

CARCINOMA HEPATOCELULAR ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO EM MATERIAL DE AUTÓPSIA

A. COSTA E SILVA, J.O. SOARES E A. BAPTISTA

Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santa Maria. Centro de Estudos de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina de Lisboa.

RESUMO

Os autores fazem uma revisão de 98 casos de carcinoma hepatocelular (CHC) que correspondem a 1,05% das autópsias efectuadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santa Maria num período de cerca de 16 anos (1970 - Março 1986). Estes tumores são mais frequentes no homem do que na mulher (5,1:1). Em ambos os sexos a 7.ª década é a mais atingida. O tipo macroscópico dos tumores é o multinodular em 70% dos casos; existe associação em cirrose em 88% dos casos. Os tipos histológicos mais frequentes são o trabecular e o pseudoglandular em 67% e 20% dos casos respectivamente. O citoplasma das células tumorais, no geral eosinófilo e homogéneo, tem frequentemente inclusões de tipo hialino globular e de Mallory, pigmento biliar e aspecto claro. Entre os factores etiológicos geralmente apontados na carcinogénese hepática, o álcool e o vírus da hepatite B foram os mais frequentes, algumas vezes associados. No estudo imuno-histoquímico efectuado com um método de imunoperoxidase, os antígenos de superfície e *core* da hepatite B (AgHBs e AgHBc), foram positivos no tecido hepático respectivamente em 24% e 9% dos casos testados e sempre negativos no tecido tumoral; a alfa-1-antitripsina (AAT), a alfa-fetoproteína (AFP) e o antígeno carcino-embriónico (CEA) foram positivos no tecido tumoral respectivamente em 51%, 18% e 25% dos casos testados.

SUMMARY

A morphologic and immunologic study of pathologic findings in hepatocellular carcinoma

The pathologic findings of 98 cases of hepatocellular carcinoma (HCC) were reviewed. HCC was present in 1.05% of the autopsies performed during a sixteen-year period (1970 - March 1986) in the Pathology Department of the University Hospital de Santa Maria in Lisbon. Men were more frequently affected than women (5.1:1). The peak of incidence was the 7th decade for both sexes. The gross anatomic pattern was multinodular in 70% of the cases and the liver was cirrhotic in 88%. The histologic types most frequently found were the trabecular and pseudoglandular in 67% and 20% of the cases. The cytoplasm of the tumor cells was generally eosinophilic and homogeneous, and in a certain number of cases was rich in inclusion bodies of globular hyalin and Mallory's hyalin types. Bile pigment and clear cell areas were also frequently present in the tumors. Alcohol and hepatitis B virus either isolated or associated were the most frequent etiologic-related factors. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B *core* antigen (HBcAg) were positive in the liver tissue in 24% and 9% of the tested cases using an immunoperoxidase method; they were consistently negative in the tumors. Alpha-1-antitrypsin (AAT), alpha-fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA) were positive in the tumor tissue in 51%, 18% and 25% of the tested cases.

INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) constitui cerca de 90% dos casos de carcinoma primitivo do fígado¹, e em muitos países é uma das formas mais frequentes de cancro^{2,3,4,5}. Três factores principais entre outros, têm sido identificados em diferentes partes do mundo, como tendo um aparente papel etiológico no CHC: a ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas; a infecção crónica pelo vírus da hepatite B; e um consumo excessivo de álcool^{6,7,8,9}. Nesta diversidade de factores assenta seguramente a enorme variabilidade geográfica na incidência do CHC, que tem sido documentada em numerosos estudos^{7,10,11,12,13,14}.

Em Portugal, o elevado consumo de álcool e as lesões hepáti-

cas em relação com este são problemas conhecidos¹⁵. A infecção crónica pelo vírus da hepatite B é também entre nós um problema cada vez mais importante¹⁶.

Recentemente tem havido um renovado interesse no estudo do CHC, pela possibilidade de reduzir a sua incidência actuando na prevenção¹⁷. Estes factos justificam o interesse de mais um estudo morfológico nesta área da patologia.

Com a generalização recente do uso de métodos imuno-histoquímicos, vários antígenos têm sido demonstrados no CHC^{18,19,20,21,22,23}. O interesse da sua identificação como elemento diagnóstico e etiológico, bem como os diferentes aspectos da sua distribuição no tecido tumoral e hepático, constituíram igualmente, propósito deste estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho é uma revisão do material de arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santa Maria, num período de cerca de 16 anos (1970 - Março 1986). Foram consultados os relatórios de autópsias e a informação clínica anexa. Com base nestes dados fez-se a distribuição por idades e sexos e a classificação macroscópica; nesta consideraram-se os tipos uninodular (maciço), multinodular (nodular) e difuso^{6, 24}. Para a classificação histológica seguiram-se os critérios da OMS²⁵ e as recomendações do Centro Fogarty para a uniformização da nomenclatura²⁶ que incluem 6 tipos: trabecular, pseudoglandular, sólido, cirroso, células claras e pleomórfico. Os tumores foram ainda classificados em três graus de malignidade histológica²⁵. Estudou-se a associação com a cirrose hepática pelo exame histológico de zonas sem tumor quando existentes e/ou pelos diapositivos e descrição macroscópica feita nos relatórios de autópsia. Os prováveis factores etiológicos foram igualmente avaliados pelo exame histológico do fígado, imuno-histoquímica e pela história clínica.

Todo o material tinha sido fixado em formol a 10% e incluído em parafina. Foram revistas as lâminas em arquivo. Em todos os casos em que dispusémos dos blocos foram feitas colorações de Perls, PAS após diastase, tricrómio de Mallory, orceína segundo Shikata^{27, 28} e azul de Vitória²⁹. Foi também efectuado o estudo imuno-histoquímico pelo método da peroxidase-antiperoxidase segundo Sternberger e col.³⁰ Foram pesquisados os seguintes antígenos: antígenos de superfície e «core» (AgBHs e AgHBc) do vírus da hepatite B, alfa-fetoproteína (AFP), alfa-1-antitripsina (AAT) e antígeno carcino-embriónico (CEA). Usaram-se anticorpos policlonais adquiridos a Dako-Dinamarca. Os soros para pesquisa de AgHBs, AgHBc e AFP estavam pré-diluídos em kit. O soro anti-AAT foi usado diluído a 1:800 e o soro anti-CEA a 1:300. Os restantes soros e respectivas diluições usadas no método foram os seguintes: soro normal de porco, a 1:10, soro de porco anti-imunoglobulina G de coelho a 1:30, complexo PAP de coelho a 1:100. Após a desparafinação e hidratação dos cortes, a peroxidase endógena foi bloqueada pelo peróxido de hidrogénio a 3% em água destilada durante 5 minutos. A prevenção da marcação inespecífica fez-se com soro normal da mesma espécie animal dadora do anticorpo secundário, durante 20 minutos. As incubações com os anticorpos primários específicos, anticorpo *ponte* e PAP, foram efectuadas à temperatura ambiente, durante cerca de 30 minutos, e as lavagens em 0,01 M PBS pH 7,6. A peroxidase foi revelada com diaminobenzidina — H₂O₂ segundo o método de Graham e Karnovsky³¹. Os cortes foram corados com hematoxilina de Harris durante 30 segundos para contraste, desidratados e montados em DPX. Fizeram-se os seguintes controlos: processamento em simultâneo com cada série de lâminas de um caso positivo já conhecido e substituição do anticorpo primário por soro da mesma espécie animal não imunizada, ou PBS.

RESULTADOS

No período de 16 anos incluído neste estudo, efectuaram-se no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santa Maria 9294 autópsias, sendo 98 (1,05%) de doentes com carcinoma hepatocelular (Quadro I). Havia 82 homens e 16 mulheres, sendo a relação M:F de 5,1:1. As idades média eram 55,4 (29-89) anos para os homens e 57,5 (24-78) anos para as mulheres (Quadro II). Todos os doentes eram de raça branca excepto 5, 2 orientais e 3 negros. O tamanho do fígado ou mais raramente o seu peso constavam do relatório de autópsia em 53 casos, estando na generalidade aumentados. As dimensões do fígado variavam entre

QUADRO I

Ano	Autópsias	CHC	% carc. em aut.
1970	540	5	0,92
1971	479	3	0,62
1972	537	5	0,93
1973	591	8	1,35
1974	588	6	1,02
1975	494	5	1,01
1976	452	7	1,54
1977	475	2	0,42
1978	606	5	0,82
1979	584	12	2,05
1980	520	7	1,34
1981	607	6	0,98
1982	550	4	0,72
1983	678	9	1,32
1984	678	4	0,58
1985	702	6	0,85
1986*	203	4	1,97
TOTAL	9294	98	1,05

* Até Março

QUADRO II

Distribuição por idades e sexos

Idade (anos)	Masculino	Feminino
0-9	0	0
10-19	0	0
20-29	1	3
30-39	1	0
40-49	9	1
50-59	21	2
60-69	31	7
70-79	16	3
80-	2	0
Idade Média (anos) (Limites)	55,5 (27-89)	57,5 (24-78)
TOTAL	82* (5,1:1)	16

*1 caso sem idade indicada

QUADRO III

Tipos macroscópicos*

	N.º de casos	%
Uninodular	(22)	29,7)
Multinodular	52	(70,2)
Difuso	0	

*74 casos

18 × 10 × 6 cm e 38 × 23 × 13 cm, e os pesos entre 1180g e 6750g. O tipo macroscópico do tumor pôde caracterizar-se em 74 casos. O padrão mais frequente foi o multinodular em 52 casos (70,2%), seguindo do padrão uninodular em 22 casos (29,7%). Nenhum dos casos correspondia a um tipo difuso (Quadro III).

Em 71 casos (72,4%) dispusémos de lâminas para confirma-

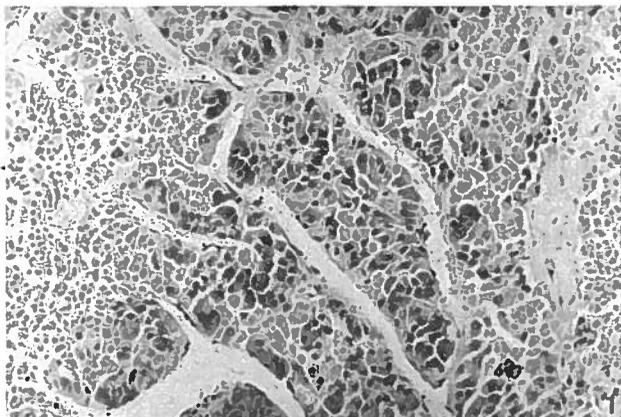


Fig. 1 — Tipo trabecular. Tumor bem diferenciado de estrutura em cordões ou trabéculas de várias células de espessura, delimitados por espaços vasculares com revestimento endotelial. (H.E., ampl. original 250×)

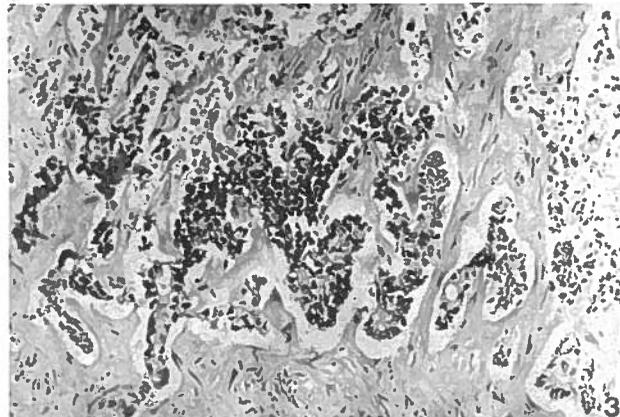


Fig. 3 — Tipo cirroso. Tumor medianamente diferenciado com cordões celulares separados por faixas de fibrose. Nos campos superior e direito da fotografia as células tumorais apresentam alterações degenerativas e necrose (H.E. ampl. original 250×)

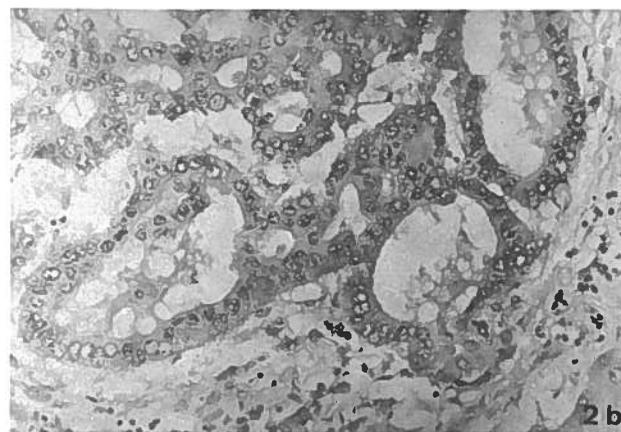
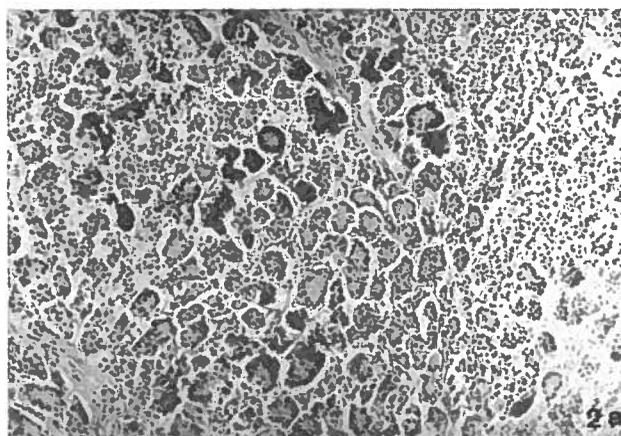


Fig. 2 (a) — Tipo pseudoglandular. Tumor bem diferenciado com células agrupadas em pequenos ácinos por vezes com lume evidente, mantendo-se ainda a arquitetura vascular (H.E., ampl. original 125×). (b) — Tipo pseudoglandular. Estrutura em foliculos de diâmetro variável e com conteúdo amorfo e eosinófilo, dando o aspecto *thyroid-like*. (H.E., ampl. original 400×)

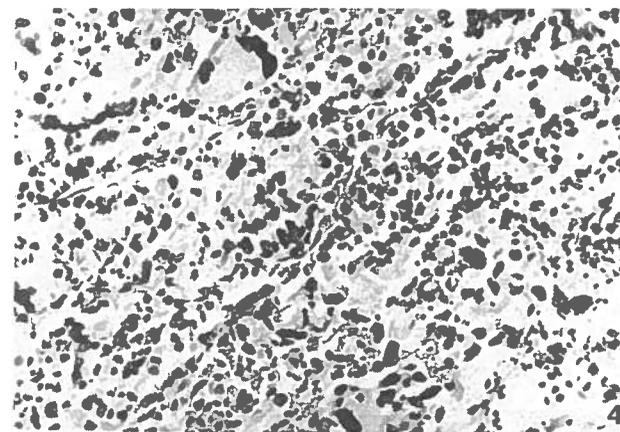


Fig. 4 — Tipo pleomórfico. Tumor pouco diferenciado em que a estrutura vascular já não é reconhecível, o polimorfismo nuclear é evidente e há células gigantes (H.E., ampl. original 250×)

ção histológica do diagnóstico; este material foi considerado suficiente para o estudo histológico em 55 casos (56,1%). O padrão mais frequente encontrado foi o trabecular em 37 casos (67,2%),

seguido do pseudoglandular em 11 casos (20,0%). No tipo trabecular (Fig. 1) o tumor reproduz a estrutura cordonal do fígado, com trabéculas de mais de duas células de espessura, delimitadas por fibras de reticulina e circunscrevendo espaços com revestimento endotelial. No tipo pseudoglandular (Fig. 2) o aspecto observado era geralmente o de pequenos ácinos bem diferenciados, com lumes pequenos. Por vezes encontravam-se imagens foliculares, isto é, lumes grandes com conteúdo eosinófilo e amorfo, delimitados por uma camada de células cúbicas, correspondendo ao aspecto que tem sido designado por *thyroid-like*. A fibrose mais ou menos acentuada foi um achado frequente nos tumores, geralmente em relação com necrose tumoral. Em 2 casos (4%) que foram colocados no tipo cirroso era particularmente marcada e em extensas áreas (Fig. 3). Observámos 4 casos (7,2%) do tipo pleomórfico, correspondendo a tumores pouco diferenciados com acentuado polimorfismo nuclear e células gigantes (Fig. 4). Apenas 1 caso (2%) era constituído na totalidade por células claras (Fig. 5). Não foi observado nenhum caso do tipo sólido, correspondendo este a um padrão trabecular em que a estrutura é compacta, não permitindo distinguir a arquitetura sinusoidal do tumor (Quadro IV).

Foram considerados 3 graus de malignidade histológica ou di-

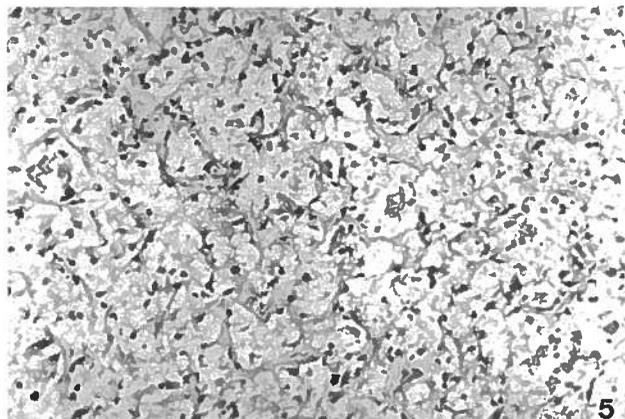


Fig. 5 — Tipo células claras. Tumor de células com citoplasma vasto e vazio, núcleos pequenos e moderado estroma fibroso. (H.E., ampl. original 250×)

QUADRO IV
Tipos histológicos*

	N.º de casos	%
Trabecular	37	(67,2)
Pseudoglandular	11	(20,0)
Sólido	0	
Cirroso	2	(3,6)
Pleomórfico	4	(7,2)
Células claras	1	(1,8)

*55 casos

ferenciação nos carcinomas hepatocelulares, sendo 29 casos (52,7%) classificados como bem diferenciados, 14 casos (25,4%) moderadamente diferenciados e 12 casos (21,8%) pouco diferenciados.

Foi feita uma análise das características do citoplasma das células tumorais que era em geral eosinófilo e homogêneo, sendo raro o aspecto granular. Em 18 casos (32,7%) o citoplasma tinha em extensas áreas do tumor aspecto claro, sugerindo a presença de glicogênio e/ou lípidos (Fig. 6). A presença de pigmento biliar no citoplasma ou em estruturas de tipo canalicular constituindo cilindros (Fig. 7) foi observada em 24 casos (43,6%). Existia material hialino de tipo globular no citoplasma das células tumorais em 26 casos (47,2%), e com tipo de hialino de Mallory (Fig. 8), em 11 casos (20,0%). A presença simultânea de hialino globular e hialino de Mallory foi verificada em 6 casos (10,9%).

Em 55 casos avaliámos a associação de factores com presumível valor etiológico (Quadro V): o álcool estava associado em 18 casos (35,5%) e o vírus da hepatite B em 15 casos (23,6%); em 6 destes existia associação simultânea de álcool e vírus B. Quatro casos (7,2%) eram hemocromatoses; a hemossiderina depositava-se nos hepatócitos e células ductais das zonas sem tumor, mas nunca no tecido tumoral. Num dos casos associado com cirrose o citoplasma dos hepatócitos na periferia dos nódulos de cirrose continha glóbulos hialinos PAS positivos, que foram caracterizados como alfa-1-antitripsina. Noutro caso observaram-se depósitos de dióxido de tório no tecido conjuntivo na vizinhança do tumor. Noutro caso ainda tratava-se de uma doente com terapêutica pela oximetolona devido a uma anemia aplástica; esta doente era simultaneamente portadora do AgHBs. Nos restantes 22

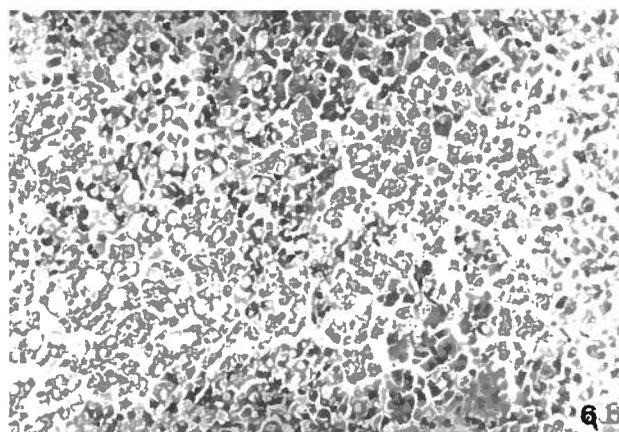
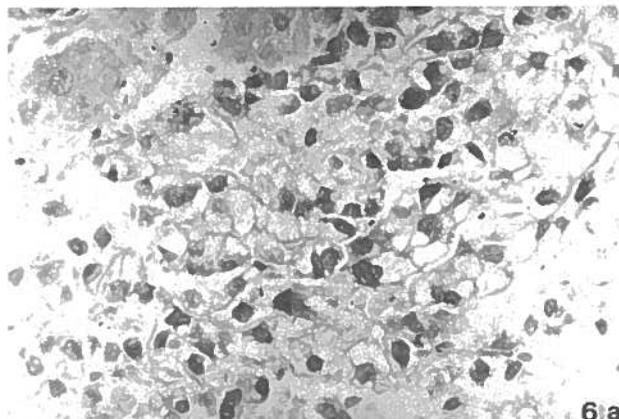


Fig. 6 (a) — CHC com células de citoplasma vazio, núcleo central ou excêntrico e parede celular bem desenhada, conferindo às células aspecto «vegetal». Este aspecto é mais sugestivo da presença de glicogênio (H.E., ampl. original 400×). (b) — CHC em que as células têm uma inclusão vacuolar redonda e vazia, empurrando o núcleo e escassa orla de citoplasma para a periferia. Este aspecto é mais sugestivo da presença de lípidos (H.E., ampl. original 250×)

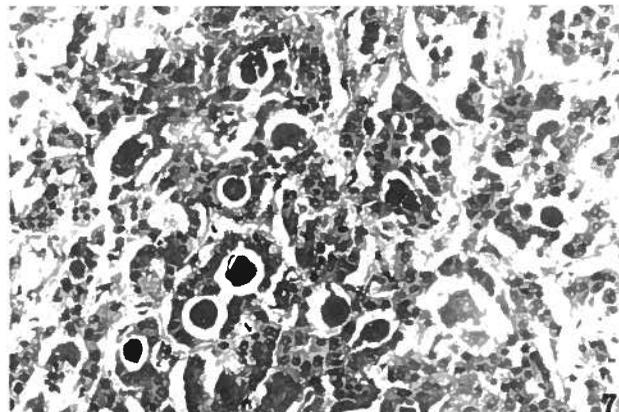


Fig. 7 — Pigmento biliar em cilindros no lume de ácinos constituídos por células tumorais. Este aspecto é diagnóstico de CHC (H.E., ampl. original 250×)

casos não se conseguiu encontrar qualquer factor etiológico relacionável mas, dezasseis estavam associados a cirrose hepática.

QUADRO V

Etiologia*

	N.º de casos	%
Álcool	18	(32,7)
Vírus B§	13	(23,6)
Hemocromatose	4	(7,2)
Def. alfa-1-antitripsina	1	(1,8)
Esteróides androgénicos	1	(1,8)
Torotraste	1	(1,8)
Desconhecida £	22	(40,0)

* 55 casos

§ Vírus B e álcool em 6 casos; vírus B e ester. androgénicos em 1 caso
£ Cirrose em 16 casos

QUADRO VI

Associação com cirrose*

	Homens (%)	Mulheres (%)	Total (%)
Com cirrose	60 (93,3)	7 (58,3)	67 (88,1)
Sem cirrose	4 (6,2)	5 (41,6)	9 (11,8)

* 76 casos

QUADRO VII

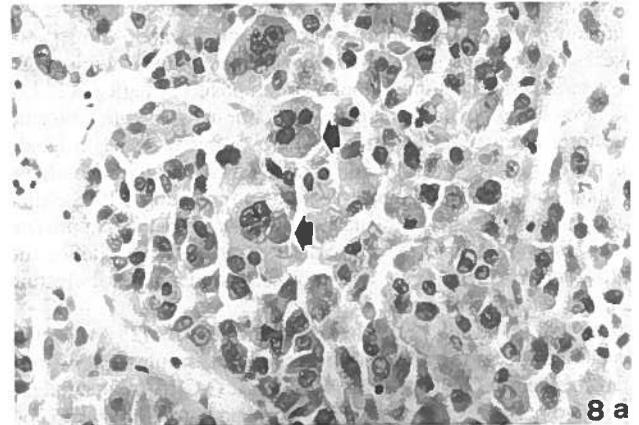
Imuno-histoquímica

	Positivos/ /testados	%
Antigénio de superfície da hepatite B (AgHBs)	9/37	(24,3)
Antigénio «core» da hepatite B (AgHBc)	3/33	(9,0)
Alfa-1-antitripsina (AAT)	15/29	(51,7)
Alfa-fetoproteína (AFP)	6/33	(18,0)
Antigénio carcino-embriónico (CEA)	4/16	(25,0)

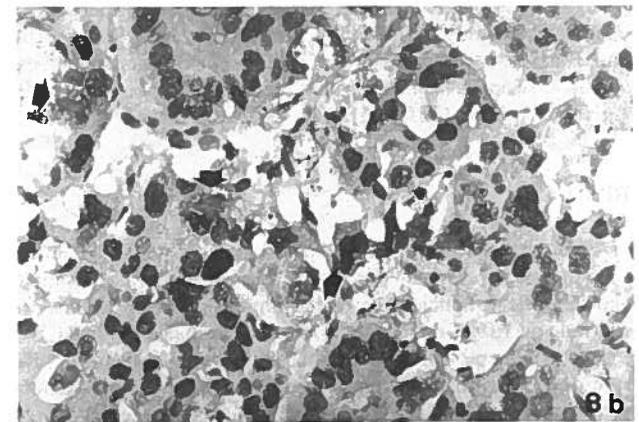
A relação do CHC com a cirrose hepática pôde ser estudada em 76 casos, encontrando-se associação em 67 doentes (88,1%). Destes, 60 doentes eram homens e 7 eram mulheres. Dos 9 casos não associados a cirrose hepática (11,8%), 4 eram homens e 5 eram mulheres (Quadro VI).

Em imuno-histoquímica (Quadro VII) a pesquisa do AgHBs foi positiva em 9 dos 37 casos testados (24,3%) e a do AgHBc em 3 dos 33 casos testados (9,0%). A imunoreactividade das células para os antigénios de superfície e «core» verificou-se sempre no tecido hepático não tumoral (Fig. 9) e nunca no tumor, e correspondeu em geral, mas não só, às células com citoplasma em vidro fosco. A marcação do AgHBs verificou-se no citoplasma, de modo focal ou difuso, e na membrana celular. A marcação do AgHBc verificou-se quer no núcleo dos hepatocitos, quer no núcleo e no citoplasma (Fig. 10).

A pesquisa do AgHBs com as colorações pela orceína e azul de Vitória foi positiva e concordante com a imunoperoxidase em 8 casos; apenas 1 caso positivo por imuno-histoquímica foi negativo com aqueles métodos.

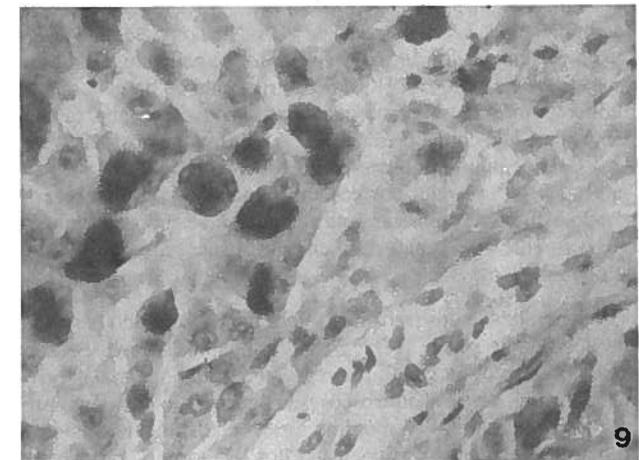


8 a



8 b

Fig. 8 (a) — Várias células tumorais apresentam inclusões hialinas de tipo globular (setas). (H.E., ampl. original 400×). (b) — Hialino de tipo Mallory nas células tumorais (setas). (H.E., ampl. original 400×).



9

Fig. 9 — AgHBs. A imunoreactividade verifica-se no tecido hepático mas não no tumor. Vários hepatocitos têm uma inclusão ocupando total ou parcialmente o citoplasma. (Imunoperoxidase, ampl. original 250×)

A AFP foi positiva em 6 de 33 casos estudados (18%); a imunoreactividade verificou-se no tecido tumoral, corando difusamente o citoplasma de um número variável de células (Fig. 11). Não se verificou marcação do tecido hepático não tumoral.

Relativamente à AAT, em 29 casos estudados, 15 eram positi-

vos no tecido tumoral (51,7%). A positividade verificou-se em número variável de células no citoplasma de modo difuso, por vezes com aspecto granuloso (Fig. 12). Nem todos os tumores ricos em material hialino globular foram positivos para AAT. Em 2 casos havia positividade para AAT simultaneamente no tecido tumoral e no tecido hepático. Noutros 3 casos apenas o tecido hepático mostrou positividade para AAT não se identificando no entanto os glóbulos hialinos positivos no método de PAS e típicos das situações de deficiência de alfa-1-antitripsina. Na presente série havia apenas um caso de cirrose com défice de alfa-1-antitripsina em que a imuno-histoquímica não foi efectuada por não dispormos de material.

O CEA foi positivo em 4 dos 16 casos estudados (25%). A marcação verificou-se em 2 casos na membrana celular e nos 2 restantes no citoplasma das células tumorais. O CEA foi igualmente positivo por vezes no tecido não tumoral no bordo luminal do epitélio dos ductos biliares.

Alguns casos tinham expressão simultânea de 2 antigénios: AFP e AAT em 5 casos, AAT e CEA em 3 casos, AgBHs e AgHBc em 3 casos. A expressão de 3 antigénios simultaneamente verificou-se apenas em 3 casos nas seguintes combinações: AFP, AgHBs e AgHBc, CEA, AgHBs e AgHBc e AFP, AAT e CEA.

DISCUSSÃO

A frequência do carcinoma hepatocelular em séries de autópsia tem sido apresentada por vários autores, embora seja sabido que não reflecte a incidência destes tumores. O valor por nós encontrado de 1,05% é intermédio entre os dos países onde o CHC é pouco frequente como os EUA, 0,20%²⁴ e a Escócia, 0,48%¹¹, e os valores referidos em países como o Japão que oscilam entre 3,6% e 6,08%¹² e Moçambique com percentagens de 21,2% para os homens e 9,5% para as mulheres^{4,14}.

A idade média de aparecimento do CHC é nos países desenvolvidos da Europa e nos EUA respectivamente 60 anos¹¹ e 58,6 anos²⁴. Na Formosa a idade média é de 52 anos². No Japão o pico de incidência de CHC é na 6.ª década¹² e em Moçambique é na 3.ª e 4.ª década^{4,14}. Na nossa série a idade média encontrada foi de 56,4 anos, valor semelhante aos da Europa, EUA e Japão. O CHC é mais frequente no homem que na mulher. A diferença é menos acentuada nos países de baixa incidência de CHC como a Escócia, 3,3:1¹¹, do que nos países onde o CHC é mais frequente como Moçambique, 5,4:1^{4,14} e o Japão, 6,7:1¹². O valor por nós encontrado de 5,1:1 parece exagerado e difícil de valorizar uma vez que, um estudo baseado exclusivamente em material de autópsia não tem valor epidemiológico.

A generalidade dos trabalhos refere um aumento do peso médio dos fígados com CHC^{10,12,14}. A rotina dos exames necróscopicos do Serviço não inclui, por regra, o registo do peso de órgãos mas somente, das suas dimensões pelo que não são possíveis apreciações comparativas com outras séries relativamente a este parâmetro. No entanto, as dimensões dos fígados e os raros pesos registados eram, em geral, superiores aos valores aceites como normais.

A classificação macroscópica em tipos uninodular ou maciço, multinodular e difuso é baseada em critérios inicialmente propostos por Eggel²⁴. Embora mais recentemente tenham aparecido novas propostas de classificação macroscópica³³, baseadas na presença ou ausência de encapsulação, nas características de crescimento do tumor e no componente de tecido fibroso, considerou-se que num estudo retrospectivo baseado apenas na descrição dos relatórios de autópsia e sem adequada documentação fotográfica de todos os casos, não se podia utilizar com rigor

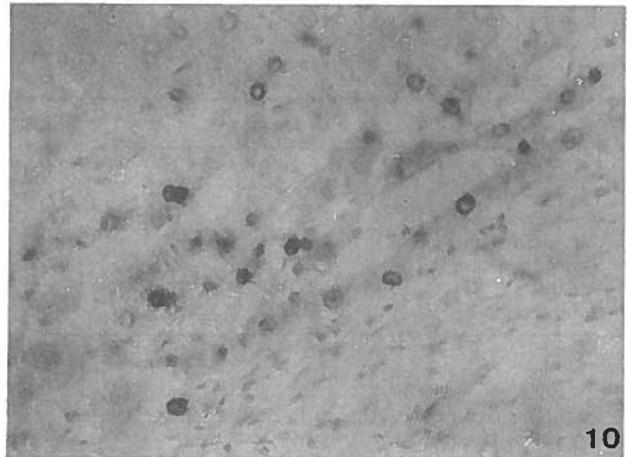


Fig. 10 — AgHBc. A imunoreactividade verifica-se ao nível dos núcleos e do citoplasma de alguns hepatócitos. (Imunoperoxidase, ampl. original 125x)

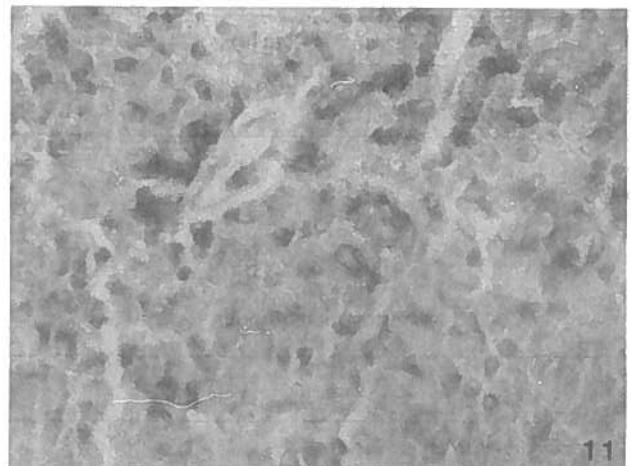


Fig. 11 — AFP. Positividade no citoplasma de várias células tumorais dispersas. (Imunoperoxidase, ampl. original 250x)

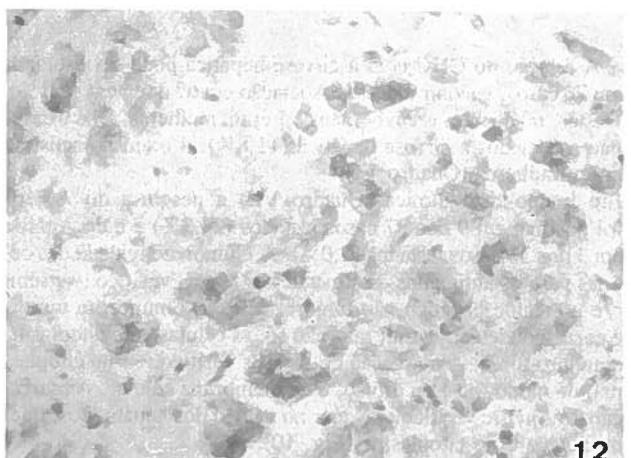


Fig. 12 — AAT. Observam-se grupos de células tumorais com positividade no citoplasma. Algumas pequenas células dispersas aparecem positivas e correspondem a neutrófilos cuja peroxidase endógena não foi suficientemente bloqueada. (Imunoperoxidase, ampl. original 250x)

aqueles critérios classificativos. Um dos casos incluídos no tipo uninodular preenchia os critérios do CHC mínimo dos autores japoneses^{12, 33}.

Na classificação histológica os tipos trabecular e pseudoglandular são os mais frequentes e constituem o *grosso* dos tumores bem diferenciados, o que também está de acordo com outras séries. O carcinoma de células claras que é bastante raro obriga a excluir a localização primitiva em outro órgão; parece estar relacionado com melhor prognóstico³⁴. Não tivemos qualquer caso do tipo sólido (compacto), nem da variedade fibro-lamelar recentemente descrita; a esta é igualmente atribuído um prognóstico mais favorável e ocorre em indivíduos mais jovens³⁵.

Não foram considerados neste estudo os tipos histológicos mistos; optámos por classificar pelo padrão predominante, vistos que o CHC de tipo misto não é referido nem na classificação da OMS nem nas recomendações do Centro Fogarty, embora as associações sejam frequentes, particularmente as dos tipos trabecular e pseudoglandular.

É interessante constatar que os graus de diferenciação não têm o mesmo significado para todos os autores. Para Edmonson e Steiner²⁴ e para Okuda¹² o CHC tem 4 graus de diferenciação histológica, correspondendo os graus II, III e IV aos tumores bem, moderadamente e pouco diferenciados. O grau I aplica-se apenas a determinadas áreas dos tumores de grau II em que a semelhança com o fígado normal é tal que só a presença de outras áreas com células mais atípicas permite fazer o diagnóstico. Para Lapis e Joahnnessen¹⁰ os tipos trabecular e pseudoglandular são bem diferenciados, enquanto que os tipos sólido e células claras são moderadamente diferenciados. Seguimos o critério da OMS²⁵ que considera 3 graus de diferenciação, embora isso não tenha grande significado prognóstico, ao contrário do que sucede noutros tipos de tumores. No CHC, os critérios a que se atribui melhor prognóstico são o tamanho pequeno e encapsulação completa, sugerindo crescimento expansivo^{12, 32} e os tipos histológicos de células claras³⁴ e fibro-lamelar³⁵, já referidos. Os graus de diferenciação de acordo com os critérios de Edmonson ou da OMS podem contudo ter interesse na planificação do tratamento⁵.

A análise dos prováveis factores etiológicos tem o maior interesse: na nossa série, baseados na história de consumo de álcool e em imagens histológicas do fígado não tumoral, em especial a existência de padrões morfológicos relacionáveis com doença hepática alcoólica³⁶, pudémos associar ao álcool em 35,5% dos casos. Os casos considerados de etiologia desconhecida estão na sua maior parte associados a cirrose hepática; considerando que em Portugal cerca de 70% das cirroses são associadas com o alcoolismo crónico³⁷ é provável que o peso deste factor seja maior do que está expresso nos nossos resultados. A hemocromatose e a deficiência de alfa-1-antitripsina poderão ter igualmente como factor condicionante do aparecimento do CHC uma CH de longa duração, pois não parece ter sido ainda estabelecida qualquer relação de causa e efeito entre aquelas situações e o CHC^{11, 19}. Os tumores hepáticos provocados pelo dióxido de tório são em geral de outro tipo histológico³⁸; o nosso caso não está associado com cirrose hepática e curiosamente é o único carcinoma de células claras desta série. Os esteróides androgénios anabolizantes têm sido também apontados com factores etiológicos do CHC³⁹. O único caso da nossa série, também em fígado não cirrótico, estava associado a infecção crónica pelo VHB. Outras associações de potenciais factores etiológicos foram o álcool e o VHB em 6 casos. Dos 10 casos cuja etiologia foi atribuída ao VHB, 2 não tinham CH e eram mulheres.

A positividade para o AgHBs foi de 24% e para o AgHBc de 9%. Os casos positivos para o AgHBc foram-no simultaneamente para o AgHBs. O padrão de distribuição verificado corresponde ao tipo III de Gudat^{40, 41} ou seja um estado de portador com

baixo grau de infectividade em que o sistema imunológico parece ser eficaz para suprimir ou eliminar as células que expressam o AgHBc e antigénios relacionados (AgHBe e antigénios associados à partícula de Dane), mas tolera a presença do AgHBs no tecido hepático. De notar que, as colorações não específicas pela orceína e azul de Vitória deram resultados praticamente idênticos à técnica de imunoperoxidase, o que é importante visto que são métodos baratos e perfeitamente ao alcance de laboratórios em que as condições não permitem a execução de métodos de imuno-histoquímica. No entanto, como métodos não específicos, coram igualmente as fibras elásticas, a proteína ligada ao cobre e a lipofuscina, o que em todo o caso não cria dificuldades na interpretação dos resultados, já que coram estruturas diferentes e o respectivo padrão de coloração é completamente distinto.

O CEA foi pesquisado num número muito pequeno de casos, para que possamos tirar conclusões do seu estudo; no entanto, não lhe tem sido atribuído grande valor no estudo do CHC. A positividade para o CEA no CHC é em geral descrita na membrana celular tal como no carcinoma do cólon; a positividade no citoplasma parece correlacionar-se com os tumores pouco diferenciados²⁰. Tal se verificou nos nossos 4 casos positivos: em 2 casos em que a imunoreactividade se verificou na membrana celular do tumores eram bem diferenciados; nos restantes 2 casos a imunoreactividade verificou-se no citoplasma e os tumores eram pouco diferenciados. A positividade encontrada no epitélio dos ductos biliares parece dever-se a reacção cruzada dos soros anti-CEA com a glicoproteína biliar I²⁰.

A identificação da AFP no CHC pode ter interesse no diagnóstico diferencial, nomeadamente se correlacionada com a pesquisa de citoqueratinas. A AFP revelou-se no estudo de Goodman e col.²⁰ um bom marcador de diferenciação hepatocelular nos carcinomas primitivos do fígado, pois não corou nenhum dos colangiocarcinomas dessa série. Ao contrário, a citoqueratina revelou-se nesse mesmo estudo um bom marcador de diferenciação do epitélio dos ductos biliares, corando os colangiocarcinomas mas não os carcinomas hepatocelulares.

A identificação da AAT não tem o mesmo valor. No mesmo estudo de Goodman e col. também se verificou positividade para AAT nos colangiocarcinomas. Além disso, uma grande variedade de tumores com glóbulos hialinos PAS + são imunoreactivos para AAT⁴². A AAT tem sido demonstrada em hepatócitos normais quer no homem quer no rato, pois o fígado é o seu local de síntese¹⁹. No estudo do CHC a identificação da AAT tem interesse no diagnóstico da situação de deficiência de alfa-1-antitripsina, desde que presentes os glóbulos hialinos PAS + e periportais típicos.

A ausência de imunoreactividade do tecido tumoral para o AgHBs, ao contrário do que tem sido verificado noutras séries²³ bem como a positividade inferior à referida por outros autores para AFP e AAT^{22, 23}, tem possivelmente várias causas de natureza técnica: as autópsias são realizadas por imperativos legais mais de 24 horas após a morte; o formol usado como fixador não é tamponado e os tempos de fixação são muito prolongados, o que tem obviamente efeito na extração de constituintes celulares e no excessivo «cross-linking» das proteínas impedindo a exposição dos antigénios; a imuno-histoquímica foi efectuada em apenas 1 corte por caso. A negatividade para o AgHBs nos casos da presente série e noutros trabalhos publicados, pode ainda dever-se ao facto de que o DNA viral integrado no genoma da célula tumoral não possa exprimir a informação necessária à síntese do componente de superfície do vírus, ao contrário do que sucede com os hepatócitos infectados sem transformação neoplásica.

BIBLIOGRAFIA

- 1 ROBBINS S.L., COTRAN R.S., KUMAR V. — Pathologic Basis of Disease. 3.^a ed., pg. 935, WB Saunders Company, 1984
- 2 LIN DY, LIAW Y-F, CHU C.M., CHANG-CHIEN C.S., WU C.S. CHEN P.C., SHEEN I.S. — Hepatocellular carcinoma in noncirrhotic patients — A laparoscopic study of 92 cases in Taiwan. *Cancer* 1984; 54: 1466-1468.
- 3 NAGASUE N., YUKAYA H., HAMADA T., HIROSE S., KANASHIMA R., INOKUCHI K. — The natural history of hepatocellular carcinoma — A study of 100 untreated cases. *Cancer* 1984; 54: 1461-1465.
- 4 PRATES M.D. E TORRES F.O. — A cancer survey in Lourenço Marques, Portuguese East Africa. *J. Nat. Cancer Inst.* 1965; 35: 729-757.
- 5 THE LIVER STUDY GROUP OF JAPAN. — Primary liver cancer in Japan. *Cancer* 1984; 54: 1747-1755.
- 6 ANTHONY P.P. — Hepatic neoplasma. *Em Pathology of the Liver*, ed RNM MacSween, P.P. Anthony, P.J. Scheuer. Churchill Livingstone 1979.
- 7 HARDELL L., BENGTSOON N.O., JONSSON V., ERIKSSON S., LARSSON L.G. — Aetiological aspects of primary liver cancer with special regard to alcohol, organic solvents and acute intermittent porphyria — an epidemiological investigation. *Br. J. Cancer* 1984; 50: 389-397.
- 8 VAN RENSBURG S.J., COOK-MOZAFFARI P., VAN SCHALKWYK D.J., VAN DER WATT J.J., VINCENT T.J., PURCHASE I.F. — Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. *Br. J. Cancer* 1985; 51: 713-726.
- 9 GERBER M.A., THUNG S.N., POPPER H. — Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Em Viral hepatitis: Laboratory and Clinical Science*. Ed Friedrich Deinhardt, Jean Deinhardt, Marcel Dekker, Inc. New York — Basel, 1983.
- 10 LAPIS K., JOHANNESSEN J.V. — Pathology of Primary Liver Cancer. *J. Toxicol Environ Health* 1979; 5: 513.
- 11 MACSWEEN R.N.M. — A clinicopathological review of 100 cases of primary malignant tumors of the liver. *J. Clin Pathol* 1974; 27: 669-682.
- 12 NAKASHIMA T., OKUDA K., MASAMICHI K., JIMI A., YAMAGUCHI R., SAKAMOTO K., IKARI T. — Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan — 232 consecutive cases autopsied in ten years. *Cancer* 1983; 51: 863-877.
- 13 PATTON R.B., HORN R.C. — Primary Liver Carcinoma — autopsy study of 60 cases. *Cancer* 1964; 17: 757-768.
- 14 PRATES M.D. — Cancer and cirrhosis of the liver in the Portuguese East African with special reference to the specific age and sex rates in Lourenço Marques. *Acta Unio Int. Contra Cancrum* 1961; 17: 718-139.
- 15 BORDALO O., BAPTISTA A., GERALDES J., NETO F., MASCARENHAS F., LEITÃO N., NORONHA M., LAMY J., SILVA P.E. — Clinical correlations in alcoholic patients without manifest cirrhosis. *Am. J. Gastroent* 1974; 61: 371-378.
- 16 RAMALHO F., VELOSA J., BAPTISTA A., CARNEIRO DE MOURA M. — Portadores crônicos e assintomáticos do antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs). Um estudo clínico, serológico e anátomo-patológico. *J. Médico CXV*. 1984; (2079): 251-258.
- 17 LONDON W.T. — Primary hepatocellular carcinoma — etiology, pathogenesis, and prevention. *Hum Pathol* 1981; 12: 1085-1097.
- 18 YAMADA G., NAKANE P.K. — Hepatitis B core and surface antigens in liver tissue. Light and electron microscopic localization by the peroxidase-labeled antibody method. *Lab. Invest* 1977; 36: 649-659.
- 19 FELDMAN G. — L'a-l-antitrypsine; nouvelles perspectives. *Gastroenterol Clin Biol* 1984; 8: 667-675.
- 20 GOODMAN Z.D., ISHAK K.G., LANGLOSS J.M., SESTERHENN I.A., RAHIN L. — Combined hepatocellular — Cholangiocarcinoma — A histologic and immunohistochemical study. *Cancer* 1985; 55: 124-135.
- 21 HUANG S.N. — Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab. Invest* 1975; 33: 88-95.
- 22 KOJIRO M., KAWANO Y., ISOMURA T., NAKASHIMA T. — Distribution of albumin-and/or/fetoprotein — positive cells in hepatocellular carcinoma. *Lab. Invest* 1981; 44: 221-226.
- 23 THUNG S.N., GERBER M.A., SARNO E., POPPER H. — Distribution of five antigens in hepatocellular carcinoma. *Lab. Invest* 1979; 41: 101-105.
- 24 EDMONDSON H.A., STEINER P.E. — Primary carcinoma of the liver — A study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954; 7: 462-503
- 25 GIBSON J.B., SOBIN L.H. — Types histologiques des tumeurs du foie, des voies biliaires et du pancréas. *Classification histologique internationale des tumeurs*, vol. 20, Gêneve: OMS 1978; 13.
- 26 FOGARTY INTERNATIONAL CENTER — Diseases of the Liver and Biliary Tract: Standardization of Nomenclature, Diagnostic Criteria, and Diagnostic Morphology. DHEW Publication N.º 77-725, 1977; 79-80.
- 27 SHIKATA T., UZAWA T., YOSHIWARA N., AKATSUKA T., YAMAZAKI S. — Staining methods of Australia antigen in paraffin sections — Detection of cytoplasmic inclusion bodies. *Japan J. Exp. Med.* 1974; 44: 25-36.
- 28 DEODHAR K.P., TAPP E., SCHEUER P.J. — Orcein staining of hepatitis B antigen in paraffin sections of liver biopsies. *J. Clin Pathol* 1975; 28: 66-70.
- 29 TANAKA K., MORI W., SUWA K. — Victoria blue — nuclear fast red stain for HBs antigen detection in paraffin sections. *Acta Pathol Jap* 1981; 31: 93.
- 30 STERNBERGER L.A., HARDY P.H., CUCULIS J.J., MEYER H.G. — The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem Cytochem* 1970; 18: 315-333.
- 31 GRAHAM R.C., KARNOVSKY M.J. — The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem Cytochem* 1966; 14: 291-302.
- 32 HSU H.C., SHEU J.C., LIN Y.H. et al. — Prognostic histologic features of resected small hepatocellular carcinoma (HCC) in Taiwan. *Cancer* 1985; 56: 672-680.
- 33 OKUDA K., PETERS R.L., SIMSON I.W. — Gross anatomic features of hepatocellular carcinoma from three disparate geographic areas — proposal of a new classification. *Cancer* 1984; 54: 2165-2173.
- 34 LAI C.L., WU P.C., LAM K.C., TODD D. — Histologic prognostic indicators in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1979; 44: 1677-1683.
- 35 CRAIG J.R., PETERS R.L., EDMONDSON H.A., OMATA M. — Fibrolamellar carcinoma of the liver: a tumor of adolescent and young adults with distinctive clinicopathologic features. *Cancer* 1980; 46: 372-379.
- 36 BAPTISTA A., BIANCHI L., DE GROOTE J. et al. — Alcoholic liver disease: Morphological manifestations. Review by an International Group. *Lancet* 1981; i: 707-711.
- 37 PINTO CORREIA J., AREIAS M.E., MONTEIRO E., GARNEL M., MADEIRA F. — História «natural» da cirrose hepática. Estudo de 24 casos não seleccionados. *O Médico* 1969; 51: 355.
- 38 HORTA J.S. — Late lesions in man caused by colloidal thorium dioxide (thorotrast). *Arch Pathol* 1956; 62: 403-418.
- 39 JOHNSON F.L., FEAGLER F.R., LERNER K.G. et al. — Association of androgenic-anabolic steroid therapy with development of hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1972; ii: 1273-1276.
- 40 GUDAT F., BIANCHI L., SONNABEND W., THIEL G., AENISHAENSLIN W., SALTER G.A. — Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B. *Lab. Invest* 1975; 32: 1-9.
- 41 BIANCHI L., ZIMMERLI-NING M., GUDAT F. — Viral hepatitis. *Em Pathology of the Liver*, ed RNM MacSween, P.P. Anthony, P.J. Scheuer Churchill Livingstone, 1979.
- 42 DICTOR M. — Ovarian malignant mixed mesodermal tumor: The occurrence of hyaline droplets containing a-l-antitrypsin. *Hum Pathol* 1982; 13: 930-933.

Pedido de Separatas:

A. Costa e Silva

Serviço de Anatomia Patológica

Hospital de Santa Maria

1699 Lisboa Codex