticorpo e as proteínas do tecido, foi desprezível. Como controlos positivos utilizaram-se tecidos com imunorreactividade intensa para os anticorpos utilizados.

Anticorpos:

p53

Anticorpo monoclonal de rato, Clone DO-7, código NCL-p53-DO-7, Novocastra Laboratories, Ltd., que reconhece a forma "selvagem" (wild type) assim como a mutante da proteína p53, desnaturada ou não. A diluição usada foi de 1:50.

Como controlo positivo usou-se um caso de carcinoma da mama, fortemente positivo "para" p53.

A avaliação da imunorreactividade foi feita de forma semi-quantitativa, com objectiva de 10X tendo-se avaliado a intensidade da coloração (discreta, moderada, intensa) e a quantidade de células neoplásicas positivas. Foram consideradas positivas as células com imunorreactividade nuclear inequívoca (independentemente da co-existência de imunorreactividade citoplasmática), de acordo com os seguintes critérios:

- negativa (-) - < 5% de células positivas
- positiva (+) - $\geq 5\%$ e < 10% de células positivas
- positiva (++) - $\geq 10\%$ e < 50% de células positivas
- positiva (+++) - $\geq 50\%$ de células positivas

MIB-1

Anticorpo monoclonal de rato, Clone MIB-1, Cat. 0505, IMMUNOTECH S.A., que reconhece o antigénio nuclear Ki-67, associado à proliferação celular, presente em todas as fases do ciclo celular, excepto na fase G0. A diluição usada foi de 1:100.

Como controlo positivo usou-se um fragmento de melanoma com índice proliferativo elevado.

Foram consideradas positivas as células com marcação nuclear inequívoca. Foi feita uma avaliação quantitativa da imunorreactividade após análise de 1000 células neoplásicas, com aplicação de 400X. Os resultados foram expressos em percentagem de células imunorreactivas.

AgHBs

Anticorpo monoclonal de cabra anti-AgHBs, código B 0560, DAKO, que reconhece o antígeno de superfície do VHB (AgHBs). A diluição usada foi de 1:6000.

Como controlo positivo usou-se tecido hepático fortemente positivo “para” AgHBs.

Consideraram-se positivos os casos com imunoreactividade inequívoca, citoplasmática e/ou membranar. Para efeitos de análise estatística os casos foram considerados como negativos (ausência de imunoreactividade ou imunoreactividade equívoca em menos de 5% das células) e positivos (imunoreactividade inequívoca em mais de 5% das células).

AgHBc

Anticorpo policlonal coelho anti-AgHBc, código B 0586, DAKO, que reconhece o antígeno do “core” do VHB (AgHBc). A diluição usada foi de 1:1000.

Como controlo positivo usou-se tecido hepático fortemente positivo “para” AgHBc.

Consideraram-se positivos os casos em que se observou imunoreactividade inequívoca “para” o anticorpo, com localização nuclear e, mais raramente, com marcação citoplasmática concomitante. Para efeitos de análise estatística os casos foram considerados como negativos (ausência de imunoreactividade ou imunoreactividade equívoca em menos de 5% das células) e positivos (imunoreactividade inequívoca em mais de 5% das células).

Serologia da infecção por VHC

Só foi possível obter informação sobre marcadores serológicos de infecção por VHC em 10 doentes da série portuguesa.

Instabilidade de microssatélites:

A pesquisa da instabilidade de microssatélites foi efectuada em ADN tumoral extraído do mesmo material usado para os estudos anteriores. Para evitar a contaminação do tecido tumoral com tecido não-neoplásico, procedeu-se à extracção de ADN através de microdissecção dos tumores. Esta foi realizada em cortes não corados, de 10 μ m de espessura, após selecção da área a microdissecar em cortes sequenciais de 4 μ m, corados por HE.

Após incubação do material microdissecado em proteinase K e SDS, “over-night”, procedeu-se à extracção de ADN com fenol-clorofórmio

A pesquisa de ISM foi efectuada utilizando-se o marcador monomórfico BAT-26. Usou-se um par “primers” localizados no intrão 5 do gene *hMSH2* que amplifica uma sequência repetitiva monomórfica de adeninas tal como foi descrito por Hoang et al

(1997). Procedeu-se à amplificação do ADN por PCR, com incorporação de [α -³²]DCTP. Os produtos foram sujeitos a electroforese em gel desnaturante de poliacrilamida desnaturada a 6%. A visualização foi feita através de autoradiografia.

A instabilidade de sequências de microssatélites foi identificada sempre que na análise do padrão electroforético se verificou o aparecimento de novos alelos.

Análise estatística:

A análise estatística foi realizada com o programa STATVIEW 4.02, usando os seguintes métodos estatísticos: teste qui-quadrado com correcção de Yates e análise de variância de Fisher (ANOVA). A diferença entre duas variáveis foi considerada significativa para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Idade

A média das idades dos doentes da série de Portugal ($64,2 \pm 8,4$) revelou-se significativamente superior à média das idades dos doentes de Moçambique ($43,6 \pm 15,9$) ($p=0,0001$). Na série moçambicana o doente mais novo tinha 12 anos e havia mais 4 doentes de idade pediátrica (três doentes com 15 anos e um doente com 14 anos de idade) totalizando 5 crianças (7,7%). Na série portuguesa o doente mais novo tinha a idade de 50 anos.

Género

Verificou-se um franco predomínio de doentes do género masculino na série portuguesa (homem/mulher= 8/1). Na série moçambicana observou-se maior equilíbrio entre os géneros dos doentes (homem/mulher=1,5/1).

Tipos histológicos dos CHCs

A classificação dos CHCs, efectuada de acordo com o padrão arquitectural e citológico predominante, está resumida nas Tabelas 4 e 5. Verificou-se, em ambas as séries, um predomínio de CHCs de padrão trabecular. Não se verificaram diferenças significativas entre as duas séries, relativamente aos tipos histológicos das neoplasias.

Na Figura 3, ilustram-se os tipos histológicos de CHCs observados nas duas séries do presente trabalho.

Tabela 4. Distribuição dos tipos histológicos dos CHCs da série moçambicana.

Tipo histológico	nº casos	Frequência relativa (%)
Trabecular	46	70,7
Pseudoglandular	5	7,7
Sólido	7	10,8
Anaplásico	7	10,8
Total	65	100%

Tabela 5. Distribuição dos tipos histológicos dos CHCs da série portuguesa.

Tipo histológico	nº casos	Frequência relativa (%)
Trabecular	14	77,8
Sólido	3	16,7
Anaplásico	1	5,5
Total	18	100%

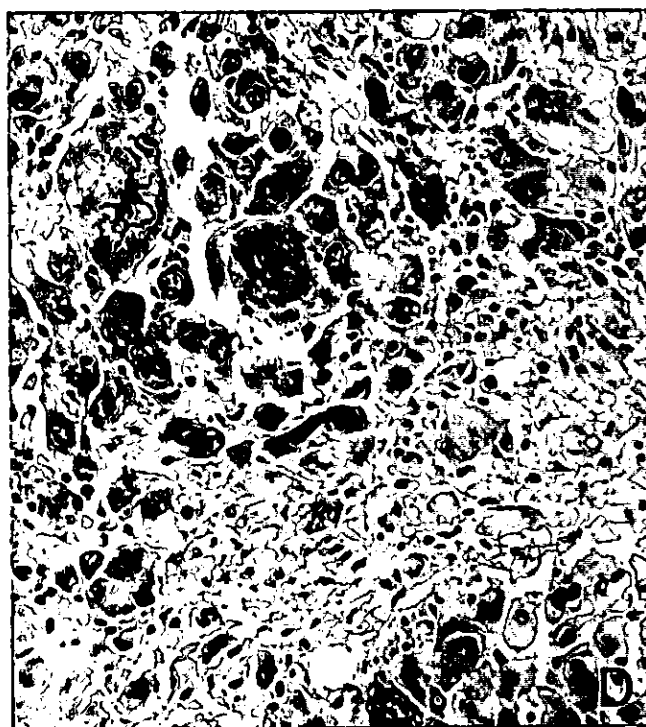
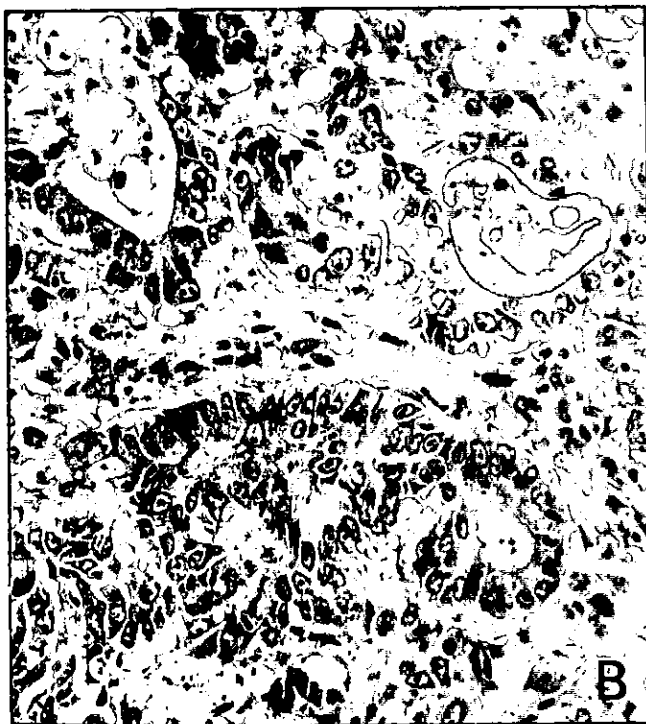


Figura 3. Tipos histológicos observados nas séries moçambicana e portuguesa. A- Trabecular (100X); B- Pseudoglandular (400X); C- Sólido (200X); D- Anaplásico (400X).

Diferenciação celular dos CHCs

Nas Tabelas 6 e 7 resume-se a distribuição dos graus de diferenciação celular dos CHCs das séries moçambicana e portuguesa, respectivamente.

Tabela 6. Distribuição dos graus de diferenciação celular dos CHCs da série moçambicana.

Grau de diferenciação	nº casos	Frequência relativa (%)
Grau I	4	6,1
Grau II	28	43,1
Grau III	26	40,0
Grau IV	7	10,8
Total	65	100%

Tabela 7. Distribuição dos graus de diferenciação celular dos CHCs da série portuguesa.

Grau de diferenciação	nº casos	Frequência relativa (%)
Grau I	4	23,5
Grau II	10	58,8
Grau III	2	11,8
Grau IV	1	5,9
Total	17*	100%

*Num caso de CHC da série portuguesa não foi possível avaliar, com segurança, o grau de diferenciação celular.

Na série portuguesa observou-se um franco predomínio de CHCs de grau I/II (82,3%), enquanto o valor correspondente para a série moçambicana foi de 49,2%. Em contrapartida, na série moçambicana observaram-se 33 casos (50,8%) de CHC com diferenciação de grau III/IV. Na série portuguesa só 3 casos (17,7%) atingiram um grau de diferenciação elevado (dois com grau III e um com grau IV). A diferença dos graus de diferenciação celular entre as duas séries atingiu o limiar de significância estatística ($p=0,019$).

Em ambas as séries, os CHCs de grau IV correspondiam a CHCs de tipo anaplásico.

A comparação dos tipos histológicos com o grau de diferenciação celular das neoplasias revelou uma associação significativa entre ambos os parâmetros, tanto na série portuguesa ($p=0,008$) como na série moçambicana ($p<0,0001$).

Fígado adjacente aos CHCs

Foi possível avaliar as características do fígado não-neoplásico, adjacente aos CHCs, em 56 dos 65 casos da série moçambicana e 10 dos 18 casos da série portuguesa. Em 17 casos (9 da série moçambicana e 8 da série portuguesa) não dispunhamos de material de fígado não-neoplásico. Identificou-se a presença de cirrose hepática em 29 casos (51,8%) da série moçambicana e 8 casos (80%) da série portuguesa. Esta diferença não se revelou estatisticamente significativa ($p=0,446$). Não se observou, em nenhum caso, a ocorrência de displasia.

Marcadores de infecção por VHB e VHC

Estudo imunocitoquímico para a detecção de antígenos do VHB (séries moçambicana e portuguesa)

Procedeu-se à pesquisa de AgHBs e AgHBc em todos os casos da série moçambicana e 15 casos da série portuguesa (em três casos desta série não havia material disponível para este estudo). A imunoreactividade “para” AgHBs e AgHBc foi observada apenas no fígado não-neoplásico (Figura 4) (ver descrição adiante). Não se observou, em nenhum caso, imunoexpressão nas células neoplásicas dos CHCs. Observou-se imunoreactividade “para” AgHBs em 18 casos (27,7%) da série moçambicana e 2 casos (13,3%) da série portuguesa. Esta diferença não se revelou estatisticamente significativa ($p=0,426$). Observou-se imunoreactividade “para” AgHBc em 12 casos (18,5%) da série moçambicana. Não se observou imunoreactividade “para” AgHBc na série portuguesa. Na série moçambicana, em 8 casos positivos “para” AgHBc observou-se também imunoreactividade “para” o AgHBs. Nos quatro casos restantes a imunoexpressão “para” AgHBc foi observada na ausência de expressão de AgHBs.

A pesquisa de ambos antígenos (AgHBs e AgHBc) permitiu assim identificar 22 casos (33,8%) de CHC com sinais de infecção por VHB na série moçambicana: 10 positivos “para” AgHBs, 4 positivos “para” AgHBc e 8 positivos “para” os dois antígenos.

Na série moçambicana, os 22 casos com sinais de infecção por VHB correspondiam a 16 indivíduos do género masculino e 6 indivíduos do género feminino. A idade média dos doentes com infecção por VHB era de $37,0 \pm 15,2$ anos. No doente com 12 anos de idade não se verificou a existência de sinais de infecção por VHB. Contudo, nos restantes 4 doentes de idade pediátrica detectaram-se sinais de infecção por VHB.

Na série portuguesa os dois casos com sinais de infecção por VHB correspondiam a indivíduos do género masculino de 64 anos e 83 anos.

Estudo serológico da infecção por VHC (série portuguesa)

Não foi possível obter informações sobre marcadores serológicos da infecção por VHC na série moçambicana. Na série portuguesa foi possível obter esta informação em 10 casos. Nestes, detetaram-se anticorpos anti-HCV em 6 doentes (60%).

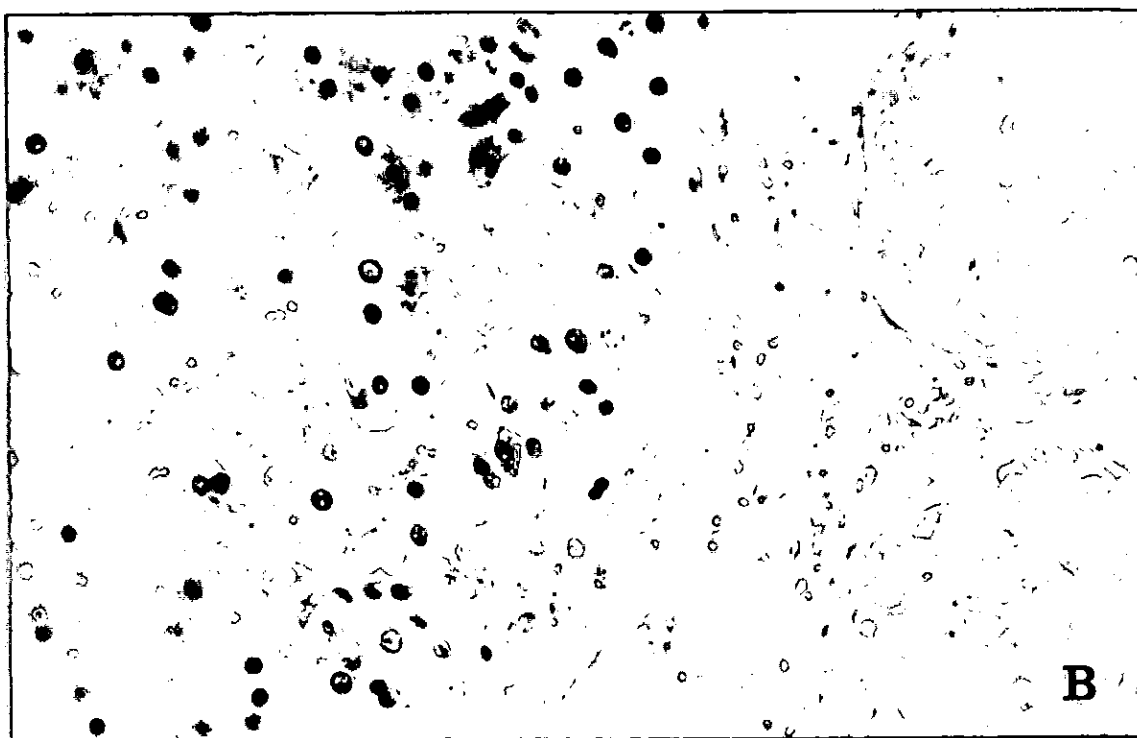
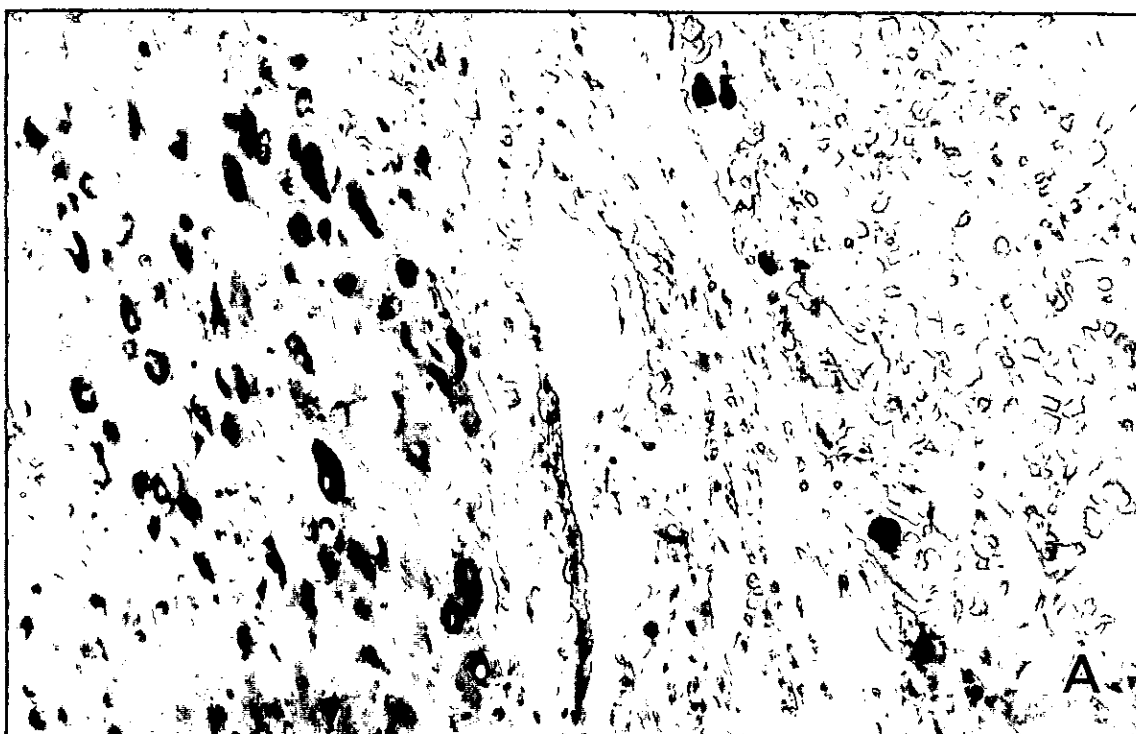


Figura 4. Imunoexpressão de antígenos do VHB. **A-** Imunoreatividade “para” AgHBs no citoplasma de hepatócitos do fígado não-neoplásico. Nas células neoplásicas do CHC não se observa imunoexpressão de AgHBs (200X). **B-** Imunoreatividade “para” AgHBc no núcleo de hepatócitos do fígado não-neoplásico. Nas células neoplásicas do CHC não se observa imunoexpressão de AgHBc (200X).

Expressão da proteína p53

Na série moçambicana observou-se imunoreactividade nuclear “para” p53 em 13 dos 64 casos (20,3%) disponíveis para esta análise. A intensidade da marcação foi graduada em moderada (++) ou intensa (+++) (Figura 5) na maior parte dos casos: 3 casos com intensidade moderada (++) e 5 casos com intensidade acentuada (+++). Nos cinco casos restantes a imunoreactividade foi graduada como ligeira (+).

Na Tabela 8 apresentam-se os resultados do estudo imunocitoquímico “para” a proteína p53 em função de vários parâmetros clínico-patológicos na série moçambicana.

Não se verificou associação significativa entre a imunoreactividade “para” p53 e o tipo histológico ($p=0,292$) ou grau de diferenciação das neoplasias ($p=0,629$). Em contrapartida, observou-se uma relação estatisticamente significativa ($p=0,017$) entre a positividade “para” p53 e as características do fígado não-neoplásico adjacente às neoplasias. Nos CHCs desenvolvidos em fígado não-cirrótico observou-se uma frequência mais elevada de casos positivos “para” p53 (19,2%) do que nos CHCs enxertados em fígado cirrótico (6,9%). Não se observou associação significativa entre imunoexpressão de p53 nos CHCs e a imunoexpressão de antígenos de VHB no fígado adjacente ($p=0,605$).

No fígado não-neoplásico adjacente aos CHCs não se observou imunoreactividade “para” p53 em nenhum caso.

Relativamente à série portuguesa, a imunoreactividade “para” p53 foi observada em 9 dos 17 casos (52,9%) onde foi possível efectuar esta análise. A intensidade da marcação foi graduada como moderada (++) (3 casos) a intensa (+++) (5 casos). No caso restante a imunoreactividade foi graduada como discreta (+). Na Tabela 9 apresentam-se os resultados do estudo imunocitoquímico “para” a proteína p53 na série portuguesa.

Não se verificou relação entre a imunoexpressão de p53 e o tipo histológico das neoplasias. Em contrapartida, observou-se uma relação estatisticamente significativa ($p=0,038$) entre a expressão de p53 e o grau de diferenciação celular. Nos CHCs de grau I observou-se expressão de p53 em 25% dos casos e, nos CHCs com maior grau de diferenciação celular observou-se imunoexpressão de p53 numa percentagem mais elevada (Tabela 9).

Tal como na série moçambicana, no fígado não-neoplásico adjacente aos CHCs não se observou imunoreactividade “para” p53 em nenhum dos casos. Não se observou, igualmente, associação significativa entre a imunoexpressão de p53 e imunoreactividade “para” antígenos do VHB no fígado não-neoplásico ($p=0,489$).

Tabela 8. Imunoexpressão da proteína p53 em CHCs da série moçambicana.

	Imunorreactividade "para" p53		Valor de p
	Negativa	Positiva	
Género			0,337
Masculino	29 (74,3%)	10 (25,7%)	
Feminino	22 (88,0%)	3 (12,0%)	
Tipo histológico			0,292
Trabecular	35 (76,0%)	11 (24,0%)	
Pseudoglandular	5 (100%)	0 (0,0%)	
Sólido	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
Anaplásico	6 (85,7%)	1 (14,3%)	
Grau de diferenciação			0,629
I	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
II	24 (88,8%)	3 (11,2%)	
III	18 (69,2%)	8 (30,7%)	
IV	6 (85,7%)	1 (14,3%)	
Cirrose no fígado adjacente**			0,017
Ausente	21 (80,8%)	5 (19,2%)	
Presente	27 (93,1%)	2 (6,9%)	
Total* (64)	51(79,7%)	13 (20,3%)	

*Num caso não foi possível avaliar a imunoexpressão de p53.**Só foi possível avaliar o fígado não-neoplásico em 55 dos 64 casos em que se estudou a imunoexpressão de p53.

Tabela 9. Imunoexpressão da proteína p53 em CHCs da série portuguesa.

	Imunorreactividade "para" p53		Valor de p
	Negativa	Positiva	
Género			0,057
Masculino	7 (43,7%)	9 (56,3%)	
Feminino	1 (100%)	0 (0,0%)	
Tipo histológico			0,141
Trabecular	6 (46,1%)	7 (53,9%)	
Sólido	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Anaplásico	0 (0,0%)	1 (100%)	
Grau de diferenciação			0,038
I	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
II	4 (40,0%)	6 (60,0%)	
III	1 (50,0%)	1 (50,0%)	
IV	0 (0,0%)	1 (100%)	
Cirrose no fígado adjacente**			0,622
Ausente	2 (100%)	0 (0,0%)	
Presente	2 (28,5%)	5 (71,5%)	
Total* (n=17)	8 (47,1%)	9 (52,9%)	

*Num caso não foi possível avaliar a imunoexpressão de p53.** Só foi possível avaliar o fígado não-neoplásico em 9 dos 17 casos em que se estudou a imunoexpressão de p53.

Índice proliferativo dos CHCs avaliado pela positividade “para” MIB-1

O índice proliferativo (IP) foi avaliado através da imunoreactividade “para” MIB-1 (Figura 6), num total de 76 CHCs das duas séries (61 casos da série moçambicana; 15 casos da série portuguesa), sendo expresso em percentagem (\pm erro padrão). Detectámos imunoreactividade “para” MIB-1 em 26 casos da série moçambicana (42,6%) e em todos os casos da série portuguesa. O índice proliferativo por caso variou entre 0% e 61,9%. A média do índice proliferativo, considerando ambas as séries, foi de $9,7\% \pm 1,5\%$ e a mediana de 3,4%.

Na Tabela 10 resumem-se os resultados deste estudo, em função de vários parâmetros clínico-epidemiológicos e anátomo-patológicos.

Verificou-se que o índice proliferativo médio da série moçambicana ($9,5 \pm 1,7\%$) era menor que o da série portuguesa ($15,1\% \pm 3,9\%$). No entanto, esta diferença não atingiu o limiar de significância estatística ($p=0,175$).

Na análise conjunta das duas séries verificaram-se associações estatisticamente significativas entre o IP e a expressão da proteína p53 ($p=0,004$) e a características do fígado não-neoplásico ($p=0,0005$).

O índice proliferativo revelou-se mais elevado nos casos de CHC positivos “para” p53 do que nos casos negativos (Tabela 10). Verificou-se um aumento do índice proliferativo em função da intensidade da imunoreactividade “para” a proteína p53: (+) $10,0\% \pm 3,3\%$; (++) $17,8\% \pm 7,7\%$; (+++) $21,3\% \pm 5,3\%$. Relativamente às características do fígado não-neoplásico verificou-se que os casos de CHC associados a cirrose tinham menor índice proliferativo ($4,0\% \pm 1,0\%$) do que os CHCs enxertados em fígado não cirrótico ($15,3\% \pm 3,1\%$) ($p=0,0005$). Não se verificou associação significativa entre o índice proliferativo e as características dos CHCs (tipo histológico e diferenciação celular) (Tabela 10) ou a imunoexpressão de antígenos do VHB no fígado não-neoplásico ($p=0,514$).

As associações verificadas na análise conjunta das duas séries (Tabela 10) foram confirmadas na série moçambicana para as características do fígado não-neoplásico ($p=0,0007$) e imunoexpressão de p53 ($p=0,017$). Nesta série verificou-se que o índice proliferativo médio dos CHCs desenvolvidos em fígado sem cirrose ($16,1\% \pm 3,4\%$) era significativamente maior ($p=0,0007$) do que o verificado em CHCs enxertados em fígado com cirrose ($2,7\% \pm 1,1\%$). Na série moçambicana verificou-se uma associação sugestiva ($p=0,095$) entre o IP e a diferenciação celular dos CHCs. Na série portuguesa não foi possível confirmar estas associações, provavelmente devido à pequena dimensão da amostra.

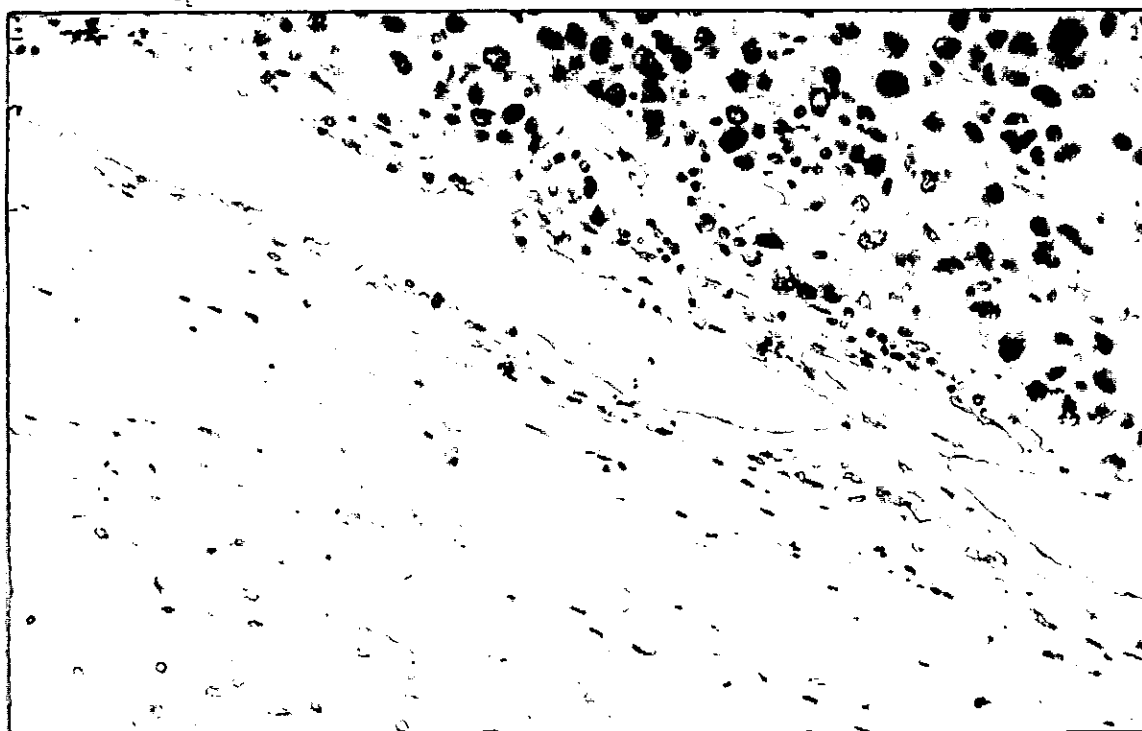


Figura 5. Imunoexpressão da proteína p53 num caso da série moçambicana, graduada como intensa (+++) (200X).

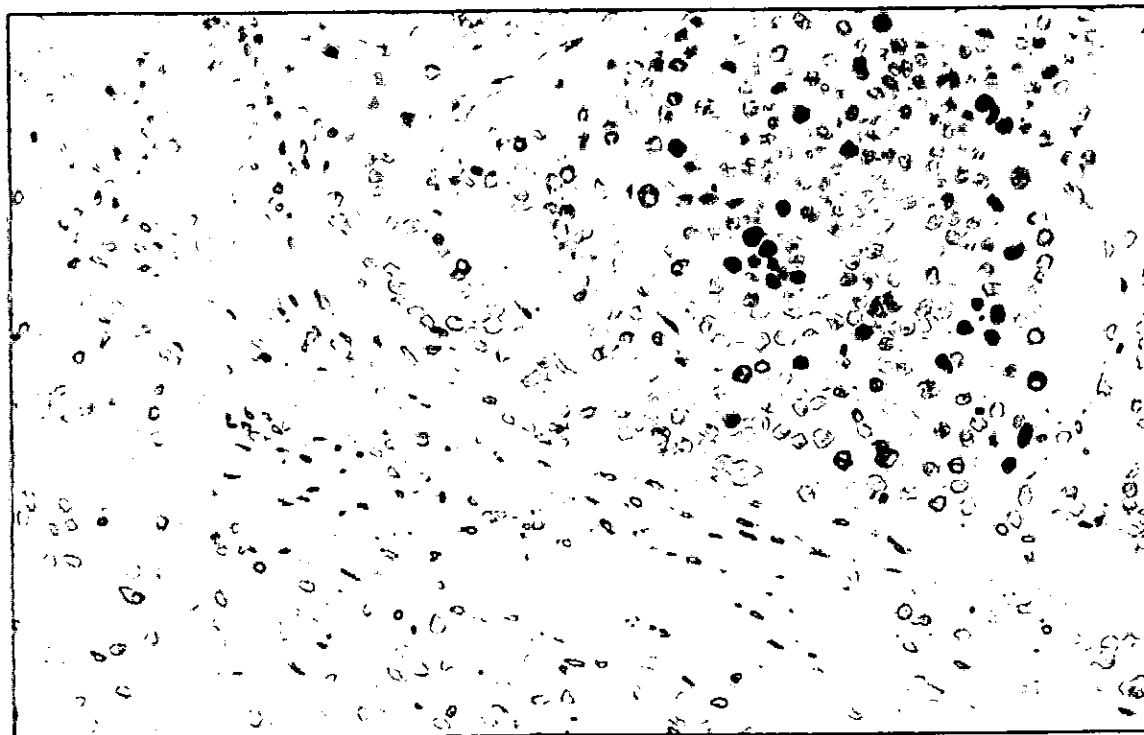


Figura 6. Imunoexpressão de MIB-1 num caso da série moçambicana (200X).

Tabela 10. Índice proliferativo em CHCs das séries de moçambicana e portuguesa.

	Índice proliferativo (%) (Média ± Erro padrão)	Valor de p
Proveniência dos casos		0,175
Moçambique (n=61)	9,5 ± 1,7	
Portugal (n=15)	15,1 ± 3,9	
Género dos indivíduos		0,513
Masculino (n=51)	11,3 ± 2,0	
Feminino (n=25)	9,0 ± 2,6	
Cirrose no fígado adjacente*		0,0005
Ausente (n=27)	15,3 ± 3,1	
Presente (n=33)	4,0 ± 1,0	
Tipos histológicos		0,463
Trabecular (n=58)	11,8 ± 2,0	
Pseudoglandular (n=4)	11,5 ± 5,4	
Sólido (n=6)	2,8 ± 1,4	
Anaplásico (n=8)	7,5 ± 1,8	
Grau de diferenciação**		0,400
I (n=5)	13,0 ± 7,6	
II (n=35)	9,2 ± 2,3	
III (n=27)	12,0 ± 3,0	
IV (n=8)	7,5 ± 1,8	
Imunoexpressão de p53***		0,004
Ausente (n=54)	6,8 ± 1,6	
Presente (n=20)	17,2 ± 3,7	
Total (n=76)	9,7 ± 1,5	

*Em 16 casos não foi possível avaliar as características da fígado não-neoplásico. ** Num caso não foi possível analisar com segurança o grau de diferenciação do CHC. ***Em 2 casos não foi possível avaliar a imunoexpressão da proteína p53.

Instabilidade de sequências microssatélites (BAT-26)

A pesquisa de ISM, através do BAT-26, foi efectuada apenas em CHCs (19 da série moçambicana e 18 da série portuguesa). Na série moçambicana detectou-se instabilidade de sequências microssatélites em 5 dos 19 casos analisados (26,3%). Todos os casos da série portuguesa foram negativos.

Na Figura 7 documenta-se o padrão electroforético observado em vários casos das séries moçambicana e portuguesa. Os casos positivos foram identificados pelo aparecimento de novos alelos, expressos pela presença de bandas claramente distintas das correspondentes aos alelos normais

Na série moçambicana não se observou associação significativa entre a ocorrência de ISM e as características histológicas dos CHCs, o índice proliferativo dos tumores ou a imunoexpressão de p53 nas neoplasias (Tabela 11). Não se observou, igualmente, associação significativa entre a ISM e a imunoexpressão de antígenos do VHB no fígado não-neoplásico ($p=0,260$). Nos 5 casos de CHC com ISM identificaram-se sinais de infecção por VHB, no fígado adjacente às neoplasias, em 3 casos (60%). Detectou-se ISM em 4 de 10 casos (40%) de CHCs desenvolvidos em fígado sem cirrose, não se tendo observado esta alteração em nenhum caso dos CHCs enxertados em fígado cirrótico ($p=0,286$) (Tabela 11).

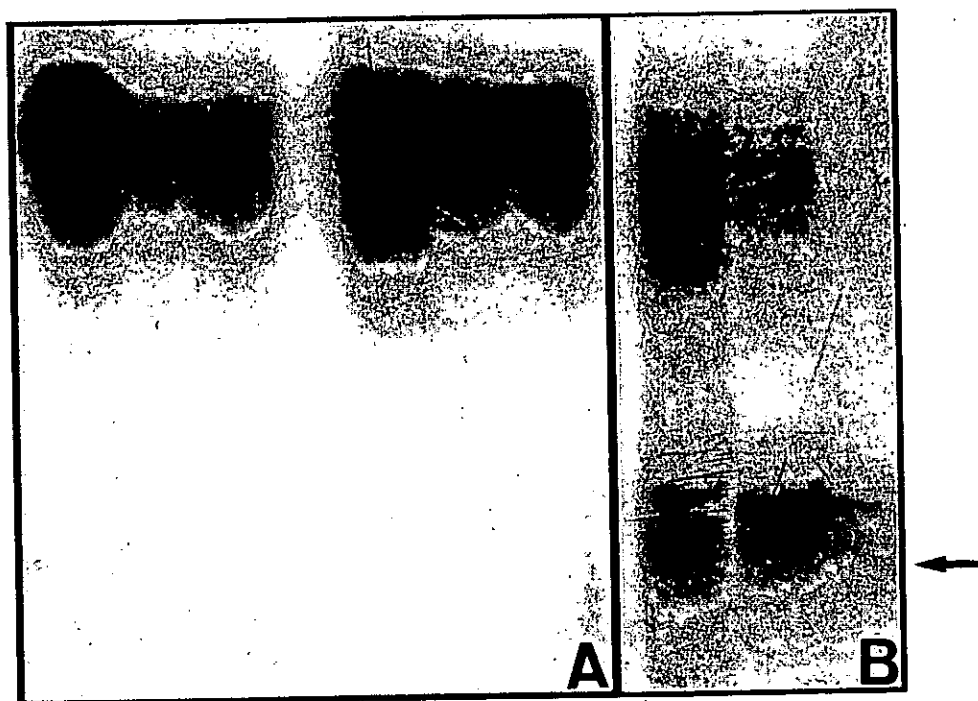


Figura 7. Instabilidade de sequências microssatélites (ISM) avaliada com o marcador monomórfico BAT 26. **A**- 6 casos de CHC sem ISM da série portuguesa. **B** -3 casos de CHC com ISM da série moçambicana, identificados pelo aparecimento de novos alelos (seta).

Tabela 11. Instabilidade de sequências microsatélites (ISM) em CHCs da série moçambicana.

	ISM		Valor de p
	Ausente	Presente	
Gênero			0,911
Masculino	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
Feminino	6 (75,0%)	2 (25,0%)	
Cirrose no fígado adjacente*			0,286
Ausente	6 (60,0%)	4 (40,0%)	
Presente	4 (100%)	0 (0,0%)	
Tipos Histológicos			0,733
Trabecular	9 (69,2%)	4 (30,8%)	
Pseudoglandular	2 (100%)	0 (0,0%)	
Sólido	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Anaplásico	1 (100%)	0 (0,0%)	
Grau de diferenciação			0,875
I	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
II	4 (80,0%)	1 (20,0%)	
III	6 (66,7%)	3 (33,3%)	
IV	1 (100%)	0 (0,0%)	
Imunoexpressão de p53**			0,639
Ausente	10 (76,9%)	3 (23,1%)	
Presente	4 (80,0%)	1 (20,0%)	
Índice proliferativo	24,0%±6,5%	14,2%±8,9%	0,411
Total (n=19)	14 (73,7%)	5 (26,3%)	

* Em 5 casos (1 com ISM e 4 sem ISM) não foi possível analisar as características do fígado não-neoplásico. ** Num caso não foi possível avaliar a imunoexpressão de p53.

5. DISCUSSÃO

O carcinoma hepatocelular é uma das neoplasias mais comuns no homem (London, 1981; Wands e Blum, 1991). A incidência desta neoplasia varia consoante a região geográfica, sendo o Sudeste Asiático e África ao Sul do Saara as regiões que apresentam as incidências mais elevadas em todo o mundo.

No presente estudo compararam-se as características dos CHCs de doentes oriundos de duas regiões geográficas distintas: Moçambique (área de incidência "elevadíssima") e Portugal (área de incidência intermédia).

As características clínico-epidemiológicas dos CHCs das áreas de incidência elevada são diferentes das que se verificam nas áreas de incidência baixa e/ou intermédia. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram estas verificações como adiante discutiremos.

O CHC e a idade dos doentes

Na série moçambicana, o doente mais jovem tinha 12 anos, portanto ainda dentro da idade pediátrica, e o doente mais velho tinha a idade de 76 anos. A média das idades ($43,6 \pm 15,9$) dos doentes moçambicanos revelou-se significativamente inferior ($p=0,0001$) à média das idades dos doentes portugueses ($64,2 \pm 8,4$). Por outras palavras, o CHC ocorre em média cerca de duas décadas mais cedo nos doentes moçambicanos relativamente aos doentes portugueses.

Este resultado está de acordo com o de outros trabalhos em que se verificou que o CHC em regiões de incidência elevada afecta mais frequentemente indivíduos nas 3ª e 4ª décadas da vida (Prates e Torres, 1965; Torres et al, 1970; Lohiya et al, 1987; Wild et al, 1991).

Os principais factores de risco para o desenvolvimento de CHC em áreas com uma incidência muito elevada deste tipo de neoplasia - como é o caso de Moçambique - são a infecção crónica por VHB e a exposição às aflatoxinas (London, 1981; Van Rensburg et al, 1985; Montesano et al, 1997).

Sabe-se que nas regiões de prevalência elevada da infecção por VHB a transmissão da infecção é frequentemente "vertical" (da mãe para o filho) ou, em alternativa, a infecção é adquirida precocemente, na infância, tornando assim o hepatócito sujeito às acções lesionais condicionadas pelo VHB desde muito cedo.

Em relação às aflatoxinas, a evidência da literatura sugere que o início da sua actuação é também muito precoce (Montesano et al, 1997). Wild et al (1991) demonstraram a presença de produtos do metabolismo de aflatoxinas no sangue de fetos cujas mães estiveram expostas a estas micotoxinas durante a gravidez. No mesmo trabalho, os autores demonstraram ainda que os produtos do metabolismo das aflatoxinas no sangue fetal eram resultantes da catabolização no fígado do feto e não derivados do sangue materno por via transplacentária.

Na região de onde provêm os casos da série moçambicana (sul de Moçambique) há convergência dos dois factores. A prevalência da infecção por VHB é de 20% (Barreto et al, 1991), tratando-se portanto de uma área endémica da infecção por VHB e a população está exposta a níveis muito altos de aflatoxinas, sobretudo as do tipo B1 (mais hepatotóxicas) (Van Rensburg et al, 1985; Montesano et al, 1997). Dados sobre a avaliação sérica do nível de exposição das aflatoxinas B1 através da medição da aflatoxina B1-lisina, feitos em vários países da região geográfica onde se insere Moçambique, indicam que os teores desta substância são altíssimos (superiores a 40 pg/mg de albumina) comparados, por exemplo, com os níveis detectados em países europeus que não excedem os 5 pg/mg de albumina (Montesano et al, 1997).

Assim, é de supor que a actuação dos dois factores na população moçambicana se inicie muito cedo e tenha um efeito sinérgico, aumentando o risco de desenvolvimento de CHC. De acordo com a hipótese defendida por alguns autores (Torres et al, 1970; Lohiya et al, 1987; Gayotto e Bogliolo, 1994) este sinergismo é favorecido pelo estado de imunodeficiência condicionado pelas aflatoxinas, tornando os indivíduos mais susceptíveis à infecção por VHB.

A série moçambicana incluía 5 doentes com idade pediátrica, um com 12 anos, outro com 14 anos e três com 15 anos. Em 4 destes doentes detectou-se a presença AgHBs e, num deles observou-se expressão concomitante de AgHBc (resultados não mostrados). Como se sabe, a frequência de CHC em crianças é rara, mesmo nas zonas de elevada incidência deste tipo de neoplasia (Tanaka et al, 1986; Moore et al, 1997). Em geral, o desenvolvimento de CHC em crianças associa-se a infecção por VHB (Hsu et al, 1987; Moore et al, 1997). A existência de 5 casos de CHC desenvolvidos em doentes de idade pediátrica na série de Moçambique, 4 dos quais (80%) com sinais de infecção por VHB coaduna-se com esta verificação. O facto de não termos detectado a expressão de antígenos do VHB, por estudo imunocitoquímico, no tecido não-neoplásico do doente mais novo não invalida, por si só, a possibilidade desta criança estar ou ter estado infectada por VHB.

O CHC e o género dos doentes

O género masculino é considerado um dos factores de risco para o desenvolvimento de CHC (Fargion et al, 1994). De facto, o CHC é mais frequente no género masculino do que no género feminino e a relação homem/mulher varia consoante as regiões geográficas. Esta relação é mais equilibrada nas regiões de baixa incidência e de incidência intermédia do que nas regiões de alta incidência (Anthony, 1994). Uma situação idêntica verificou-se por exemplo com os CHCs desenvolvidos na África do Sul, quando se compararam as populações das áreas urbanizadas (onde a incidência de CHC é baixa) e as populações rurais (onde a incidência de CHC é elevada) (Kew, 1981; Paterson e Isaacson, 1982; Kew et al, 1983; Paterson et al, 1985).

No nosso estudo a distribuição dos CHCs em função do género dos doentes revelou-se diferente nas duas séries. Ao contrário do que tem sido referido da literatura, verificámos que na série moçambicana a relação homem/mulher era mais equilibrada (1,5/1) do que na série portuguesa, em que se verificou um franco predomínio de doentes do género masculino (homem/mulher=8/1). Este contraste pode reflectir as

limitações da amostragem (pequena dimensão das amostras) ou, em alternativa, pode "traduzir" um comportamento distinto dos CHCs desenvolvidos nas duas regiões.

Experiências realizadas em ratinhos transgénicos mostraram resultados sobreponíveis aos verificados no homem, observando-se maior incidência de CHCs nos animais do género masculino do que nos animais do género feminino quando submetidos às mesmas condições de hepatocarcinogénese. Para além disso verificou-se que os ratinhos do género masculino desenvolviam CHC mais rapidamente do que os do género feminino (Jakubczak et al, 1997).

Estão por esclarecer definitivamente as razões do predomínio de CHC no género masculino. Num estudo prospectivo realizado em Taiwan, Yu e Chen (1993) verificaram que os níveis elevados de testosterona constituíam um factor de risco importante para o desenvolvimento de CHC no género masculino. Em modelos experimentais verificou-se que os androgénios constituem um factor de risco importante para o desenvolvimento de CHC enquanto os estrogénios podem ter um efeito protector (Takagi et al, 1992).

Receptores de androgénios foram identificados em hepatócitos não-neoplásicos e verificou-se que a sua expressão está aumentada na maior parte dos CHCs (Anthony, 1994). Com base nestas observações aventou-se a possibilidade do CHC ser uma neoplasia hormonodependente (Anthony, 1994). A verificação de que os tumores associados à administração de androgénios/esteróides anabolizantes regrediam após a suspensão destas substâncias (Anthony, 1994) dá algum suporte a esta hipótese.

Não há evidência de que as hormonas sexuais sejam hepatocarcinogénicas por si só. A sua associação com o CHC parece dever-se, predominantemente, a uma acção promotora da proliferação celular. Para além das explicações relacionadas com a acção de hormonas não se pode excluir a possibilidade do predomínio do CHC nos indivíduos do género masculino ser devido à comparticipação de outros factores de risco de desenvolvimento de CHC tais como o consumo de tabaco e álcool (mais frequente género no masculino) e a ocorrência de cirrose hepática que é mais comum no homem do que na mulher (Anthony, 1994).

As características morfológicas do CHC

O tipo histológico mais comum de CHC é o trabecular (Ishak e Markin, 1996) e os resultados do presente trabalho estão de acordo com os da literatura. Porém, na série moçambicana, a frequência de CHC do tipo trabecular foi ligeiramente menor (70,7%) do que na série portuguesa (77,8%). Na série portuguesa observámos apenas um caso de CHC de tipo anaplásico (5,5%) enquanto na série moçambicana identificámos 7 (10,8%) casos de CHC deste tipo morfológico. Este resultado pode estar relacionado com o facto dos CHCs desenvolvidos em zonas de elevada incidência (como África a Sul do Saara) possuírem um comportamento mais agressivo quando comparados com os CHCs desenvolvidos em doentes oriundos de áreas de menor incidência (Yoshida et al, 1994).

Observámos uma tendência para os CHCs da série moçambicana apresentarem grau de diferenciação celular mais elevado do que na série portuguesa. Na série moçambicana, 33

(50,8%) dos CHCs eram de grau III e IV e na série portuguesa, apenas 3 (17,7%) casos pertenciam a estas categorias.

De acordo com os resultados da literatura (Nagao et al, 1995) verificámos que os CHCs histologicamente mais agressivos eram mais indiferenciados e a associação entre o tipo histológico e o grau de diferenciação celular revelou-se estatisticamente significativa em ambas as séries. Na série portuguesa, assim como na moçambicana, a todos os CHCs de tipo anaplásico (8 casos) foi atribuído o grau IV de diferenciação celular.

As características do fígado não-neoplásico

Avaliámos, sempre que possível, o fígado não-neoplásico na periferia dos CHCs. Verificámos que a frequência de cirrose era mais elevada na série portuguesa (80%) do que na série moçambicana (51,8%).

A associação de CHC à cirrose foi bem estabelecida em vários estudos feitos sobre esta matéria. A prevalência de cirrose é variável, oscilando entre 60% e 80% (Colombo, 1995; Szilagyi e Alpert, 1995; Ishak e Markin, 1996; Goodman, 1997). Esta associação tende a ser mais forte nas zonas de incidência baixa de CHC do que nas zonas de incidência elevada. Nas últimas, uma percentagem considerável de CHCs desenvolvem-se em fígado não-cirrótico (Kew, 1981; Paterson e Isaacson, 1982; Paterson et al, 1985; Yoshida et al, 1994). Os resultados que obtivemos, com maior prevalência de cirrose na série portuguesa do que na série moçambicana, coadunam-se portanto com a evidência da literatura. Estes resultados sugerem, ainda, que o papel da cirrose como factor de risco para o desenvolvimento de CHC é menos importante em Moçambique do que em Portugal.

O risco de desenvolvimento de CHC varia em função do tipo de cirrose. Doentes com cirrose hepática do tipo macronodular ou misto (macro e micronodular) têm um risco aumentado de desenvolvimento de CHC relativamente à doentes com cirrose hepática do tipo micronodular (Bioulac-Sage, 1998). O tipo de cirrose mais comum em Moçambique é o macronodular (Torres, 1966) o que, de acordo com Bioulac-Sage (1998), aumenta o risco para o desenvolvimento de CHC.

No presente estudo não observámos, em nenhum caso, lesões de displasia no fígado não-neoplásico. Não podemos excluir que este achado se possa dever a um défice de amostragem. Para além disso, somos forçados a admitir que o carácter restritivo e criterioso com que temos diagnosticado a displasia hepatocitária também possa ter contribuído para este nosso resultado negativo. Esta atitude encontra fundamento na incerteza sobre o significado biológico da displasia hepatocitária que discutiremos adiante.

Num estudo prospectivo realizado por Borzio et al (1995) foi demonstrado que a displasia de grandes células podia ser considerada um factor de risco independente para o desenvolvimento de CHC em fígados cirróticos. Porém, para alguns autores, esta alteração não tem sensibilidade e especificidade suficientes para justificar que a mesma seja utilizada para a avaliação do risco de desenvolvimento de CHC (Lee et al, 1997). Alguns autores verificaram que alterações semelhantes ocorrem em quadros lesionais de

tipo regenerativo ou degenerativo, como consequência de distúrbios da replicação hepatocelular (Su et al, 1997). Destas verificações surgiu a proposta de que a designação de displasia de grandes células seja substituída pela de "alteração de grandes células" (large cell change) (Bioulac-Sage, 1998). Considerações sobreponíveis podem ser feitas para a displasia/"alteração de pequenas células" embora este tipo de lesão reúna maior consenso relativamente à sua natureza displásica (pré-maligna), nomeadamente no contexto de cirrose hepática (Le Bail et al, 1997; Su et al, 1997). Como argumentos a favor da natureza verdadeiramente displásica da displasia/"alteração de pequenas células" têm-se apontado, para além da própria morfologia, o índice proliferativo relativamente elevado e a expressão da proteína p53 que se demonstrou estar aumentada nestas lesões (Zhao et al, 1994; Su et al, 1997; Kang et al, 1998).

No presente estudo não identificámos, igualmente, a presença de lesões nodulares displásicas. Este resultado negativo pode dever-se, novamente, à deficiente amostragem de fígado não-neoplásico. Esta explicação encontra fundamento no facto de parte dos casos de CHC ter sido diagnosticada em biópsias. Na literatura há evidência de que as lesões nodulares hepatocitárias representam expansões monoclonais de hepatócitos (Aihara et al, 1996). De facto, alterações genéticas como aneuploidia, perda de heterozigotia e presença de instabilidade de sequências microssatélites têm sido observadas neste tipo de lesões (Aihara et al, 1996). A evidência a favor da natureza pré-maligna de algumas lesões nodulares do fígado cirrótico é reforçada por estudos prospectivos de índole epidemiológica, como o realizado por Kaji et al (1994) e por estudos de análise de ADN por citometria estática (Orsatti et al, 1993).

Infecção por vírus da hepatite (VHB e VHC) e CHC

No presente estudo detectámos, por imunocitoquímica, a expressão de antígenos do VHB (AgHBs e/ou AgHBc) em 22 casos (33,8%) da série moçambicana e apenas 2 de 15 casos (13,3%) da série portuguesa. A maior taxa de expressão verificada na série moçambicana coaduna-se com o facto de Moçambique ser uma zona endémica de infecção por VHB. Não foi possível identificar qualquer associação significativa entre a expressão de antígenos do VHB no fígado não-neoplásico e os vários parâmetros clínico-patológicos analisados. Não se identificou nenhum caso com expressão de antígenos do VHB nas células neoplásicas do CHC.

Apesar das incertezas relativamente aos mecanismos da carcinogénese hepática associada a infecção por VHB (já referidas na introdução do presente trabalho), estas são menores do que as (ainda) existentes relativamente aos mecanismos subjacentes a carcinogénese associada à infecção por VHC.

No presente estudo, a infecção por VHC só foi avaliada na série portuguesa, por serologia, em 10 casos, tendo-se detectado anticorpos anti-HCV em 6 doentes (60%). Apesar de não ter sido possível um estudo idêntico na série moçambicana, dados não publicados apontam para uma prevalência da infecção por VHC muito baixa (4% em dadores de sangue). É assim de presumir que, em Moçambique, a prevalência da infecção crónica por VHC na população em geral seja relativamente baixa e não supere a prevalência da infecção por VHB.

Em estudos anteriores foi possível detectar sinais de infecção por VHC (com replicação) no tecido tumoral e peri-tumoral de doentes com CHC (Niu et al, 1995). As proteínas da nucleocápside, do envólucro e/ou não estruturais (3 e 5) do VHC foram detectadas em 3 de 9 casos de CHCs, e em 2 destes casos, no fígado não-neoplásico. Contudo, o papel destas proteínas víricas na carcinogénese do fígado humano não está esclarecido (Haruna et al, 1994). A verificação de que a proteína p70, codificada pela região NS3 do genoma do VHC, possui actividade da helicase e está envolvida na recombinação do ADN sugere que o VHC pode induzir instabilidade genómica através da actividade desta enzima e assim contribuir para o processo de carcinogénese (Kajino et al, 1995).

Recentemente, Moriya et al (1998) demonstraram a indução de CHC em ratinhos transgénicos que exprimiam a proteína do "core" do VHC no tecido hepático e sugeriram a possibilidade desta proteína poder eventualmente ter uma acção carcinogénica directa.

Foi sugerido que o risco de desenvolvimento de CHC em doentes com sinais de infecção crónica por VHC depende do genótipo do vírus, com base na verificação de que o genótipo 1b é o que mais frequentemente se encontra associado ao CHC (Saito et al, 1990; Niu et al, 1995; Caselmann e Alt, 1996; Bréchet et al, 1998). Porém, esta associação não foi confirmada nos trabalhos de outros autores (Yotsuyanagi et al, 1995). No presente trabalho não pudemos avançar no esclarecimento destas discrepâncias já que não analisámos os genótipos do VHC.

A expressão da proteína p53 está aumentada no CHC

No presente estudo observámos imunorreactividade "para" p53 em 20,3% e 52,9% dos CHCs desenvolvidos, respectivamente, em doentes moçambicanos e portugueses.

Na literatura há poucos estudos comparativos da expressão imunocitoquímica da proteína p53 entre as regiões de elevada incidência e as de baixa incidência de CHC. Porém, tendo em consideração que as mutações do gene p53 são mais frequentes nas áreas de elevada incidência de CHC (Oda et al, 1992; Ojangurem et al, 1995) do que nas de incidência baixa ou intermédia seria de esperar que, na série moçambicana, houvesse maior prevalência de casos com expressão da proteína p53 do que na série portuguesa. Para além disso, os nossos resultados são aparentemente surpreendentes em face dos dados previamente publicados relativamente à associação entre imunoexpressão de p53 e infecção por VHB. De facto, em áreas endémicas de infecção por VHB, como em África e no Sudeste Asiático (Goldblum et al, 1993; Aguilar et al, 1994), demonstrou-se elevada taxa de imunoexpressão da proteína p53 em CHCs. Em contrapartida, em países europeus com baixa prevalência de infecção crónica por VHB, a frequência da expressão da proteína p53 em CHCs é baixa (Skopelitou et al, 1996). No trabalho conduzido por Challen et al (1992) verificou-se que um terço de doentes (britânicos) com CHC tinham sinais de infecção crónica por VHB e a expressão da proteína p53 alterada só se verificou em 5% dos CHCs.

Embora não possamos avançar explicações definitivas para os resultados que obtivemos, pensamos que os resultados da série moçambicana podem estar infra-estimados por

razões de natureza técnica. De facto, em grande parte dos casos o material estudado foi obtido de autópsias e as condições de fixação deste material não foram as mais adequadas para a preservação antigénica. Ojanguren et al (1996) verificaram que a fixação prolongada em formol diminui a imunoreactividade "para" a proteína p53 em virtude da alteração da sua antigenicidade. Por outro lado, não se pode excluir a possibilidade de existência de alterações do gene p53 que não condicionam a acumulação da respectiva proteína. Para testar esta hipótese teríamos de pesquisar mutações do gene p53, por métodos de biologia molecular, que não foi possível até ao momento.

Não encontramos associações significativas entre a expressão da proteína p53 e a maior parte das características clínico-patológicas dos casos, em conformidade com o previamente verificado por Nagao et al (1995) e Ojanguren et al (1996).

Constitui excepção, na série portuguesa, a associação significativa ($p=0,038$) entre a expressão da proteína p53 e a diferenciação celular. Verificámos que a expressão da proteína p53 era maior nos CHCs com grau mais elevado de diferenciação celular. Este resultado está de acordo com o obtido por outros autores, como por exemplo por Oda et al (1992), que sugeriram que as alterações do gene p53 ocorrem numa fase tardia do desenvolvimento neoplásico.

Num trabalho recente, Kang et al (1998) estudaram as alterações do gene p53 e da imunoexpressão da respectiva proteína (p53) em diferentes tipos de lesões hepatocelulares incluindo cirrose, nódulos displásicos de baixo grau (NDBG), nódulos displásicos de alto grau (NDAG) e CHC. Estes autores observaram que a imunoexpressão da p53 ocorria em 50% dos CHCs e em 44% dos NDAG. As alterações do gene p53 foram detectadas em 25% dos CHCs. Não se detectaram alterações do gene p53 nos casos de cirrose, NDBG e NDAG. Em face destes resultados, Kang et al (1998) sugeriram que as alterações do gene p53 (e da proteína por ele codificada) ocorrem numa fase relativamente avançada da carcinogénese hepática.

No presente estudo, considerando conjuntamente as séries moçambicana e portuguesa, verificámos uma associação significativa ($p=0,004$) entre a expressão da proteína p53 e o índice proliferativo dos CHCs. Este resultado global foi confirmado na série moçambicana ($p=0,017$) e não pôde ser confirmado na série portuguesa ($p=0,22$). É provável que a pequena dimensão da amostra portuguesa possa ter contribuído para este resultado.

A associação entre a expressão da proteína p53 e o índice proliferativo elevado foi descrita em outras neoplasias tais como o carcinoma da mama (Cattoretti et al, 1988; Barbareschi et al, 1992) e o carcinoma da bexiga (Lipponen, 1993). Em relação ao CHC, Nagao et al (1995) observaram que CHCs com índice proliferativo elevado exprimiam, com maior frequência, a proteína p53 ($p<0,003$). Os nossos resultados estão de acordo com esta observação. Uma associação idêntica foi observada por Ojanguren et al (1996) no estudo de CHCs com diferentes graus de diferenciação celular (II,III,IV).

Na série portuguesa observou-se que todos os CHCs com imunoexpressão de p53 se tinham desenvolvido em doentes do género masculino. Esta verificação resulta provavelmente das características da série portuguesa, com franco predomínio de indivíduos do género masculino (só havia dois elementos do género feminino e a

pesquisa de p53 só foi possível num dos casos). Assim, esta tendência é provavelmente aparente e não reflecte um significado biológico particular.

No presente estudo observámos, na série moçambicana, uma associação estatisticamente significativa ($p=0,017$) entre a expressão da proteína p53 em CHCs e as características do fígado não-neoplásico. Verificámos que a imunoexpressão de p53 era mais elevada nos CHCs desenvolvidos em fígado não-cirrótico (19,2%) do que nos CHCs enxertados em fígados com cirrose (6,9%).

O papel das aflatoxinas na indução de alterações do gene p53 foi analisado em estudos anteriores realizados por outros autores. Entre estes salienta-se o estudo realizado por Unsal et al (1994) que pesquisaram mutações do gene p53 em CHCs de doentes de Moçambique e do Transkei (área rural da África do Sul) e verificaram que, nos casos moçambicanos, a frequência das alterações do gene p53 era mais alta do que nos casos do Transkei. Verificaram, ainda, que mais de 50% das alterações verificadas nos CHCs de doentes de Moçambique consistiam numa mutação de tipo transversão G-T, afectando a terceira base do codão 249 do exão 7. Esta mutação, considerada como "marcador" molecular da acção das aflatoxinas foi demonstrada em vários estudos no homem e em animais (Bressac et al, 1991; Montesano et al, 1997).

Deste modo, em face dos nossos resultados e de outros autores, julgamos as aflatoxinas desempenham um papel fundamental na etiopatogenia dos CHCs desenvolvidos em doentes moçambicanos.

Fica no entanto por explicar a elevada taxa de expressão da proteína p53 nos casos da série portuguesa, que se revelou superior à referida noutros estudos de CHCs de doentes de zonas de incidência baixa ou intermédia de CHC. A possibilidade das alterações da expressão da proteína p53 poder ser secundária à infecção por VHC não passa de uma mera hipótese baseada no facto de se terem identificado mutações do gene p53 (semelhantes às induzidas por aflatoxinas ou não) em CHCs associados a infecção por VHC (Teramoto et al, 1994). Estes resultados sugerem que a hepatocarcinogénese associada a infecção por VHC pode também ser mediada por alterações do gene p53 (Caselmann e Alt, 1996).

Proliferação celular e CHC

No presente estudo, a proliferação celular foi estudada através da expressão imunocitoquímica de MIB-1 (anticorpo monoclonal que reconhece o antígeno Ki-67) associado ao ciclo celular. Este estudo foi efectuado em 15 casos da série portuguesa e 61 casos da série moçambicana ou seja em 76 casos. Considerando as duas séries em conjunto, encontrámos uma relação estatisticamente significativa entre o índice proliferativo dos CHCs e a imunoexpressão da proteína p53 ($p=0,004$) e as características do fígado não-neoplásico ($p=0,0005$).

A associação entre o índice proliferativo e a expressão da proteína p53 foi já discutida, em parte, na secção dedicada à discussão dos resultados de expressão de p53. Tal como anteriormente mencionado, os CHCs com positividade "para" p53 tinham um índice proliferativo mais elevado ($17,2\% \pm 3,7\%$) do que os que não exprimiam p53

(6,8%±1,6%). Resultados sobreponíveis foram obtidos por Nagao et al (1995) numa série de 50 CHCs ($p<0,01$).

Os CHCs desenvolvidos em fígado sem cirrose tinham índice proliferativo médio (15,3%±3,1%) mais elevado do que os CHCs enxertados em fígados com cirrose (4,0%±1,0%) ($p=0,0005$). Importa aqui salientar que a maior parte dos CHCs desenvolvidos em fígado sem cirrose pertenciam à série moçambicana.

A revisão da escassa literatura sobre esta matéria revela resultados discrepantes. Por exemplo, Biesterfeld e Hoffmann (1998) verificaram que o índice proliferativo era mais alto nos fígados cirróticos do que nos fígados não-cirróticos. Estes autores observaram ainda que o índice proliferativo na hepatite por VHB era maior que o índice proliferativo na hepatite por VHC e na hepatite não viral.

Tendo em consideração estes dados, seria de esperar que nos CHCs associados a cirrose se observasse um índice proliferativo mais elevado do que o encontrado em CHCs enxertados em fígado não-cirrótico. Tal não se verificou, no entanto, no material que estudámos. Embora não possamos oferecer uma explicação definitiva para os nossos resultados, sentimo-nos tentados a especular que esta discordância com os dados da literatura pode reflectir a acção de alguns factores, nomeadamente as aflatoxinas, que induzem CHCs nos fígados não-cirróticos. Como se salientou anteriormente, a maior parte dos casos sem cirrose pertenciam à série moçambicana onde um dos principais factores etiológicos é a exposição a aflatoxinas. Aceita-se que estas toxinas podem interferir com a proliferação celular (através da alteração do gene p53) aumentando o índice proliferativo, independentemente da presença ou ausência da cirrose. O facto dos CHCs desenvolvidos em fígado não-cirrótico apresentarem índice proliferativo mais elevado (15,3%±3,1%) e maior taxa de imunexpressão de p53 (19,2%) do que os CHCs enxertados em cirrose (4,0%±1,0% e 6,9%, respectivamente) estão de acordo com esta interpretação.

No nosso estudo, não verificámos uma associação significativa entre o índice proliferativo e o tipo histológico das neoplasias. Na série moçambicana observámos uma associação sugestiva ($p=0,095$) entre o grau de diferenciação celular e o índice proliferativo dos CHCs. Nagao et al (1995) encontraram uma forte associação entre estas duas características ($p<0,0001$). Para além deste, vários trabalhos referem uma associação semelhante (Colleoni et al, 1995), ou seja, os CHCs pouco diferenciados têm índice proliferativo mais elevado do que os CHCs bem diferenciados. Estes resultados, aliados aos verificados no presente trabalho, apoiam a hipótese de que as neoplasias mais indiferenciadas têm proliferação celular aumentada.

Não observámos associação significativa entre ISM e o índice proliferativo das neoplasias. Porém, na série moçambicana verificámos que nos CHCs com ISM o índice proliferativo médio (14,2%±8,9%) era inferior ao índice proliferativo médio dos CHCs sem ISM (24,0%±6,5%). Estes resultados reforçam a ideia de que a ISM não se acompanha de alterações (importantes) da proliferação celular.

O índice proliferativo dos CHCs da série moçambicana revelou-se inferior ao dos CHCs da série portuguesa. Não é fácil oferecer explicações para esta verificação, para além das de natureza técnica, relacionadas com a má preservação do material dos casos

moçambicanos (a maior parte obtidos em autópsias) e submetidos a fixação prolongada. O facto de termos verificado que o índice proliferativo dos CHCs diagnosticados através de pequenas biópsias era significativamente superior ($p=0,0001$) ao verificado em CHCs diagnosticados em autópsias (resultados não mostrados), constitui um argumento a favor desta explicação.

Instabilidade de sequências microssatélites e CHC

No presente estudo, a pesquisa da ISM foi efectuada com o marcador monomórfico BAT-26 em todos os casos na série portuguesa ($n=18$) e em apenas 19 casos da série moçambicana. Observou-se ISM em 5 (26,3%) casos da série moçambicana. Todos os casos da série portuguesa foram negativos.

Há poucos trabalhos publicados sobre a instabilidade de sequências microssatélites em hepatocarcinomas. Destes, destaca-se o de Kazachkov et al (1998) nos EUA que, numa série de 10 CHCs, detectaram instabilidade de ISM em 4 casos (40%).

No presente trabalho a ISM foi identificada em 5 pacientes da série moçambicana, 3 (60%) dos quais com evidência de infecção por VHB, avaliada por estudo imunocitoquímico. Estes resultados, aliados aos obtidos por Salvucci et al (1996) que observaram ISM em 60% de cirroses hepáticas associadas à infecção VHB, são compatíveis com a interpretação de que a infecção por VHB pode ter um papel contributivo para a ocorrência de ISM nos pacientes moçambicanos. No entanto, na série portuguesa não se identificou nenhum CHC com ISM apesar de se terem identificado marcadores de infecção por VHB em alguns casos. Em conjunto, estes resultados sugerem a participação de outro(s) factor(es) que (isoladamente ou em associação à infecção por VHB) possa(m) ser o(s) responsável (eis) pela ocorrência de ISM nos CHCs da série moçambicana. Apesar de não ter sido avaliado directamente o papel das aflatoxinas, é possível que a exposição a estas toxinas possa ter desempenhado algum papel (de magnitude desconhecida) no aparecimento de ISM na série moçambicana.

Sinais de infecção por VHC, avaliados pela detecção serológica de anticorpos anti-HCV, foram identificados em 6 (60%) de 10 doentes da série portuguesa. Não se detectou ISM em nenhum dos CHCs desenvolvidos nestes indivíduos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos previamente por Santos et al (1998) num estudo que incidiu sobre hepatites crónicas e cirroses hepáticas secundárias a infecção por VHC. Neste estudo não se detectou ISM, sugerindo que a ISM não ocorre (pelo menos frequentemente) na doença hepática associada à infecção por VHC.

No presente trabalho não observámos associação entre a ISM e a expressão do gene p53 ($p=0,639$). Estes resultados coadunam-se com os obtidos Kazachkov et al (1998) sugerindo que a ISM não afecta (pelo menos significativamente) os genes que regulam o ciclo celular.

6. CONCLUSÕES PRINCIPAIS

No presente trabalho verificámos que os CHCs desenvolvidos em doentes moçambicanos apresentam um perfil particular. Distiguem-se dos CHCs desenvolvidos numa série de doentes portugueses relativamente a várias características: a) É menor o predomínio dos doentes do género masculino; b) Ocorrem em indivíduos mais jovens; c) Apresentam frequentemente padrão histológico de tipo sólido/anaplásico, com graus de diferenciação celular elevados; d) Desenvolvem-se em grande parte dos casos em fígado sem evidência de cirrose; e) Associam-se frequentemente a sinais de infecção por VHB; f) Apresentam, em cerca de um terço dos casos, instabilidade de sequências microssatélites a qual não se associa significativamente a sinais de infecção por VHB.

Na série moçambicana verificámos que os CHCs desenvolvidos em fígado sem cirrose apresentavam um perfil "molecular" distinto dos CHCs enxertados em fígado com cirrose, caracterizados por maior percentagem de casos com imunoexpressão da proteína p53 (19,2% e 6,9%, respectivamente) ($p=0,017$), índice proliferativo mais elevado ($16,1\% \pm 3,4\%$ e $2,7\% \pm 1,1\%$, respectivamente) ($p=0,0007$) e maior taxa de ocorrência de ISM (40% e 0%, respectivamente) ($p=0,286$). Não verificámos diferenças significativas entre estes sub-grupos de CHCs relativamente à idade e género dos doentes ou sinais de infecção por VHB. Estes factos sugerem que a patogenia dos CHCs desenvolvidos em fígado sem cirrose é diferente da dos CHCs enxertados em fígado com cirrose, eventualmente relacionada com factores etiológicos específicos, nomeadamente aflatoxinas (actuando isoladamente ou em associação com o VHB).

7. BIBLIOGRAFIA

Aaltonen LA, Peltomaki P, Meckin J-P, et al: Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 54:1645 – 1648, 1994.

Aguilar F, Harris CC, Sun T, et al: Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science* 264:1317 – 1319, 1994.

Aihara T, Noguchi S, Sasaki Y, et al: Clonal analysis of precancerous lesion of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 111:455 – 461, 1996.

Anthony PP: Tumours and tumour-like lesions of the liver and biliary tract. *In* MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portman CB (eds): *Pathology of the liver*. Churchill Livingstone, Edinburgh EH1 3AF, 3rd edition, pp 635 – 667, 1994.

Aterman K: Hepatic neoplasia: reflections and ruminations. *Virchows Arch* 427:1 – 18, 1995.

Barbareschi M, Leonardi E, Mauri FA, et al: p53 and c-erbB-2 protein expression in breast carcinomas: an immunohistochemical study including correlations with receptor status, proliferation markers and clinical stage in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 98:408 – 418, 1992.

Barreto J, De la Cruz F, Barguet L, et al: Baseline epidemiological studies for the introduction of hepatitis B vaccine in Mozambique. *Proceedings of the International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases* (Houston), abstract n° 231, 1991.

Bartek J, Bartkova J, Vostesek B, et al: Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6:1699 – 1703, 1991.

Barwick KW, Rosai J: Liver cell tumors and tumors like conditions. *In* Rosai J (editor): *Surgical Pathology*. Mosby Year-Book, Inc, 8th edition pp 899 – 942, 1996.

Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, et al: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2:1129 – 1133, 1981.

Becker SA, Zhou YZ, Slagle BL: Frequent loss of chromosome 8p in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China. *Cancer Res* 56:5092 – 5097, 1996.

Benn J, Schneider RJ: Hepatitis B virus HBx protein activates ras-GTP complex formation and establishes a ras, raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10350 – 10354, 1994.

Benn J, Schneider RJ: Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11215 – 11219, 1995.

Berman C: Malignant disease in the bantu of Johannesburg and Witwatersrand gold mines. *Proc Transvaal Mine Med Off Ass* 15:83, 1935.

Biesterfeld S, Hoffmann E: MIB-1 immunohistometry on Tru-Cut Biopsies in inflammatory and cirrhotic liver disease. *Anal Quant Cytol Histol* 20:268 – 274, 1998.

Bioulac-Sage P: Precursor lesions of hepatocellular carcinoma. Proceedings of the XXII International Congress of the International Academy of Pathology (Nice, France), pp 162 – 174, 1998.

Borzio M, Bruno S, Roncalli M, et al: Liver cell dysplasia is a major risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Gastroenterology* 108(3):812 – 817, 1995.

Borzio M, Tréré D, Borzio F, et al: Hepatocyte proliferation rate is a powerful parameter for predicting hepatocellular carcinoma development in liver cirrhosis. *Mol Pathol* 51:96 – 101, 1998.

Bréchot C: Molecular mechanisms of hepatitis B and C viruses related liver carcinogenesis. Proceedings of the XXII International Congress of the International Academy of Pathology (Nice, France), pp 187 – 197, 1998.

Bréchot C, Jaffredo F, David L, et al: Impact of HBV, HCV and GBV-C/HGV on hepatocellular carcinomas in Europe: results of a European concerted action. *J Hepatol* 29:173 – 183, 1998.

Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP, et al: Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 56:1237 – 1240, 1996.

Bressac B, Kew M, Wands J, et al: Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocarcinoma from South Africa. *Nature* 350:429 – 431, 1991.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368:258 – 261, 1994.

Bruix J, Barrera JM, Bru C, et al: Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* ii:1004 – 1006, 1989.

Caron de Fromentel C, Soussi T: TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chrom Cancer* 4:1 – 15, 1992.

Carriaga MT, Henson DE: Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas. *Cancer* 75:171 – 190, 1995.

Caselmann WH, Alt M: Hepatitis C virus infection as a major risk factor for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 24:61 – 66, 1996.

Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, et al: p53 Expression in breast cancer. *Int J Cancer* 41:178 – 183, 1988.

El-Refaie A, Savage K, Bhattacharya S, et al: HCV-associated hepatocellular carcinoma without cirrhosis. *J Hepatol* 24:277 – 282, 1996.

Falk H: Liver. *In* Schottenfeld D, Fraumeni JF (eds): *Cancer Epidemiology and Prevention*. W B Saunders Company, pp 668 – 682, 1982.

Fargion S, Fracanzoni AL, Piperno A, et al: Prognostic factors for hepatocellular carcinoma in genetic hemochromatosis. *Hepatology* 20:1426 – 1431, 1994.

Feitelson MA, Duan L-X: Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 150:1141 – 1157, 1997.

Ferrel LD, Crawford JM, Dhillon AP, et al: Proposal for standardized criteria for the diagnosis of benign, borderline, and malignant hepatocellular lesions arising in chronic advanced liver disease. *Am J Surg Pathol* 17:1113 – 1123, 1993.

Fishel R, Kolodner RD: Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 5:383 – 393, 1995.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 3:1027 – 1037, 1993.

Furuya K, Nakamura M, Yamamoto Y, et al: Macroregenerative nodule of the liver: A clinicopathological study of 345 autopsy cases of chronic liver disease. *Cancer* 61:99 – 105, 1988.

Gayotto LCC, Bogliolo L: Carcinoma hepatocelular. *In* Filho GB, Pittella JEH, Pereira FEL, Bambirra EA, Barbosa AJ (eds). *Patologia*. Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, pp 645 – 648, 1994.

Gerber MA, Thung SN: The diagnostic value of immunohistochemical demonstration of hepatitis viral antigens in the liver. *Hum Pathol* 18:771 – 774, 1987.

Giacosa A, Hill MJ: Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer Prev.* 5:423 – 424, 1996.

Goldblum JR, Bartos RE, Carr KA, et al: Hepatitis B and alterations of the p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg Pathol* 17:1244 – 1251, 1993.

Goodman ZD: Viral hepatitis. *In* Connor HD, Chandler FW, Schwartz DA, Manz HJ, Lack EE (eds): *Pathology of Infectious Diseases*. Appleton & Lange, pp 365 – 381, 1997.

Goritsas CP, Athanasiadou A, Arvaniti A, et al: The leading role of hepatitis B and C viruses as risk factors for the development of hepatocellular carcinoma. A case control study. *J Clin Gastroenterol* 20:220 – 224, 1995.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, et al: Mutations in the p53 tumour suppressor gene: clue to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855 – 4878, 1994.

Greenblatt MS, Feitelson MA, Zhu M, et al: Integrity of p53 in hepatitis B x antigen-positive and negative hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 57:426 – 432, 1997.

Hamamoto T, Yokozaki H, Semba S, et al : Altered microsatellites in incomplete-type intestinal metaplasia adjacent to primary gastric cancers. *J Clin Pathol* 50:841 – 846, 1997.

Harington JS, MacGlashan ND, Bradshaw E, et al: A spatial and temporal analysis of four cancers in African gold miners from Southern Africa. *Br J Cancer* 31: 665 – 678, 1975.

Haruna Y, Hayashi N, Kamada T, et al: Expression of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 41:312 – 315, 1994.

Harris CC: The 1995 Walter Hubert Lecture – molecular epidemiology of human cancer: insights from the mutational analysis of the p53 tumour-suppressor gene. *Br J Cancer* 73:261 – 269, 1996.

Henderson ST, Petes TD: Instability of simple sequence DNA in *Sacharomyces cerevisie*. *Mol Cell Biol* 12:2749 – 2757, 1992.

Henmi A, Uchida T, Shikata T: Karyometric analysis of liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma. Evidence against precancerous nature of liver cell dysplasia. *Cancer* 55:2594 – 2599, 1985.

Hirohashi S, Shimasoto Y, Ino Y, et al: Distribution of hepatitis B surface and core antigens in human hepatocellular carcinoma and surrounding nontumorous liver. *J Natl Cancer Inst* 69:565 – 568, 1982.

Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, et al: BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 57:300 – 303, 1997.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al: p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49 – 53, 1991.

Hoofnagle JH, Schafer DF: Serologic makers of hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* 6:1 – 10, 1986.

Hsia CC, Kleiner DE Jr, Axiotis CA, et al: Mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma: roles of hepatitis B virus and aflatoxin contamination in the diet. *J Natl Cancer Inst* 84(2): 1638 – 1641, 1992.

Hsu H-C, Lin W-S-J, Tsai MJ: Hepatitis B surface antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer* 52:1825 – 1832, 1983.

Hsu H-C, Wu T-T, Wu M-Z, et al: Evolution of expression of hepatitis B surface and core antigens (HbsAg, HbcAg) in resected primary and recurrent hepatocellular carcinoma in HbsAg carriers in Taiwan. Correlation with local host immune response. *Cancer* 62:915 – 921, 1988.

Hsu H-C, Wum-Z, Chang M-H, et al: Childhood hepatocellular carcinoma develops exclusively in hepatitis B surface antigen carriers in three decades in Taiwan: Report of 51 cases strongly associated with rapid development of liver cirrhosis. *J Hepatol* 2:260 – 267, 1987.

Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, et al: Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350:427 – 428, 1991.

Hytiroglou P, Theise ND, Schwartz M, et al: Macroregenerative nodules in a séries of adult cirrhotic liver explants: issues of classification and nomenclature. *Hepatology* 21:703 – 708, 1995.

Idilman R, De Maria N, Colantoni A, et al: Pathogenesis of hepatitis B and C-induced hepatocellular carcinoma. *J Viral Hep* 5:258 – 299, 1998.

Ikeda K, Saitoh S, Koida I, et al: Multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis. A prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 18: 47 – 53, 1993.

Ilardi CF, Ying YY, Ackerman LV, et al: Hepatitis B virus surface antigen and hepatocellular carcinoma in the people's Republic of China. *Cancer* 46:1612 – 1616, 1980.

Imazeki F, Omata M, Yokosuka O, et al: Integration of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 58: 1055 – 1060, 1986.

International Working Party: Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 22:983 – 993, 1995.

Ishak KG, Anthony PP, Sobin LH: Histological typing of tumours of the liver. World Health Organization. *International Histological Classification of Tumours*. Springer-Verlag, 1994.

Ishak KG, Markin R: Hepatocellular carcinoma. In Damjanov I, Linder J (eds): *Anderson's Pathology*. Mosby-Year Book, Inc. St Louis, 10th edition, pp 1835 – 1838, 1996.

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, et al: Localization of gene for human p53 tumor antigen to band 17p13. *Nature* 320:84 – 85, 1986.

Jakubczak JL, Chisari FV, Merlino G: Synergy between Transforming Growth Factor α and hepatitis B virus surface antigen in hepatocellular proliferation and carcinogenesis. *Cancer Res* 57:3606 – 3611, 1997.

Jego N, Thomas G, Hamelin R: Short direct repeats flanking deletions, and duplicating insertions in p53 gene in human cancers. *Oncogene* 8:209 –213, 1993.

Kaczynski J, Hansson G, Wallerstedt S: Incidence of primary liver cancer and aetiological aspects: a study of defined population from a low-endemicity area. *Br J Cancer* 73 (1): 128 – 132, 1995.

Kahlenberg MS, Stoler DL, Basik M, et al: p53 tumor suppressor gene status and the degree of genomic instability in sporadic colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 20: 1665 – 1670, 1996.

Kaji K, Terada T, Nakamura Y: Frequent occurrence of hepatocellular carcinoma in cirrhotic livers after surgical resection of atypical adenomatous hyperplasia (borderline hepatocellular lesion): a follow up study. *Am J Gastroenterol* 89:903 – 908, 1994.

Kajino K, Aoki H, Hino O: Genomic instability involved in virus-related hepatocarcinogenesis. *Intervirology* 38: 170 – 172, 1995.

Kang YK, Kim CJ, Kim WH, et al: p53 mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in the liver. *Virchows Arch* 432(1):27 – 32, 1998.

Kanto T, Hayhashi N, Takehara T, et al: Bouyant density of HCV recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology* 19:842 – 848, 1994.

Kaplanski C, Chisari FV, Wild CP: Minisatellite rearrangements are increased in liver tumours induced by transplacental aflatoxin B1 treatment of hepatitis B virus transgenic mice, but not in spontaneously arising tumours. *Carcinogenesis* 18 (4) 633 – 639, 1997.

Kazachkov Y, Yoffe B, Khaoustov VI, et al: Microsatellite instability in human hepatocellular carcinoma: relationship to p53 abnormalities. *Liver* 18:156 – 161, 1998.

Kew MC: Clinical, pathologic, and etiologic heterogeneity in hepatocellular carcinoma: evidence from Southern Africa. *Hepatology* 1:366 – 369, 1981.

Kew MC, Ray MB, Desmet VJ, et al: Hepatitis-B surface antigen in tumour tissue and non-tumorous liver in black patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 41:399 – 406, 1980.

Kew MC, Rossouw E, Hodgkinson J, et al: Hepatitis B virus status of southern african blacks with hepatocellular carcinoma: comparison between rural and urban area patients. *Hepatology* 3:65 – 68, 1983.

Kim CM, Koike K, Saito I, et al: HBX gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351:317 –320, 1991.

Kim SO, Park JG, Lee YI: Increased expression of the insulin-like growth factor I (*IGF-I*) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus x gene product. *Cancer Res* 56:3831 – 3836, 1996.

Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, et al: Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 111:307 – 317, 1996.

Krawczak M, Cooper DN: Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms and the role of local DNA sequence environment. *Hum Genet* 86:425 – 441, 1991.

Kress S, Jahn U-R, Buchmann A, et al: p53 mutations in human hepatocellular carcinoma from Germany. *Cancer Res* 52:3220 – 3223, 1992.

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, et al: Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7491 – 7495, 1992.

Kunkel, TA: Slippery DNA and diseases. *Nature* 365:207 – 208, 1993.

Lai MY, Chen PJ, Yang PM, et al: Identification and characterisation of intrahepatic hepatitis B virus DNA in HbsAg-seronegative patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Hepatology* 12:257 – 281, 1990.

Lam KC, Yu MC, Jeung JWC, et al: Hepatitis B virus and cigarette smoking: Risk factors for hepatocellular carcinoma in Hong Kong. *Cancer Res* 42:5246 – 5248, 1982.

Lane DP: Cancer. p53 guardian of the genome. *Nature* 358:15 – 16, 1992.

Lane DP, Crawford L: T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261 – 263, 1979.

Lane DP, Lu X, Hupp T, et al: The role of the p53 protein in apoptotic response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345(1313):277 – 280, 1994.

Le Bail B, Bernard PH, Carles J, et al: Prevalence of liver cell dysplasia and association with HCC in a series of 100 cirrhotic liver explants. *J Hepatol* 27:835 – 842, 1997.

Lee H-S, Rajagopalan MS, Vyas GN: a lack of direct role of hepatitis B virus in the activation of ras and c-myc oncogenes in human hepatocellular carcinogenesis. *Hepatology* 8:1116 – 1120, 1988.

Lee RG, Tsamandas AC, Demitris AJ: Large cell change (liver cell dysplasia) and hepatocellular carcinoma in cirrhosis: matched case-control study, pathological analysis and pathogenetic hypothesis. *Hepatology* 26:1415 – 1422, 1997.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351:453 – 456, 1991.

Levine AJ, Perry ME, Chang A, et al: The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 69:409 – 416, 1993.

Linzer D, Levine A: Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43 – 52, 1979.

Lipponen PK: Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 53:365 – 370, 1993.

Liu B, Farrington SM, Peterson GM, et al: Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med* 1:348 – 352, 1995.

Lohyia G, Nichols LM, Hsiaeh D, et al: Aflatoxin content of foods served to a population with a high incidence of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 7:750 – 752, 1987.

London WT: Primary hepatocellular carcinoma - etiology, pathogenesis, and prevention. *Hum Pathol* 12(12):1085 – 1097, 1981.

Lothe RA: Microsatellite instability in human solid tumors. *Mol Med Today* 3:61 – 68, 1997.

Lu SN, Lin TM, Chen CJ, et al: A case-control study of primary hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer* 62:2051 – 2055, 1988.

Lunn MR, Zhang Y-J, Wang L-Y, et al: p53 Mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res* 57:3471 – 3477, 1997.

MacDonald GA, Greenson JK, Saito K, et al: Microsatellite instability and loss of heterozygosity at DNA mismatch repair gene loci occurs during hepatic carcinogenesis. *Hepatology* 28(8):90 – 97, 1998.

McGlynn KA, Rosvold EA, Lustbader ED, et al: Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (6): 2384 – 2387, 1995.

Melbye M, Skinhol P, Nielsen NH, et al: Virus associated cancers in Greenland: frequent hepatitis B virus infection but low primary hepatocellular carcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst* 73:1267 – 1272, 1984.

Michael M-L, Tiollais P: Structure and expression of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 7:61S – 63S, 1987.

Miller RH, Kaneko S, Chung CT, et al: Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 9:322 – 327, 1989.

Miyagawa S, Kawasaki S, Makuuchi M: Comparison of the characteristics of hepatocellular carcinoma between hepatitis B and C viral infection: tumor multicentricity in cirrhotic liver with hepatitis C. *Hepatology* 24:307 – 310, 1996.

- Montesano R, Hainaut P, Wild CP: Hepatocellular carcinoma: from gene to public health. *J Natl Cancer Inst* 89:1844 – 1851, 1997.
- Moore SW, Hesselning PB, Wessels G, et al: Hepatocellular carcinoma in children. *Pediatr Surg Int*. 12:266 – 270, 1997.
- Moriarty AM, Alexander H, Lerner RA, et al: Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: Serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science* 227:429 – 432, 1985.
- Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al: The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4:1065 – 1067, 1998.
- Muir CS: Cancer mapping: overview and conclusions. *Recent Results Cancer Res* 114:269 – 273, 1989.
- Muñoz N, Bosch X: Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *In* Okuda K, Ishak KA, (eds): *Neoplasms of the liver*. Tokyo, Springer, pp 3 – 19, 1987.
- Nagai H, Ponglikitmongkol M, Fujimoto J, et al: Genomic aberrations in early stage human hepatocellular carcinomas. *Cancer* 82 (3): 454 – 461, 1998.
- Nagao T, Ishida Y, Yamazaki K, et al: Nucleolar organizer regions in hepatocellular carcinoma related to the cell cycle, cell proliferation and histologic grade. *Pathol Res Pract* 191:967 – 972, 1995.
- Nagao T, Kondo F, Sato T, et al: Immunohistochemical detection of aberrant p53 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with cell proliferative activity indices, including mitotic index and MIB-1 immunostaining. *Hum Pathol* 26:326 – 333, 1995.
- Natoli G, Avantaggiati ML, Chirillo P, et al: Ras- and raf dependent activation of c-Jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene* 9:2837 – 2843, 1994.
- Niu J, Kumar U, Monjardino J, et al: Hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 48:880 – 882, 1995.
- Nolte M, Werner M, Nasarek A, et al: Expression of proliferation associated antigens and detection of numerical chromosome aberrations in primary human liver tumours: relevance to tumour characteristics and prognosis. *J Clin Pathol* 51:47 – 51, 1998.
- Oda T, Tsuda H, Scarpa A, et al: p53 gene spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 52:6358 – 6364, 1992.
- Ojanguren I, Ariza A, Castella EM, et al: p53 immunoreactivity in hepatocellular adenoma, focal nodular hyperplasia, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 26:63 – 68, 1995.

Ojanguren I, Castella E, Lljao M, et al: p53 immunoreaction in hepatocellular carcinoma and its relationship to etiologic factors. A fine needle aspiration study. *Acta Cytol* 40:1148 – 1153, 1996.

Okada S, Sato T, Okusaka T, et al: Past exposure to hepatitis B virus as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Br J Cancer* 77:2028 – 2031, 1998.

Okuda K: Hepatocellular carcinoma: recent progress. *Hepatology* 15:948 – 963, 1992.

Orsatti G, Theise ND, Thung SW, et al: DNA image cytometric analysis of macroregenerative nodules (adenomatous hyperplasia) of the liver: evidence in support of their preneoplastic nature. *Hepatology* 17:621 – 627, 1993.

Ozturk M: p53 mutations in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 338:1356 – 1359, 1991.

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, et al: The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the *NF-kappa B* precursor protein and the activation of *NF-kappa B*. *Cell* 78:773 – 786, 1994.

Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, et al: GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 268 (5219): 1912 – 1914, 1995.

Paterson AC, Isaacson C: Hepatocellular carcinoma in an urbanised area black community. A changing pattern. *Virchows Arch (A)* 395:273 – 278, 1982.

Paterson AC, Kew MC, Herman AAB, et al: Liver morphology in southern african blacks with hepatocellular carcinoma: a study within the urban environment. *Hepatology* 5:72 – 78, 1985.

Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen L, et al: Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 53:5853 – 5855, 1993.

Peters RL, Afroudakis AP, Tatter D: The changing incidence of association of hepatitis B with hepatocellular carcinoma in California. *Am J Clin Pathol* 68:1 – 7, 1977.

Popper H, Gerber MA, Thung SN: The relation of hepatocellular carcinoma to infection with hepatitis B and related viruses in man and animals. *Hepatology* 2:1S-9S, 1982.

Popper H, Shafritz DA, Hoofnagle JH: Relation of the hepatitis B virus carrier state to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 7:764 – 772, 1987.

Prates MD, Torres FO: A cancer survey in Lourenço Marques, Portuguese East Africa. *J Natl Cancer Inst* 35:729 – 757, 1965.

Rijntjes PJM, Van Ditzhuijsen TJM, Vanloon AM: Hepatitis B virus DNA detected in formalin-fixed liver specimens and its relation to serologic markers and histopathologic features in chronic liver disease. *Am J Pathol* 120:411 – 418, 1985.

Robinson WS, Miller RH, Marion PL: Hepadnavirus and retrovirus share genome homology and features of replication. *Hepatology* 7: 64S – 73S, 1987.

Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, et al: Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6547 – 6549, 1990.

Saito K, Sullivan D, Haruna Y, et al: Detection of hepatitis C virus RNA sequences in hepatocellular carcinoma and its precursors by microdissection polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 121:400 – 403, 1997.

Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T: Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 69:3893 – 3896, 1995.

Sakuma K, Saitoh N, Kasai M, et al: Relative risks of death due to liver disease among Japanese male adults having various statuses for hepatitis B s antigen/antibody in serum: a prospective study. *Hepatology* 8:1642 – 1646, 1988.

Salvucci M, Lemoine A, Azoulay D, et al: Frequent microsatellite instability in post hepatitis B viral cirrhosis. *Oncogene* 13:2681 – 2685, 1996.

Santos C, Sarmiento JA, Seruca R, et al: Instabilidade de microssatélites e infecção por vírus da hepatite C (VHC). *J Port Gastreenterol* 5:56, 1998.

Santos NR, Seruca R, Costância M, et al: Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathologic implications and prognosis. *Gastroenterology* 110:38 – 44, 1996.

Schluger KL, Bodenheimer H Jr: Tackling liver cancer with interferon. *Lancet* 346:1049 – 1050, 1995.

Scorsone KA, Zhou YZ, Butel JS, et al. p53 Mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China. *Cancer Res* 52:1635 – 1638, 1992.

Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, et al: Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of stomach. *Cancer* 77:1620, 1996.

Shibata M, Morizane T, Uchida T, et al: Irregular regeneration of hepatocytes and risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis and cirrhosis with hepatitis-C-virus infection. *Lancet* 351: 1773 – 1777, 1998.

Shindo M, di Bisceglie A, Akatsuka T, et al: The physical state of the negative strand of hepatitis C virus RNA in serum of patients with chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad USA* 91:8719 – 8723, 1994.

Skopelitou A, Hadjiyannakis M, Alexepoulou, et al: p53 expression in hepatocellular carcinoma in Greece. Correlation with epidemiological and histopathological data. *Pathol Res Pract* 192:1100 – 1106, 1996.

Strand M, Prolla TA, Liskay LM, et al: Destabilization of simple repetitive DNA in Yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365:274 – 276, 1993.

Strickler JG, Zheng J, Shu Q, et al: p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer. *Cancer Res* 54:4750 – 4755, 1994.

Su Q, Benner A, Hofmann WJ, et al: Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Arch* 431:391 – 406, 1997.

Summers J: Three recently described animal virus models for human hepatitis B virus. *Hepatology* 1: 179 – 183, 1987.

Suzuki K, Uchida T, Horiuchi R, et al: Localization of hepatitis B virus surface and core antigens in human hepatocellular carcinoma by immunoperoxidase methods. Replication of complete virions of carcinoma cells. *Cancer* 56:321 – 327, 1985.

Svoboda D, Crady H, Higginson HJ: Aflatoxin B1 injury in rat and monkey liver. *Am J Pathol* 49:1023 – 1051, 1966.

Szilagyi A, Alpert L: Clinical and histopathological variation in hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 90(1):15 – 23, 1995.

Takagi H, Sharp R, Hammermeister C, et al: Molecular and genetic analysis of liver oncogenesis in transforming growth factor α transgenic mice. *Cancer Res* 52:5171 – 5177, 1992.

Takahashi K, Kishimoto S, Yoshizawa H, et al: p26 protein and 33-nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from infected hosts. *Virology* 191:431 – 434, 1992.

Takano S, Yokosuka O, Imazeki F, et al: Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: a prospective study of 251 patients. *Hepatology* 21:650 – 655, 1995.

Tanaka T, Miyamoto H, Hino O, et al: Primary hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus-DNA integration of hepatocellular carcinoma in childhood with hepatitis B virus infection. *Cancer* 62:2363 – 2369, 1986.

Terada T, Terasaki S, Nakanuma Y: A clinicopathologic study of adenomatous hyperplasia of the liver in 209 consecutive cirrhotic livers examined by autopsy. *Cancer* 72:1551 – 1556, 1993.

Teramoto T, Satonaka K, Kitazawa S, et al: p53 gene abnormalities are closely related to hepatoviral infections and occur at late stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 54: 231 – 235, 1994.

Theise ND, Schwartz M, Miller C, et al: Macroregenerative nodules and hepatocellular carcinoma in forty-four sequential adult liver explants with cirrhosis. *Hepatology* 16:949 – 955, 1992.

Tiollais P, Pourcel C, Dejean A: The hepatitis B virus. *Nature* 317:489 – 495, 1985.

Torres FO: Carcinoma primitivo do fígado. Incidência, tipos histológicos e considerações etio-patogênicas. *Rev Est Gerais Univ Moç* 3:557 – 613, 1966.

Torres FO, Purchase IFH, Van Der Watt JJ: The aetiology of primary liver cancer in bantu. *J Pathol* 102:163 – 169, 1970.

Tozuka S, Uchida T, Susuki K, et al: State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with noncarcinomatous liver disease. Its special relationship with necroinflammatory activity and the stage of disease. *Arch Pathol Lab Med* 113:20 – 25, 1989.

Tsai JF, Jeng JE, Ho MS, et al: Efecet of hepatitis C and B virus infection on risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Br J Cancer* 76(7):968 – 974, 1997.

Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, et al: Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 328:1797 – 1801, 1993.

Unsal H, Yakicier C, Marcais C, et al: Genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:822 – 826, 1994.

van Doorn LJ, Kleter B, Stuyver L, et al: Analysis of hepatitis C virus genotypes by a line probe assay and correlation with antibody profiles. *J Hepatol* 21:122 – 129, 1994.

Van Rensburg SJ, Cook-Mozaffari P, Van Schalkwyk DJ, et al: Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. *Br J Cancer* 51:713 – 726, 1985.

Vogelstein B, Kinzler KW: p53 function and dysfunction. *Cell* 70:523 – 526, 1992.

Zhao M, Zhang N-X, Economou M, et al: Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in liver lesions: bcl-2 protein is expressed in hepatocellular carcinomas but not in liver cell dysplasia. *Histopathology* 25:237-245, 1994.

Wands JR, Blum HE: Primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 313: 1256 – 1262, 1991.

Wang J, Chevinesse X, Henglein B, et al: Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in hepatocellular carcinoma. *Nature* 343:555 – 557, 1990.

Wild CP, Rasheed FN, Jawala MBF, et al: In-utero exposure to aflatoxin in West Africa. *Lancet* 337:1602, 1991.

Yeh FS, Yu MC, Mo CC, et al: Hepatitis B virus, aflatoxins and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *Cancer Res* 49:2506 – 2509, 1989.

Yoshida Y, Kanematsu T, Matsumata T, et al. A comparative study on hepatocellular carcinoma between South Africans and Japanese from the viewpoint of nuclear DNA content. *Br J Cancer* 69:362 – 366, 1994.

Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K, et al: Hepatitis C virus genotypes and development of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 15:1352 – 1355, 1995.

Yu M-W, Chen C-J: Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 53:790 – 794, 1993.

Zhao M, Zhang N-X, Economou M, et al: Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in liver lesions: bcl-2 protein is expressed in hepatocellular carcinomas but not in liver cell dysplasia. *Histopathology* 25:237-245, 1994.

8. RESUMO

Há uma grande variabilidade geográfica na incidência do carcinoma hepatocelular (CHC), a qual tem sido atribuída à prevalência variável dos diferentes factores etiológicos do CHC.

Nas áreas de incidência elevada (ou "elevadíssima") há evidência de uma forte associação do CHC com a infecção crónica por vírus da hepatite B (VHB) e/ou exposição a aflatoxinas. Em contrapartida, nas áreas de baixa incidência de CHC apontam-se como factores etiológicos a infecção crónica por vírus da hepatite C (VHC) e a cirrose hepática, entre outros.

As características clínico-patológicas dos CHCs que se desenvolvem em áreas de incidência elevada são diferentes das que se verificam nas áreas de incidência baixa. Os primeiros, ao contrário dos segundos, tendem a ocorrer em indivíduos relativamente jovens e predominantemente do género masculino, possuem graus histológicos mais elevados e apresentam maior frequência de alterações do gene p53.

O presente estudo foi realizado com o objectivo de comparar várias características dos CHCs de doentes do Sul de Moçambique (área de incidência "elevadíssima" de CHC) e do Norte de Portugal (área de incidência intermédia de CHC).

Estudámos duas séries de CHCs, uma proveniente de Moçambique (65 casos) e outra de Portugal (18 casos). Estudámos algumas características clínicas dos doentes e histopatológicas das neoplasias e do fígado não-neoplásico e analisámos a imunoexpressão da proteína p53, a instabilidade de microssatélites (utilizando o marcador monomórfico BAT-26) e a proliferação celular (através da expressão imunocitoquímica de MIB-1). Pesquisámos também sinais de infecção por VHB (por imunocitoquímica) e de infecção por VHC (por serologia), esta avaliada apenas na série portuguesa.

Na série moçambicana verificámos que os CHCs ocorriam, em média, duas décadas mais cedo ($43,6 \pm 15,9$ anos) do que nos doentes portugueses ($64,2 \pm 8,4$ anos), tendo-se observado 5 casos de CHC em crianças.

O predomínio de doentes do género masculino foi menor na série moçambicana (H/M=1,5/1) do que na série portuguesa (H/M=8/1).

A presença de cirrose no fígado adjacente aos CHCs revelou-se menor na série moçambicana (51,8%) do que na série portuguesa (80%).

Os CHCs desenvolvidos em doentes moçambicanos apresentavam um padrão morfológico mais agressivo (maior taxa de carcinomas de tipo sólido/anaplásico e grau de diferenciação celular mais elevado) do que na série portuguesa.

Detectámos uma taxa mais elevada de infecção por VHB nos doentes da série moçambicana (33,8%) do que na série portuguesa (13,3%). Num sub-grupo de doentes oriundos de Portugal detectámos sinais de infecção por VHC em 60% dos casos.

Verificámos que as taxas de imunoexpressão da proteína p53 e MIB-1 eram menores na série moçambicana (20,3% e 42,6%, respectivamente) do que na série portuguesa (52,9% e 100%, respectivamente). Estes resultados poderão dever-se a condições deficientes de preservação antigénica nos casos moçambicanos, em grande parte diagnosticados em material de autópsia, fixado em condições inadequadas.

Apenas detectámos instabilidade de microssatélites em CHCs da série moçambicana (26,3%), 60% dos quais diagnosticados em doentes com sinais de infecção por VHB.

Na série moçambicana verificámos que os CHCs desenvolvidos em fígado sem cirrose apresentavam um perfil "molecular" distinto dos CHCs enxertados em fígado com cirrose, caracterizados por maior percentagem de casos com imunoexpressão da proteína p53 (19,2% e 6,9%, respectivamente) ($p=0,017$), índice proliferativo mais elevado ($16,1\% \pm 3,4\%$ e $2,7\% \pm 1,1\%$, respectivamente) ($p=0,0007$) e maior taxa de ocorrência de ISM (40% e 0%, respectivamente) ($p=0,286$). Não verificámos diferenças significativas entre estes sub-grupos de CHCs relativamente à idade e género dos doentes ou sinais de infecção por VHB. Estes factos sugerem que a patogenia dos CHCs desenvolvidos em fígado sem cirrose é diferente da dos CHCs enxertados em fígado com cirrose, eventualmente relacionada com factores etiológicos específicos, nomeadamente aflatoxinas (actuando isoladamente ou em associação com o VHB).

Em conjunto, os resultados deste estudo permitiram confirmar que o perfil clínico-patológico e "molecular" dos CHCs desenvolvidos em doentes do Sul de Moçambique é diferente do observado em CHCs de doentes do Norte de Portugal. É de supor, em face dos resultados que obtivemos e da evidência da literatura, que tal facto se deve a factores etiológicos diferentes e tempos de actuação distintos nas duas populações estudadas.