

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Celular y Patología



**ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS LESIONES HEPÁTICAS
PRODUCIDAS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y SU RELACIÓN
CON EL HEPATOCARCINOMA**

TESIS DOCTORAL

Martín VARELA VINDAS

Salamanca, 2008

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Celular y Patología

**ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS LESIONES HEPÁTICAS
PRODUCIDAS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y SU RELACIÓN
CON EL HEPATOCARCINOMA**

TESIS DOCTORAL

Martín VARELA VINDAS

Salamanca, 2008

DEDICATORIA

A DIOS.

A MIS PADRES.

A MI HERMANA.

A MIS HIJOS.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a mi Maestro, el Profesor Dr. D. José Ignacio Paz Bouza, profesor titular de Anatomía Patológica del Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca, por la orientación humanística, científica y académica durante cuatro años de trabajo y estudio bajo su dirección.

Al Profesor Dr. D. Luís Félix Valero Juan, por su apoyo decidido al trabajo desde el punto de vista epidemiológico y estadístico.

A las señoras Secretarías de Archivo y las Técnicas del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, en especial a Angustias Pérez Sánchez.

Muchas gracias.

Índice

– PRÓLOGO.....	1
– INTRODUCCIÓN.....	3
1.- Hepatocarcinoma.....	3
1.1.- Definición y clasificación.....	3
1.2.- Incidencia y morbi-mortalidad	5
1.3.- Factores de riesgo	7
1.4.- Factores pronósticos	12
1.5.- Tratamiento.....	19
1.6.- Prevención	29
1.7.- Necesidad de nuevas estrategias diagnosticas y terapéuticas	30
2.- Biología molecular y celular del hepatocarcinoma y el virus de la Hepatitis C	34
– ESTUDIO CLÍNICO E INMUNOHISTOPATOLÓGICO.....	57
1.- Planteamiento	57
2.- Hipótesis.....	57
3.- Objetivos	58
– MATERIAL Y MÉTODOS	59
1.- Estudio clínico e inmunohistopatológico	59
1.1.- Material. Características de los pacientes y sus muestras para biopsia hepática.....	59
1.2.- Métodos	59
1.2.a- Determinaciones inmunohistoquímicas de las muestras para biopsia hepática.....	59
1.2.b- Microscopía óptica.....	62
2.- Metodología del análisis estadístico	62
– RESULTADOS	63
1.- Resultados epidemiológicos y estadísticos.....	65
2.- Resultados de las pruebas inmunohistoquímicas de las biopsias hepáticas	70
3.- Resultado del análisis estadístico	78
– DISCUSIÓN.....	79
– CONCLUSIONES.....	85
– BIBLIOGRAFÍA	87

PRÓLOGO

Este trabajo se ha realizado para optar al grado académico de Doctor en Medicina y Cirugía. Consideramos que el avance mostrado por la Biomedicina en el campo de la Biología Molecular y Celular ha sido de tan extraordinaria envergadura que nos permite actualmente concatenar todos los hallazgos científicos, incluso la génesis del desarrollo de la creación de la primera célula sobre la tierra, y las implicaciones que tal explicación puedan derivarse para la evolución de las especies en general, y en particular de los microorganismos que nos afectan en la patología humana.

Es claro que solamente tenemos cien mil años de estar posándonos sobre la Tierra. El homo sapiens es, desde hace cien mil años, un investigador nato, que en aquel tiempo estuvo interactuando con otras especies animales y vegetales, y además, por un tiempo, estuvo compartiendo la Tierra con el hombre de Neandertal. Definitivamente, desde el Big Bang inicia la marcha el Universo y toda la Creación Divina hasta el presente, ha devenido de una manera molecular. El desarrollo de la materia subatómica, la interacción entre diversos átomos, las descargas de energía proveniente de múltiples puntos y la aparición de pequeñas moléculas, y luego de materia orgánica en funcionamiento, es lo que nos despierta el interés de poder decir que realmente los hallazgos ortomoleculares que estamos haciendo a nivel microscópico, son solamente un espejo de lo que ha venido ocurriendo hace miles y miles de años. Por tanto, la idea es que si no tenemos un conocimiento vivo molecular de lo que le está pasando al paciente, probablemente estaríamos retrocediendo en la Historia de la Medicina.

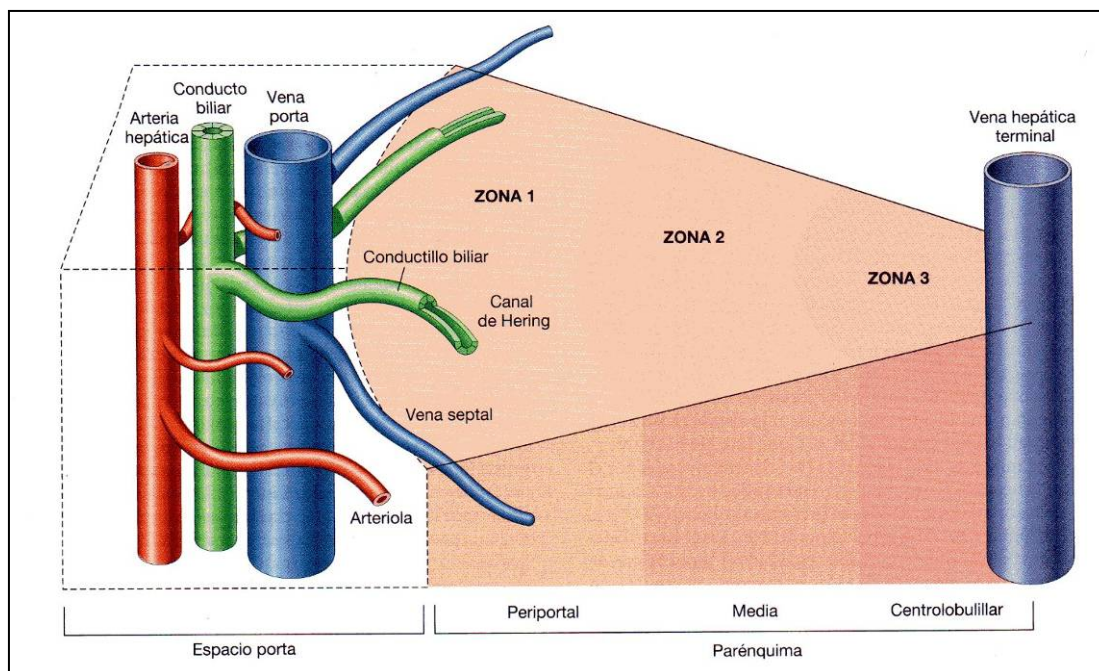
Debemos dar gracias a todos nuestros maestros académicos e investigadores que hacen posible que nos acerquemos a la unidad anatómica y funcional de los seres vivos: la célula. Y a partir de ella, y antes de ella observar las relaciones con el medio, tanto interno como externo, y ver cómo muchos parásitos intervienen en las relaciones patológicas produciendo enfermedad. Rara vez estas relaciones son simbióticas; probablemente lo fueron hace treinta mil años, cuando un retrovirus infectó los mamíferos y dichas células absorbieron el genoma retroviral, marcando una captación genómica que ha podido desarrollar a los mamíferos y que estos triunfaran en la evolución de las especies.

INTRODUCCIÓN

1.- HEPATOCARCINOMA.

1.1.- Definición y clasificación.

El hígado es un órgano de origen endodérmico muy complejo. (Ver Figura 1).



Fuente: SLEISENGER Y FORDTRAN. *Enfermedades gastrointestinales y hepáticas*. 2005.

Figura 1

Anatomía microscópica del hígado. Por el espacio porta transcurren ramas de la vena porta, la arteria hepática y los conductos biliares. De la vena porta nacen las venas septales, que penetran a intervalos regulares en el parénquima hepatocelular. La sangre de las venas septales penetra directamente en los sinusoides parenquimatosos entre los hepatocitos. La arteria hepática termina en capilares que alimentan el sistema de conductos biliares, que atraviesan el mesénquima del espacio porta para penetrar en el parénquima, y allí adquieren la forma de semicírculo alrededor de los hepatocitos (no mostrado) para formar los canales de Hering. La bilis que discurre a través del sistema biliar canalicular entre los hepatocitos penetra en el árbol biliar por estos canales de Hering. La sangre de la vena porta y la arteria hepática viaja a través de los sinusoides del parénquima para abandonar el órgano por la vena terminal hepática. Basándose en el flujo sanguíneo se pueden definir tres zonas, siendo la zona 1 la más cercana al flujo sanguíneo y la 3 la más alejada. Los patólogos denominan las regiones del parénquima como "periportal, media y centrolobulillar". Este último término pertenece al concepto histórico que definía a la vena hepática como el centro de un 'lóbulo'.

El carcinoma hepatocelular es un tumor primario del hígado y es el quinto tumor maligno más frecuente del mundo, y es la tercera causa más frecuente de muerte por cáncer a nivel mundial. El 90% de los cánceres de hígado son hepatocelulares. El carcinoma hepatocelular se comporta de diversa manera, dependiendo de la parte del mundo donde se estudie; por ejemplo, va a tener una variación no solamente respecto a la raza y grupos étnicos sino también en relación a la mayor frecuencia en hombres que en mujeres. Además, en ciertas regiones geográficas vamos a encontrar factores de riesgo más importantes que en otras. El averiguar los mecanismos moleculares por los cuales se produce hepatocarcinogénesis es uno de los motivos más importantes para el desarrollo de investigaciones en todo el mundo. Existen otro tipo de tumores del hígado, pero solamente corresponden a un 10% del total de tumores malignos del hígado.^{1,2}

Dentro de las neoplasias malignas del hígado que forman parte de ese 10% del total, está: el hepatoblastoma, el colangiocarcinoma, el cistoadenocarcinoma, colangiohepatocarcinoma, angiosarcoma y hemangioendotelioma. Todos estos son mucho menos frecuentes que el hepatocarcinoma. (Ver Figura 2).

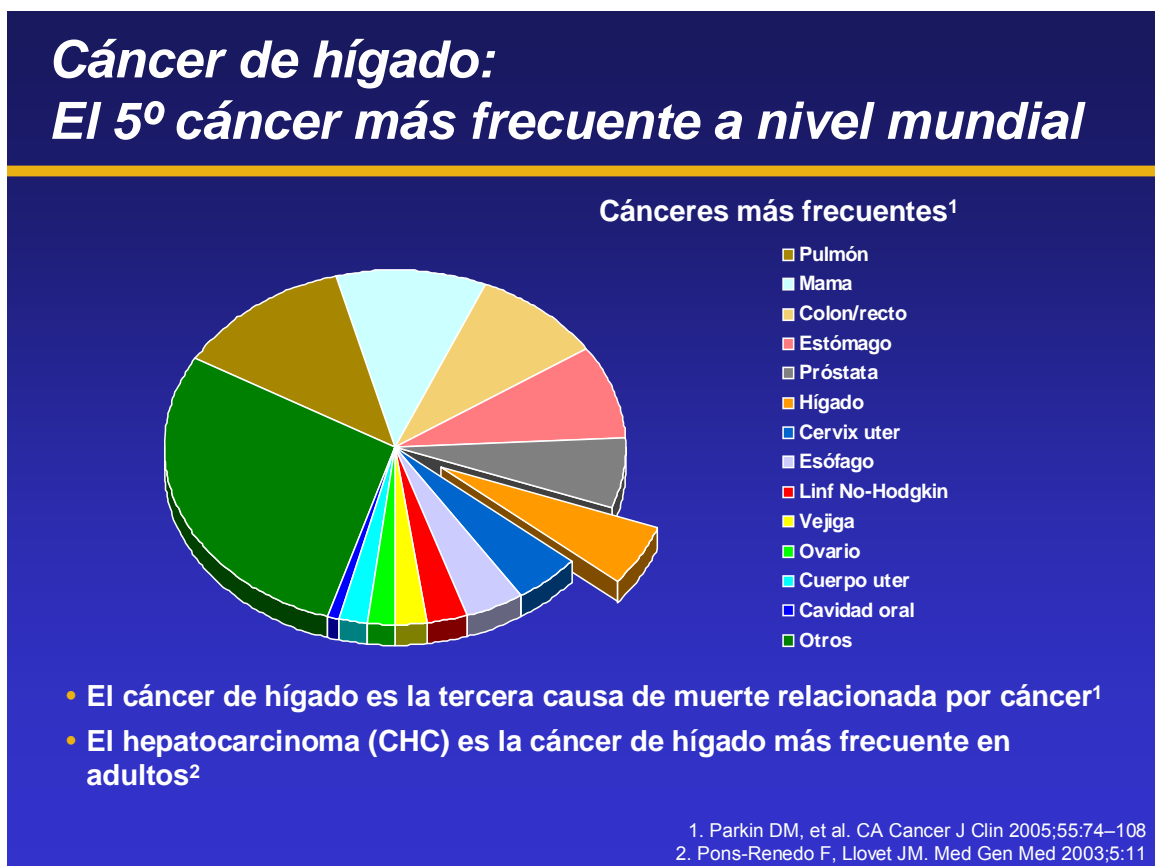


Figura 2

1.2.- Incidencia y morbi-mortalidad.

Hemos dicho que el cáncer de hígado o hepatocarcinoma, como nos referiremos de ahora en adelante, ocurre en diversas regiones geográficas, por ejemplo en África subsahariana y también en el oeste de Asia y en China, y suman más de la mitad de todos los casos del mundo. Actualmente tenemos 626.000 nuevos casos por año. Es la tercera causa de muerte global por cáncer, detrás solamente del cáncer de pulmón y el cáncer de estómago. Es más frecuente en los hombres, teniendo una tasa de incidencia de 35'2 por 100.000 habitantes, y en las mujeres de 13'3 por 100.000 habitantes. En España 7'5 en hombres y 2'4 en mujeres por 100.000 habitantes.

Hay lugares de mayores tasas, por ejemplo Senegal, donde las tasas por sexo son muchísimo más frecuentes en hombres que en mujeres.² En Gambia, por ejemplo, hay 39'6 por 100.000 habitantes hombres, comparado con 14'6 mujeres por 100.000. En Corea del Sur 48'8 hombres por 100.000 habitantes con hepatocarcinoma, y solamente 11'6 mujeres. (Ver Figura 3).

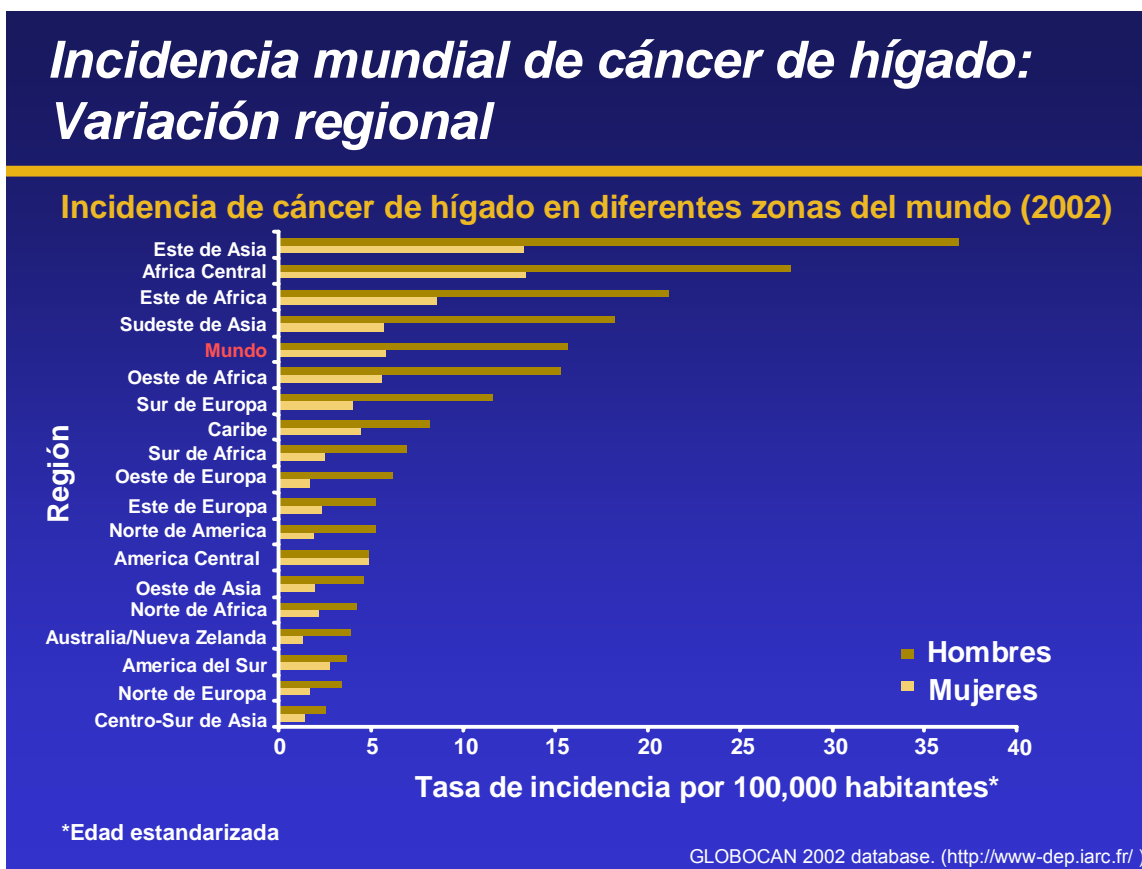


Figura 3

En Norteamérica, Suramérica, norte de Europa y Oceanía las tasas son bajas, menos de 5 por 100.000. La baja incidencia se observa sobre todo en Canadá, donde hay un 1'2 por 100.000; en Colombia, donde hay 2'2 por 100.000; en el Reino Unido, en Australia y suroeste de Europa.

Tenemos también que tener en cuenta que pueden haber cambios cuando se analizan diversas épocas o periodos de tiempo, porque cuando se elimina algún factor de riesgo, entonces la incidencia y la morbimortalidad de esta enfermedad también va a cambiar. Por ejemplo, las tasas en Japón relacionadas con el virus de la hepatitis C empiezan a ser más altas. Mientras tanto, las tasas de carcinoma hepatocelular con respecto a la infección del virus de la hepatitis B en Japón han disminuido ostensiblemente.^{2,6,10}

Así que hay que tener en cuenta incrementos o disminución de incidencia respecto a muchos factores. Por eso los registros en todos los países deben ser muy bien controlados, y cuando existen cambios deben ser analizados con hipótesis. Por ejemplo, en Japón, donde se ha estudiado epidemiológicamente la prevalencia del virus de la hepatitis C y su relación con el aumento de la frecuencia de hepatocarcinoma.^{2,3,4,5}

La incidencia y prevalencia del hepatocarcinoma se tienden a igualar debido al diagnóstico tardío y su alta mortalidad. (*Ver Figura 4*).

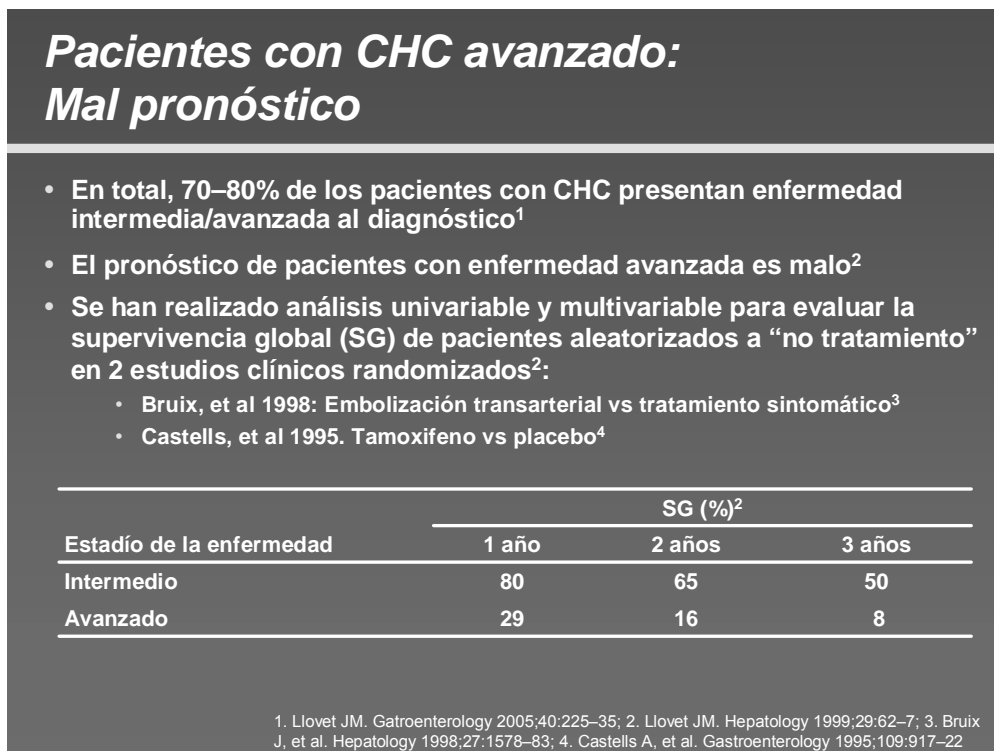


Figura 4

1.3.- Factores de riesgo.

Los factores de riesgo más importantes los vamos a enumerar y luego los veremos más adelante. En primer lugar la raza, el sexo a que se pertenezca y la edad son muy importantes para el análisis de riesgo en hepatocarcinoma. Luego viene la distribución de esos factores de riesgo en diversas áreas geográficas y los factores de riesgo microbiológicos, tóxicos y ambientales. (Ver Figuras 5 y 6).

Principales factores de riesgo de CHC

- El principal factor de riesgo de CHC es la cirrosis
 - >80% de los pacientes con CHC padecen cirrosis¹
- Las causas más frecuentes de cirrosis son:
 - Infección por virus Hepatitis B (HBV)
 - Más común en los países en vía de desarrollo^{2,3}
 - Infección por virus Hepatitis C (HCV)
 - Más común en los países desarrollados⁴
 - Ingesta de alcohol
 - Obesidad
 - Puede desarrollar NAFLD, que con frecuencia progresa a NASH^{5,6}

NAFLD: hígado graso no-alcohólico; NASH: esteatohepatitis no-alcohólica

1. Schafer DF and Sorrell MF. Lancet. 1999;353:1253-1257; 2. Bruix J et al. Cancer Cell. 2004;5:215-219; 3. Llovet JM et al. Lancet. 2003;362:1907-1917; 4. Davila JA et al. Gastroenterology. 2004;127:1372-1380; 5. Qian Y and Fan JG. Hepatobiliary Pancreas Dis Int. 2005;4(2):173-177; 6. Sears D and Patel T. Available at: <http://www.emedicina.com/med/topic775.htm>. Accessed April 24, 2007.

Figura 5

Principales factores de riesgo de CHC a nivel mundial

Factor de riesgo (% pacientes CHC)

Región	Hepatitis C	Hepatitis B	Alcohol	Otros
Europa	60%-70%	60%-70%	20%	10%
Norte América	60%-70%	20%	20%	10%
Asia* y Africa	60%-70%	70%	10%	<10%
Japón	70%	10%-20%	10%	<10%

* Excepto Japón

1.Llovet JM et al. Lancet. 2003;362:1907-1917; 2. Bruix J et al. Cancer Cell. 2004;5:215-219.

Figura 6

Por ejemplo vamos a analizar aquí un factor de riesgo como es el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C (que es el que nos interesa más), el alcohol, las toxinas, como la aflatoxina B, el cloruro de vinilo, la enfermedad grasa no alcohólica del hígado o esteatosis no alcohólica del hígado, la obesidad, la diabetes mellitus, el uso del tabaco, los anticonceptivos orales, la hemocromatosis, el tipo de dieta, el consumo del café y la epidemiología de problemas genéticos relacionados con el desarrollo del hepatocarcinoma. Estas serían las partes más importantes de este estudio.^{7,8,9}

Vamos a analizar entonces, en primer lugar, un dato muy importante dentro de los factores de riesgo, como es tener en cuenta que existe una pirámide de factores de riesgo que va a depender de la zona geográfica donde la persona viva, lo que come esa persona, si se infecta o no de un virus y el desarrollo de una hepatitis crónica que va a evolucionar a una cirrosis, y luego de la cirrosis evolucionará a un cáncer de hígado o hepatocarcinoma.^{10,11,12}

En el caso de la raza, ya hemos visto que es más frecuente en los indios, en los chinos, en la población malaya de Singapur, y que en los americanos de origen africano es dos veces más frecuente que en los blancos. Definitivamente existe una diferencia racial, pero que hay que tener en cuenta que estos grupos raciales también están ubicados en zonas geográficas específicas donde existen otros factores de riesgo que podrían hacernos creer que el hepatocarcinoma podría ser más frecuente en ciertos grupos étnicos. Pero sí está claro que en Norteamérica los negros tienen el doble de posibilidades de desarrollar un carcinoma hepatocelular.^{13,14,15}

En cuanto al sexo, ya sabemos que la mujer está más protegida que el hombre para el desarrollo del cáncer hepatocelular, y es una relación que va desde dos hombres a una mujer hasta cuatro hombres a una mujer en muchas poblaciones. Obviamente existen lugares donde las tasas del hombre son aún mucho más altas que en las mujeres, o sea que hay una mayor proporción de hombres que mujeres. Por ejemplo en regiones de la China.^{2,43}

Las razones para que existan tasas tan altas de cáncer hepatocelular en los hombres están relacionadas con la existencia de otros factores de riesgo en cada uno de los sexos. Por ejemplo, los hombres se infectan más fácilmente con el virus de la hepatitis B y C, consumen más alcohol, fuman más cigarrillos y tienen un incremento en el depósito de hierro. Sin embargo, esto no se ha podido extrapolar a experimentos en ratones. Algunos datos suponen la hipótesis de que los andrógenos podían tener algo que

ver en la progresión y desarrollo del hepatocarcinoma. Hay una asociación positiva entre el incremento de testosterona y la infección por el virus de la hepatitis B en Taiwán.²⁶

En cuanto a la edad, la existencia de los casos de hepatocarcinoma varía mucho según la etiología, y en algunas áreas hay grupos que son más viejos que otros, y dentro de esos grupos hay diferencias entre hombres y mujeres. Por ejemplo también, en Norteamérica y en el Reino Unido las tasas específicas señalan que los pacientes afectados tienen más de 75 años de edad. Esto puede ser similar en Asia, pero hay un contraste con las poblaciones africanas de alto riesgo, donde el promedio está para edades entre 60 y 65 años, y entre 65 y 70 años de edad por ejemplo en Gambia, (están declinando). Esto tiene que ver mucho con el tipo de virus que está infectando determinada región. Por ejemplo el virus de la hepatitis C es un virus que ha infectado fundamentalmente a adultos jóvenes; en cambio el virus de la hepatitis B ha infectado principalmente a gente muy joven, sobre todo cuando no existía la vacuna para el virus de la hepatitis B.^{16,18,26}

Muchos de los factores de riesgo para el hepatocarcinoma son debidos a la infección por el virus de la hepatitis B. En Asia puede ser transmitido a través de la relación materno-fetal, y se transmite más frecuentemente en África, en pacientes jóvenes. El consumo de aflatoxina es uno de los factores de riesgo más importantes en estas áreas. En Japón, el virus de la hepatitis C juega un papel muy importante, sobre todo después de la Segunda Guerra Mundial.¹⁰

Otro dato interesante como factor de riesgo es el incremento de personas que viven con una cirrosis hepática. Está claro que para la parte occidental del mundo, Europa, América, los pacientes que más desarrollan hepatocarcinoma son los pacientes que tienen una cirrosis previa. No ocurre lo mismo en ciertas áreas de África y Asia, donde más de la mitad de los pacientes, entre un 50 y un 60% que tienen hepatocarcinoma no tienen cirrosis hepática.²⁴

En los Estados Unidos se han ajustado las tasas de incidencia entre 1985 y 2002, y se ha visto que hay un incremento, que ha pasado de 1'3 por 100.000 habitantes (entre 1978 y 1980) a 3'3 pacientes con hepatocarcinoma entre 1999 y 2001. Así vemos cómo hay una gran variación étnica, hispanos, africanos, blancos, asiáticos... pueden estar cambiando las migraciones y pueden estar repercutiendo en las tasas de incidencia y distribución de los pacientes con hepatocarcinoma, e incluso encontrarlo en edades más jóvenes.¹⁷

Ahora vamos a analizar otros factores de riesgo en hepatocarcinoma. Ya hemos determinado que el virus de la hepatitis B es la mayor y más frecuente causa de hepatocarcinoma, porque existen 300 millones de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y han desarrollado formas crónicas como hepatitis crónica activa y cirrosis. Tenemos una esperanza porque ya han pasado 25 años del uso de la vacuna contra la hepatitis B, y cada vez alcanzamos un mayor número de poblaciones vacunadas.²⁵

Luego tenemos el virus de la hepatitis C, que es un factor de riesgo mayor para el desarrollo del hepatocarcinoma. En Italia, en Francia y en España existe una proporción de pacientes infectados muy diferentes entre sí por el virus de la hepatitis C. Hay que recordar que el virus de la hepatitis C era el anterior virus llamado no A no B hasta que en 1989 se pudo determinar por pruebas modernas moleculares, una reacción especial para detectar el virus de la hepatitis C.³²⁷ Se pudieron determinar entonces anticuerpos contra el virus de la hepatitis C y se pudo determinar molecularmente este virus, (PCR).

Entonces, la infección por el virus de la hepatitis C aumenta el riesgo de cirrosis y posterior desarrollo del cáncer de hígado. Hay que recordar que el virus de la hepatitis C produce un 80 u 85% de pacientes con hepatitis crónica; un 20% de estos pacientes va a desarrollar cirrosis, y un 1% a su vez van a desarrollar hepatocarcinoma. Las cosas se complican más para los pacientes que además tienen el virus HIV del sida y el virus de la hepatitis B simultáneamente.^{18,35}

También tenemos que tener en cuenta el alcohol. Muchos de nuestros pacientes con el virus de la hepatitis C también están tomando altas dosis de alcohol diariamente, lo cual viene a producir mayor inflamación y estrés oxidativo del tejido hepático, contribuyendo a la mayor formación de vías que puedan producir eventualmente un hepatocarcinoma.³⁰

En cuanto a la aflatoxina⁴² es una micotoxina producida por el aspergillus. Este hongo crece sobre todo en granos que han sido almacenados por mucho tiempo, y que luego son consumidos por el ser humano. Esto tiene que ver porque la aflatoxina se metaboliza y moléculas intermediarias pueden activar, a través del epóxido, el ligamen a moléculas de DNA y causar un daño, incluyendo la producción de mutaciones del gen supresor de tumores (p-53). Esta mutación ha sido observada en 30 a 60% de los hepatocarcinomas, en áreas endémicas de aflatoxina. Obviamente si el paciente es portador de un virus de hepatitis B o C simultáneamente, probablemente esto acelerará la transición de este paciente hacia el hepatocarcinoma, en forma más rápida.⁴³

El cloruro de vinilo⁴⁵ ha sido establecido como un factor de riesgo en trabajadores de fábricas, pero se ha relacionado con el angiosarcoma pero no con otro tipo histológico de tumor.

Se ha sugerido que cierto tipo de cirrosis criptogénica está relacionada con la enfermedad llamada esteatohepatitis no alcohólica, por lo tanto tenemos que controlar en nuestros pacientes con hepatitis crónica a virus B o virus C su presencia histológica.

Otros de los factores que están relacionados son la obesidad y la diabetes mellitus, por lo tanto en estos pacientes⁷⁰, donde se va a desarrollar más fácilmente la esteatohepatitis no alcohólica, la reducción de peso y el control estricto de su diabetes van a beneficiar al paciente.^{47,50}

Hay una asociación entre el fumar y el hepatocarcinoma. Obviamente, muchos de nuestros pacientes son bebedores, fumadores, e intercambian jeringuillas. Por lo tanto estos son factores de riesgo relacionados al consumo de drogas y a la infección por el virus de la hepatitis C.⁴⁹ (*Ver Figura 7*).

Factores de riesgo adicionales de CHC

- **Enfermedades o condiciones especiales¹**
 - Hemocromatosis hereditaria
 - Enfermedad de Wilson
 - Hepatitis autoinmune
 - Cirrosis biliar primaria
- **Factores ambientales¹**
 - Aflatoxina B₁
 - Tabaco
 - Andrógenos
 - Compuestos químicos

La presencia de más de un factor de riesgo aumenta sustancialmente el riesgo de desarrollar CHC²

1. Blum HE. *World J Gastroenterol.* 2005;11(47):7391-400; 2. Marrero JA et al. *J Hepatol.* 2005;42(2):218-224.

Figura 7

Parece ser que los estrógenos y progesterona, pueden inducir el desarrollo de tumores hepáticos en estudios en animales, sobre todo a través de la formación de mutaciones espontáneas, y también en la formación de otros factores de riesgo que no

hemos detallado pero que vamos a decir, como son el adenoma de células hepáticas y la hiperplasia nodular focal. Estos dos son factores de riesgo para la aparición del hepatocarcinoma, pero también del carcinoma hepatoblastoma y el colangiocarcinoma. Sin embargo, la evidencia epidemiológica de esta asociación con anticonceptivos no está bien clara y algunos estudios no la encuentran.^{74,75,76,77}

Otro factor de riesgo importante es la hemocromatosis, probablemente cuando se deposita mucha cantidad de hierro en el hígado esto produce un severo estrés oxidativo.^{78,79,80}

También la dieta tendría que ver con el consumo adecuado de antioxidantes que van a bloquear muchas de las reacciones del estrés oxidativo, fundamentalmente por el consumo de glutatión por parte de los metabolitos oxidantes. Cuando el glutatión está en bajas concentraciones y el paciente no consume una dieta adecuada, la falta de estos antioxidantes empeorará la situación metabólica molecular del hígado.^{84,85,108}

En cuanto al consumo de café⁸⁸, estudios epidemiológicos han reportado una reducción del riesgo en los niveles de enzimas hepáticas y en la reducción de riesgo para desarrollar cirrosis, o sea, que el café⁹⁰ pudiera ser un factor de protección carcinogénico, pero esto no está completamente confirmado por los estudios.^{86,87}

1.4.- Factores pronósticos.

Tenemos ante nosotros, en primer lugar, un ser humano que sufre, que busca ayuda, tratamiento y consuelo, pero para darle nuestra mejor ayuda debemos hacer en primer lugar un buen diagnóstico. Muchos de estos pacientes han estado antes en niveles de atención primaria en medicina general y en medicina interna. Luego son referidos con el gastroenterólogo o gastroenterólogo hepatólogo, dependiendo del país donde se estudie el paciente.

Como dijimos, se nos presenta un paciente que, en un 24% de los casos, no va a tener ningún síntoma, o sea, que su enfermedad ha sido diagnosticada probablemente de manera casual, o bien ha sido diagnosticada porque muchos de ellos puedan ser donadores de sangre o se han hecho alguna prueba de función hepática que haya salido alterada, y el médico de atención primaria o de medicina interna ha considerado prudente, no solamente hacerle pruebas de función hepática, sino también pruebas de gabinete de imágenes médicas. Por ejemplo, el ultrasonido abdominal. La ecografía muestra el tumor hepático.

También se nos puede presentar el paciente con un dolor abdominal, que puede estar focalizado o no a la región del hipocondrio derecho, en un 40% de los pacientes. Asimismo se nos puede presentar como un paciente con una anemia. Estos pacientes deben ser investigados por cualquier causa que produzca anemia, entre ellos el cáncer en general, y en particular el carcinoma hepatocelular.

En cuanto a la exploración física, vamos a encontrar datos en un 24% de los pacientes; un adelgazamiento importante en un 20%, problemas de inapetencia, el paciente refiere que no tiene apetito, en un 11% de los casos; debilidad y malestar general en un 15%; ictericia solo en un 5% de los casos; y datos de cirrosis como edema pretibial e incremento de la circunferencia abdominal, prurito y hemorragia de las vías intestinales en un 18%.

También muchos de nuestros pacientes van a ser controlados de previo con una cirrosis, o sea, puede presentarse un paciente ya conocido con cirrosis a nuestro servicio de gastroenterología, y por tanto los pacientes con el diagnóstico de cirrosis van a seguir una serie de lineamientos generales para el control y estudio, que obviamente se van a controlar por la posibilidad, de que desarrollen un carcinoma hepatocelular. Es decir, estos pacientes van a ser de riesgo, y por lo tanto van a estar controlados sistemáticamente con pruebas químicas de laboratorio, pruebas de imágenes: ultrasonido y tomografía computadorizada, y también van a someterse a biopsia hepática. En este caso, una biopsia hepática con aguja, con control ecográfico. Esta muestra se analizará en el servicio de Anatomía Patológica.

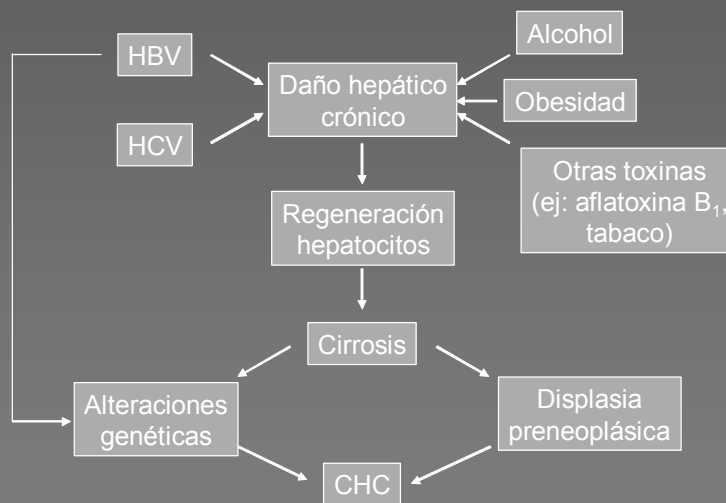
También a aquellos pacientes que por otra causa son intervenidos en una laparotomía, se tomarán muestras de hígado cuando se considere pertinente.

Algunos de nuestros pacientes pudieran tener diarrea, pero es muy infrecuente. También pudieran tener lo que llamamos eritrocitosis, o sea hemoglobina y hematocrito muy altos, como parte de un síndrome paraneoplásico.

El paciente que se nos presenta va a ser un paciente, generalmente un hombre (porque es más frecuente en hombres que en mujeres, más o menos en relación de 3 a 1) con una media de edad de 56 ± 13 años. El 72% va a ser caucásico, pacientes de oriente medio el 10%, asiáticos un 13% y afroestadounidenses un 5%; la incidencia en hispanoamericanos es bastante baja.^{2,103,104}

Con cirrosis se nos van a presentar un 81% de pacientes, y con ausencia de cirrosis un 19%. (*Ver Figura 8*).

Patogénesis del CHC^{1,2,3}



1. Anzola M. *J Viral Hepat.* 2004;11:383-393; 2. Thorgerirsson S and Grisham JW. *Nat Genet.* 2002;31:339-346; 3. Feitelson MA et al. *Surg Clin N Am.* 2004;84:339-354.

Figura 8

Características del tumor.^{302,303} Número de tumores en el hígado: un 20% tienen sólo un tumor; un 25% tienen dos tumores y tres o más tumores en un 65%. Invasión de la vena porta en un 75%, uninodular un 25% y bilobular en un 75%. (Ver Figura 9).

Metástasis CHC

- **Causas de metástasis^{1,2}**
 - Resección incompleta de tumores CHC
 - Presencia de micrometástasis regionales indetectables
 - Entrada de células tumorales en la circulación durante la cirugía
- **Metástasis intrahepáticas**
 - Invasión celular tumoral de la vena porta y de las ramas arteriales hepáticas³
- **Metástasis extrahepáticas**
 - Invasión celular tumoral de la circulación general
 - Lugares más frecuentes⁴:
 - Pulmones
 - Huesos
 - Nódulos linfáticos abdominales

1. Nagasue N et al. *Surg Gynecol Obstet.* 1982;155:697-704; 2. Wong IH et al. *Clin Cancer Res.* 1999;5(12):4021-4027; 3. Hasegawa K et al. *Ann Surg.* 2005;242(2):252-259; 4. Katyal S et al. *Radiology.* 2000;216(3):698-703.

Figura 9

Hay que recordar que muchos de nuestros pacientes con infección por virus de hepatitis B, hepatitis C, mezcla de ambas o también con virus de la inmunodeficiencia humana, incluso antes de que entren a la fase de cirrosis también son controlados muchos de ellos porque el cuadro clínico se ha vuelto importante en el sentido de que el paciente se anemiza y eleva enzimas hepáticas, alaninotransferasas, aminotransferasas, aumentan los niveles de bilirrubina. Muchas veces indicamos una biopsia hepática y podemos encontrar que a pesar de que el paciente no esté en una fase de cirrosis, podría tener cambios en el tejido hepático.^{237,238}

Los cambios más importantes podrían ser las displasias. Dentro de las displasias¹⁴⁸ en la zona hepática podemos encontrar la displasia de células grandes, la displasia hepática de células pequeñas, nódulos de macroregeneración, nódulos displásicos de bajo y de alto grado, y focos displásicos menores de 1 mm de diámetro. Todo esto podría tener repercusión en las medidas que tomemos de ahora en adelante con cualquier paciente. Podemos decir que existen, dentro de la biopsia hepática, parámetros para medir precursores histológicos del carcinoma hepatocelular, que se pueden considerar lesiones premalignas.¹⁸⁷

Por supuesto esto lo estamos detallando en tejidos no neoplásicos, pero obviamente también (y esto son estudios clásicos que ya se han hecho) se han encontrado estas mismas lesiones en tejidos adyacentes al hepatocarcinoma, o sea, tejidos que histológicamente aparecen libres de tumor pero que ya tienen –tal vez por su cercanía– cambios displásicos. Todos estos cambios se pueden encontrar tanto en pacientes con el cáncer de hígado ya establecido, o en pacientes que tienen infecciones por virus o factores de riesgo que pueden condicionar que se desarrolle un hepatocarcinoma en algún momento. (*Ver Figura 10*).

Existen otras lesiones que ya habíamos detallado antes, pero que se consideran lesiones benignas, pero no obstante en algún momento son factores de riesgo histopatológico, como el adenoma²⁷⁸, como la hiperplasia nodular focal²⁸⁰, la hiperplasia nodular regenerativa, el adenoma de los conductos biliares. Esto en relación a otro tipo de cáncer hepático, diferente al hepatocarcinoma, el cistoadenoma biliar, el hemangioma y otros tumores neuromesenquimatosos. También hay que hacer referencia al pseudotumor inflamatorio y a las lesiones granulomatosas que se puedan encontrar, en relación a otro tipo de tumores de este mismo origen mesenquimatoso.

Patogénesis molecular del CHC

- Múltiples mecanismos implicados en la hepatocarcinogénesis¹
 - Cirrosis hepática tras daño tisular
 - Mutaciones en uno o más oncogenes o gen supresor tumoral
- Las alteraciones en la señalización celular pueden afectar a las vías²
 - Raf/MEK/ERK
 - PI3K/AKT/mTOR
 - Wnt/ β -catenin
 - Angiogénesis
- Estas vías son dianas para la terapia molecular

AKT = protein kinase B
PI3K = phosphoinositide 3-kinase
ERK = extracellular signal-regulated kinase
MEK = mitogen-extracellular kinase
mTOR = mammalian target of rapamycin

1. Marotta F, et al. Clin Ther 2004;155:187-99
2. Avila MA, et al. Oncogene 2006;25:3866-84

Figura 10

Dentro de los factores pronósticos está, en primer lugar: la clínica. La clínica siempre será mandatoria. Paciente con problemas de astenia, falta de apetito, pérdida de peso, va a ser siempre un paciente dentro del cuadro del hepatocarcinoma que está evolucionando muy mal y respondiendo peor al tratamiento que hemos impuesto.⁴¹³

Luego, podemos valorar al paciente –tanto al que va evolucionando bien como al que va evolucionando mal– con ciertos parámetros que ya hemos mencionado, y entre ellos los séricos en relación a cambios químicos de transaminasas, bilirrubinemia, fosfatasa alcalina, alfafetoproteína, como un factor pronóstico, y teniendo en cuenta también que la determinación de alfafetoproteína en sí misma es un factor diagnóstico, un factor de riesgo y un factor pronóstico para hepatocarcinoma.⁴¹³

Como dijimos también podrían aparecer síndromes paraneoplásicos en pacientes con una hipoglucemia muy importante, pacientes con eritrocitosis (de un 3 a un 12% de los pacientes), pacientes con hipercolesterolemia. También muchos de estos pacientes, debido a que no solamente tienen la neoplasia, sino que tienen la cirrosis pueden presentar trombosis, leucopenia, pero que dicha leucopenia no solamente se puede deber al problema hepático sino también a la infiltración neoplásica de la médula ósea.

Algo importante, como factor pronóstico, es la estadificación del cáncer de hígado.⁴¹⁰ En algunas ocasiones se utiliza el sistema TNM, que es tamaño del tumor,

ganglios o nódulos regionales y metástasis, establecido por la comisión americana para el control y estudio del cáncer; pero el sistema más moderno es el programa italiano para el cáncer de hígado CLIP, que ha tenido gran difusión porque toma en cuenta la cirrosis como lo hace el sistema Okuda. Se han propuesto otros sistemas de clasificación y aún se necesita un consenso. Se puede decir que la neoplasia con mejor pronóstico es el tumor solitario en etapa 1 que mide menos de 2 cm de diámetro y que no ha invadido los vasos sanguíneos. Algunos signos de mal pronóstico son ascitis, invasión vascular y propagación hacia los ganglios linfáticos, la invasión vascular en particular tiene efectos profundos en el pronóstico y puede ser microscópica o macroscópica, visible incluso en la tomografía computadorizada. (Ver Cuadro 1).

– Sistemas CLIP y Okuda de estadificación del carcinoma hepatocelular –							
Clasificación CLIP							
Variables	Puntos						
	0	1	2				
I. Número de tumores	Uno solo	Múltiple	–				
Sustitución del parénquima por tumor (%) ^a	<50	<50	>50				
II. Escala de Child-Pugh	A	B	C				
III. Nivel de fetoproteína alfa (ng/ml)	<400	≥ 400	–				
IV. Trombosis de vena porta (CT)	No	Sí	–				
Estadios CLIP (índice = suma de puntos): CLIP 0, 0 puntos; CLIP 1, 1 punto; CLIP 2, 2 puntos; CLIP 3, 3 puntos.							
Clasificación de Okuda							
Tamaño del tumor ^a		Ascitis		Albúmina (g/L)		Bilirrubina (mg/100ml)	
≥ 50	< 50	+	-	≤ 3	> 3	≥ 3	< 3
(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Estadios de Okuda: estadio 1, todas (-); estadio 2, 1 o 2 (+); estadio 3, 3 o 4 (+).							
^a Extensión del hígado ocupada por tumor.							
Nota: CLIP, Programa Italiano de Cáncer Hepático (<i>Cancer of the Liver Italian Program</i>).							

Fuente: FAUCI et al, HARRISON. <i>Principios de Medicina Interna</i> . 17ª Edición. 2008.							

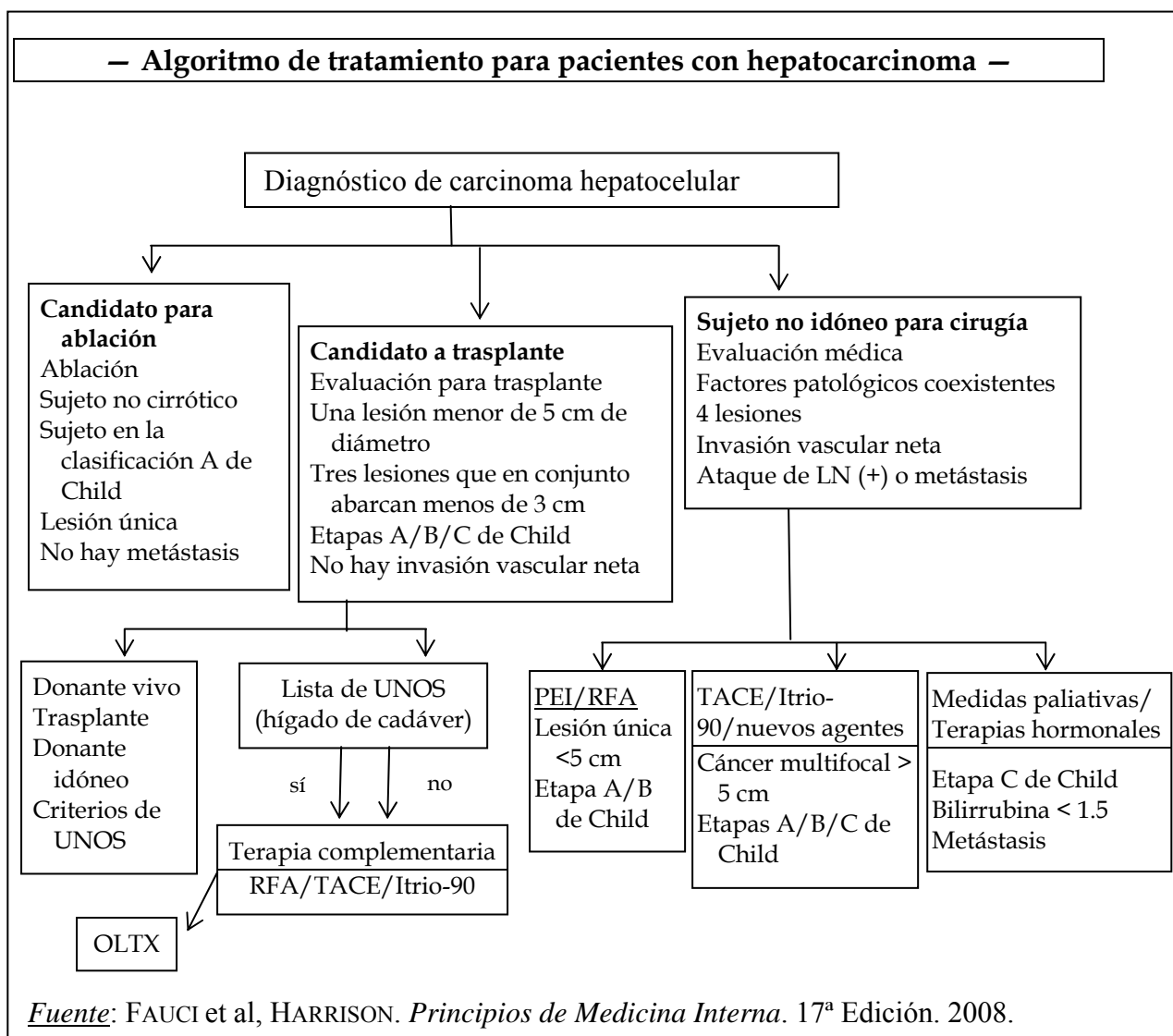
Cuadro 1

Muchos tumores grandes exhiben invasión vascular microscópica, de manera que sólo es posible estatificarlo con precisión después de la extirpación quirúrgica y su respectiva biopsia. La neoplasia en etapa tercera comprende una serie de tumores con metástasis en ganglios linfáticos. Los sujetos en estadio tres con metástasis ganglionar tienen un pronóstico sombrío y muy pocos viven un año o más. El pronóstico en etapa cuatro es después de la extirpación y trasplante, y es rara la supervivencia a un año. Okuda y colaboradores crearon originalmente un sistema de estadificación funcional basado en el cuadro clínico y que incorpora la contribución de la hepatopatía primaria, ya que muchos de nuestros pacientes tienen una cirrosis. Los sujetos que pertenecen a la etapa tres de dicho sistema tienen un pronóstico sombrío puesto que es imposible extirpar el tumor y el mal estado del hígado impide la quimioterapia. Por supuesto, algunos de estos pacientes pueden ser sometidos a una resección, sobre todo cuando el tumor es muy pequeño, y en otras etapas a un trasplante hepático, (OL+X).

Las variables que se imponen en la clasificación de CLIP son: el número de tumores, que indica la sustitución del hígado por el tumor; la escala de Child-Pugh y se le dan puntos (puede ser A, B o C); el nivel de alfa-fetoproteína –como dijimos, muy importante–; la trombosis de vena porta (si está o no está). Y a esto también se asignan puntos; entonces puede ser CLIP 0, CLIP 1, CLIP 2, CLIP 3.⁴¹⁰

Luego, la clasificación de Okuda, que es según el tamaño del tumor, la ascitis, el nivel de albúmina y la concentración de bilirrubina. Puede estar en estadio 1, estadio 2 y estadio 3. (*Ver Cuadro 2*).

Es importante entonces reconocer que existen factores que son clínicos, de laboratorio, de gabinete, y que todos se pueden relacionar a diversas clasificaciones para pronosticar cómo va a evolucionar nuestro paciente. Como se trata de un cáncer de una alta mortalidad y casi nula supervivencia, y que ocupa nuestros esfuerzos –incluso para realizarle un trasplante hepático–, es claro que los factores diagnósticos, pronósticos y de riesgo deben mejorarse con otro tipo de pruebas que nos hagan mejorar la supervivencia del paciente, con un diagnóstico temprano y con un tratamiento más eficaz.



Cuadro 2

1.5.- Tratamiento.

Los pacientes con hepatocarcinoma, por lo general, padecen dos enfermedades, cirrosis y el propio hepatocarcinoma. Cada una de estas enfermedades puede causar la muerte en cualquier momento.⁴¹¹ La presencia de cirrosis por lo general limita la extirpación quirúrgica, la hepatectomía y la quimioterapia. De este modo, la evaluación del paciente y los planes terapéuticos deben de tomar en consideración la gravedad de la hepatopatía de base. Las posibilidades terapéuticas ante un hepatocarcinoma pueden ser complejas, la evolución natural del hepatocarcinoma es muy variable. El individuo que al ser atendido por vez primera muestra un tumor avanzado, o sea, que tiene invasión

vascular, sintomatología muy evidente y propagación extrahepática, tiene una media de supervivencia de aproximadamente cuatro meses, con o sin tratamiento. Los resultados del tratamiento, según muchas publicaciones, son difíciles de interpretar. La supervivencia no siempre refleja la eficacia terapéutica por los efectos adversos que la hepatopatía primaria tiene en la longevidad. En el tratamiento integral de los pacientes con hepatocarcinoma es importante contar con personal multidisciplinario que comprende a un gastroenterólogo, un hepatólogo, un radiólogo intervencionista, un oncólogo quirúrgico y otro médico, un cirujano general especializado y un cirujano especializado en trasplantes.⁴⁰⁸

Hepatocarcinoma en las etapas 1 y 2. Para los tumores en etapas incipientes existen varios métodos con los que se obtienen buenos resultados como extirpación quirúrgica, ablación local (ya sea térmica o con radiofrecuencias), y las inyecciones locales con etanol o ácido acético. La mayoría de los individuos con hepatocarcinoma tienen algún defecto de campo en el hígado cirrótico, por lo que tienen riesgo de formar múltiples tumores primarios en esta glándula. Muchos sujetos padecen una hepatopatía primaria grave y quizá no toleran la pérdida importante de parénquima hepático en la cirugía; algunos son candidatos para recibir un trasplante ortotópico de hígado. Un principio importante en el tratamiento del hepatocarcinoma incipiente es utilizar terapias que protejan al hígado y tratar a la neoplasia y a la cirrosis simultáneamente.

Extirpación quirúrgica. El riesgo de una hepatectomía⁴¹⁰ mayor es elevado, con una mortalidad de 5 a 10% por la hepatopatía primaria y la posibilidad del desarrollo de una insuficiencia hepática. En ocasiones se realiza la oclusión preoperatoria de la vena porta para atrofiar el lóbulo que tiene hepatocarcinoma y provocar hipertrofia compensadora del hígado sano, permitiendo una extirpación más segura. La ecografía transoperatoria es útil para planificar la vía quirúrgica de acceso. En los cirróticos cualquier cirugía mayor del hígado puede ocasionar insuficiencia hepática. La clasificación de Child-Pugh de insuficiencia hepática es un elemento fiable para pronosticar la posible tolerancia a la cirugía hepática y la ablación quirúrgica se reserva para los pacientes en escala A, B Child-Pugh. Los pacientes en las escalas B y C con estadios 1 y 2 de hepatocarcinoma deben ser enviados para la práctica de un trasplante si así conviene, y también los individuos con ascitis o con antecedentes recientes de crisis

hemorrágicas, por consiguiente. La extirpación quirúrgica abierta es la técnica más fiable pero a veces se obtienen mayores beneficios con estrategia laparoscópica para la ablación. Por ejemplo extirpación por radiofrecuencia o la inyección percutánea de etanol. No se han hecho comparaciones adecuadas de las técnicas mencionadas y la selección del tratamiento suele basarse en la experiencia y pericia del médico.⁴¹⁰

Ablación local. La ablación con radiofrecuencia utiliza calor para eliminar los tumores. El tamaño máximo de la sonda permite obtener una zona de necrosis de 7 cm, que es suficiente para un tumor de 3 o 4 cm. El calor destruye células dentro de la zona de necrosis. El tratamiento de tumores situados cerca de las principales triadas porta puede lesionar los conductos biliares y obstruirlos, por lo que son muy escasos los tumores anatómicamente adecuados para usar esta técnica. La radiofrecuencia se realiza por vía percutánea o laparoscópica bajo guía tomográfica o ecográfica.⁴¹³

Inyección local. Numerosas sustancias han sido utilizadas para inyectarlas dentro del tumor, principalmente el etanol. El hepatocarcinoma relativamente blando dentro del entorno duro del hígado cirrótico, permite inyectar grandes volúmenes de etanol en el interior del tumor sin que se difunda al resto del parénquima hepático o se derrame fuera del mismo. El etanol destruye directamente las células cancerosas pero no es selectivo y destruye también las células sanas vecinas. Por lo general se necesitan varias inyecciones, tres de promedio, a diferencia de una sola sesión, en el caso de la radiofrecuencia. El tamaño máximo de tumor que puede ser tratado de manera fidedigna es de 3 cm, e incluso con múltiples inyecciones.⁴¹³

Trasplante de hígado. Una opción viable en el caso de tumores en estadios 1 y 2 con cirrosis es el trasplante ortotópico de hígado⁴⁰⁸, y la supervivencia que se obtiene es cercana a la que se logra en situaciones no cancerosas. El trasplante en individuos con una sola sección de 5 cm o menos, o tres ganglios o menos, cada uno de 3 cm o menos, –que es el criterio de Milán– permite una supervivencia excelente sin tumor, más o menos el 70 % a los cinco años. En el caso del hepatocarcinoma avanzado no es posible realizar un trasplante por el índice tan elevado de recidiva tumoral. Al colocar en la lista de trasplante los pacientes de hepatocarcinoma deben esperar largo tiempo un hígado de un donante, y como consecuencia alguno de los tumores han avanzado mucho durante este período. Mientras se realiza el trasplante se han utilizado diversos tratamientos,

incluyendo la quimioembolización transarterial y los que ya hemos detallado. Estos tratamientos previos al trasplante permiten a la persona permanecer más tiempo en la lista de espera y contar con mayores oportunidades para el trasplante. Todavía no se sabe si estas acciones se traducen en una supervivencia más prolongada después del trasplante. Tampoco se sabe si los individuos que recibieron tratamiento preoperatorio del tumor siguen el patrón de recidivas previsto por el estadio del tumor en el momento del trasplante, es decir, después de la extirpación local, o si siguen el curso fijado por los parámetros del tumor que existían antes del tratamiento en cuestión. El sistema puntual denominado UNOS que se ocupa de establecer las prioridades de quiénes recibirán un trasplante, y en la actualidad incluye puntos adicionales para los pacientes con hepatocarcinoma. Los resultados satisfactorios obtenidos con el trasplante de donantes vivos emparentados también han permitido que los enfermos reciban sus trasplantes con mayor prontitud, en el caso de hepatocarcinoma y a menudo con tumores más grandes que pequeños.⁴¹³

Tratamiento complementario. Todavía no se establece la utilidad de la quimioterapia complementaria en los pacientes sometidos a la extirpación del tumor o a un trasplante. Tampoco se han observado ventajas evidentes en cuanto a la supervivencia sin enfermedad o con las estrategias complementarias o neocomplementarias, aunque en un metanálisis de varios estudios se observa una supervivencia más prolongada tanto con enfermedad de base como sin ella. Los análisis de la quimioterapia complementaria en el postoperatorio, no han demostrado nada en cuanto a lapsus sin enfermedad ni en la supervivencia global, pero los estudios aislados de TACE y iodoetiodol neocomplementarios publican una supervivencia más prolongada después de la extirpación. Debemos conocer las vías patogénicas angiogénicas en el desarrollo del hepatocarcinoma para nuevas dianas. (*Ver Figuras 11, 12, 13 y 14*).

Múltiples vías de señalización celular implicadas en la patogénesis del CHC

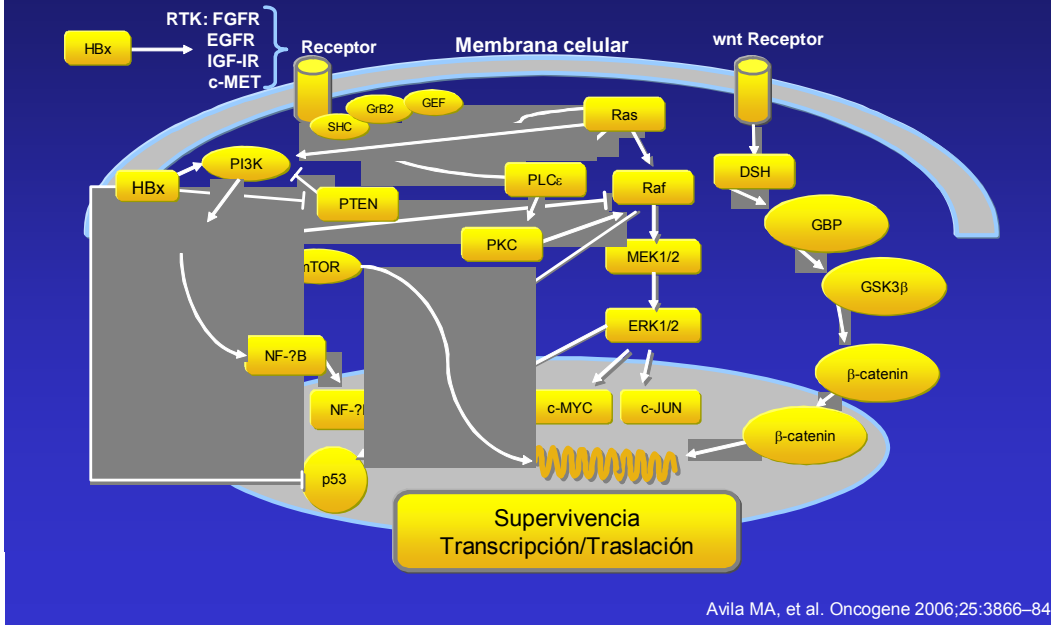


Figura 11

La vía RAF/MEK/ERK

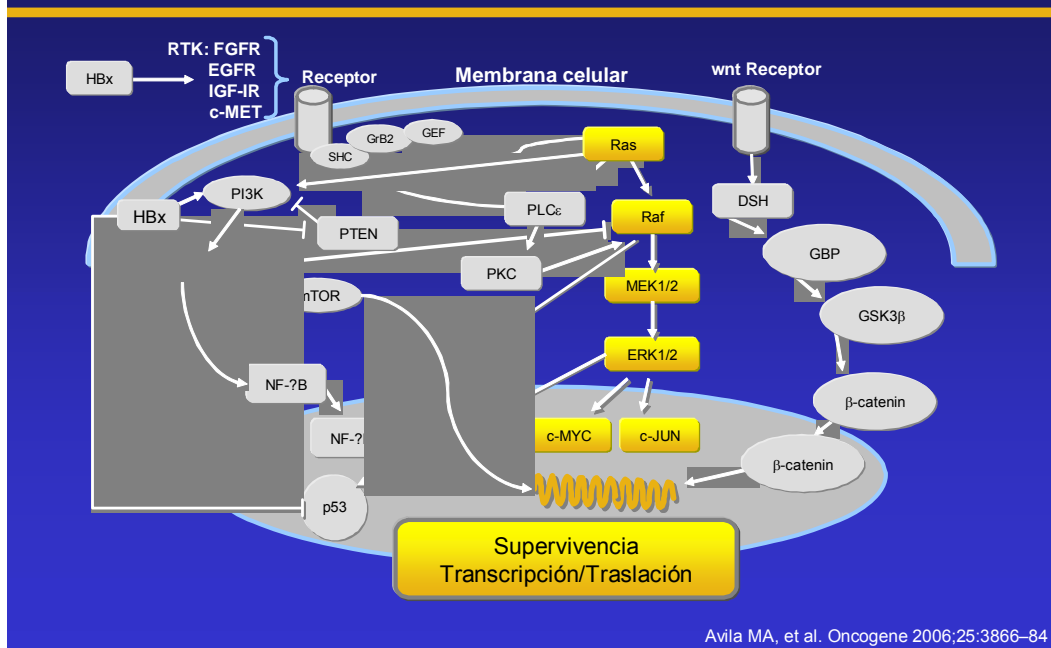


Figura 12

La vía RAF/MEK/ERK

- Las mutaciones oncogénicas que resultan en una sobreactivación del RAF se han observado en un 30% de los tumores CHC¹
- La sobreexpresión de RAF se ha visto en un 50% of biopsias de CHC¹
- La sobreexpresión desreguladas de RAF se ha relacionado con:¹
 - Estimulación de la proliferación celular
 - Inducción de la angiogénesis
 - Aumento de la invasividad y formación de metástasis
- En líneas celulares tumorales de CHC, el bloqueo de la vía RAF/MEK/ERK resulta en:^{2,3}
 - Inhibición de la proliferación celular
 - Aumento de la apoptosis
 - Disminución de la tumorigénesis

1. Gollob JA et al. *Semin Oncol.* 2006;33:392-406; 2. Wiesenauer CA et al. *J Am Coll Surg.* 2004;198:410-421; 3. Liu L et al. *Cancer Res.* 2006;66(24):11851-11588

Figura 13

Angiogénesis y CHC

- En el CHC, a exceso de factores proangiogénicos son secretados, entre los que se incluyen:
 - Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
 - Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)
 - Factor de crecimiento placentar (PIGF)
 - Factores de crecimiento transformadores α y β (TGF- α , TGF- β)
 - Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)
 - Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
 - Factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF)
 - Angiopoyetinas
 - Interleukinas (IL-4, IL-8)



Semela D, Dufour J-F. *J Hepatol* 2004;41:864-80

Figura 14

Hepatocarcinoma en estadios 3 y 4. En el caso de los cánceres en etapa 3 son muy pocas las opciones quirúrgicas. En los individuos sin cirrosis se puede llevar a cabo una hepatectomía mayor, aunque el pronóstico es poco satisfactorio. La extirpación quirúrgica es posible en los individuos con cirrosis en etapa A de Child pero la lobectomía se acompaña de complicaciones graves y muerte y el pronóstico a largo plazo es poco satisfactorio. Sin embargo, un pequeño porcentaje de pacientes exhibe una supervivencia mucho mayor a largo plazo, justificando el intento de extirpación cuando éste es posible. La naturaleza avanzada de estos tumores después de la extirpación, incluso satisfactoria, provoca recidivas inmediatas. Los pacientes con estas características no son considerados candidatos para trasplante por la elevada frecuencia de recidivas, salvo que con el tratamiento neocomplementario se logre reducir el tamaño del tumor.

La reducción del volumen del tumor primario permite llevar a cabo una cirugía menos cruenta y el hecho de aplazar la cirugía facilita la manifestación de la enfermedad extrahepática en los estudios de imagen, evitando la necesidad de un trasplante quirúrgico. El pronóstico de las neoplasias en etapa cuatro es sombrío y no se recomienda tratamiento quirúrgico alguno.⁴⁰⁹

Quimioterapia por vía general. Se han realizado numerosos estudios clínicos comparativos y no comparativos con diversos medicamentos importantes utilizados en la quimioterapia neoplásica. Ningún medicamento solo o combinado y administrado por la vía general obtiene un índice reproducible en respuesta de 25% o tiene algún efecto sobre la supervivencia. Sin embargo, tenemos conocimiento de que un medicamento que se ha administrado a pacientes con hepatocarcinoma avanzado llamado sorafenib, ha obtenido en pacientes con un promedio para este grupo de supervivencia de 9 a 10 meses (tres meses más de sobrevida). (*Ver Figuras 15, 16, 17 y 18*).

Angiogénesis y CHC

- VEGF estimula:
 - Proliferación celular
 - Supervivencia celular
 - Migración celular
 - Permeabilidad vascular
- VEGFR-2 is the principal receptor VEGF de las células endoteliales que promueve los efectos proangiogénicos del VEGF¹
 - VEGFR-2 estimula la angiogénesis asociada al cancer a través de la activación de la vía de señalización RAF/MEK/ERK
- En CHC, la sobreexpresión del VEGF se ha relacionado con:²
 - Mayor estadio tumoral stage
 - Recurrencia de la enfermedad
 - Pobre SG
 - Invasión vascular

1. Kaban K and Herbst RS. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002;16(5):1125–1171; 2. Semela D and Dufour J-F. *J Hepatol.* 2004;41:864–880

Figura 15

Sorafenib inhibe tanto la proliferación tumoral como la angiogénesis

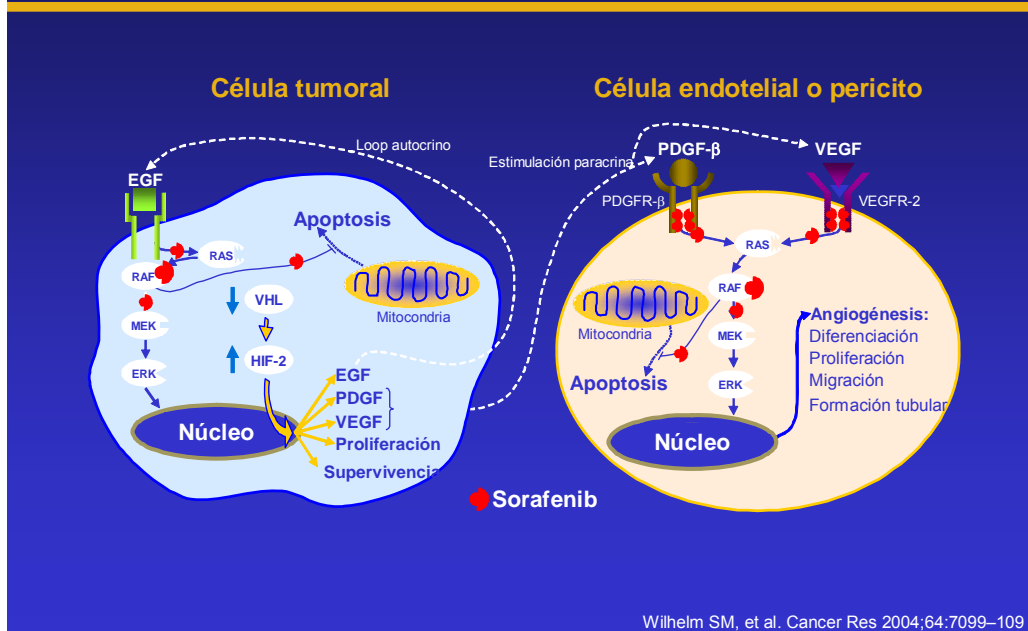


Figura 16

Sorafenib Inhibe la actividad enzimática en células vivas

- Inhibe la fosforilación de ERK en líneas celulares que expresan RAS o RAF mutantes activadas:
 - Sorafenib inhibe la vía RAF/MEK/ERK
 - Sorafenib interfiere en la proliferación celular tumoral
- Inhibe la fosforilación de VEGFR-2 y PDGFR- β :
 - Sorafenib inhibe la señalización a través de VEGFR-2 y/o PDGFR- β
 - Sorafenib actúa como un agente antiangiogénico
- Inhibe la proliferación en líneas celulares de CHC:
 - Células tumorales CHC humanas (PLC/PRF/5) que expresan p53 mutante; RAS mutante y BRAF salvaje
 - Sorafenib ha demostrado en estas líneas celulares inhibir la proliferación celular e inducir la apoptosis
 - Resultados similares se han observado en un segundo tipo de líneas celulares de CHC (HepG2)

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. *Cancer Res.* 2004;64(19):7099–7109.

Figura 17

Sorafenib Induce la muerte celular en el modelo xenográfico PLC/PRF/5 CHC

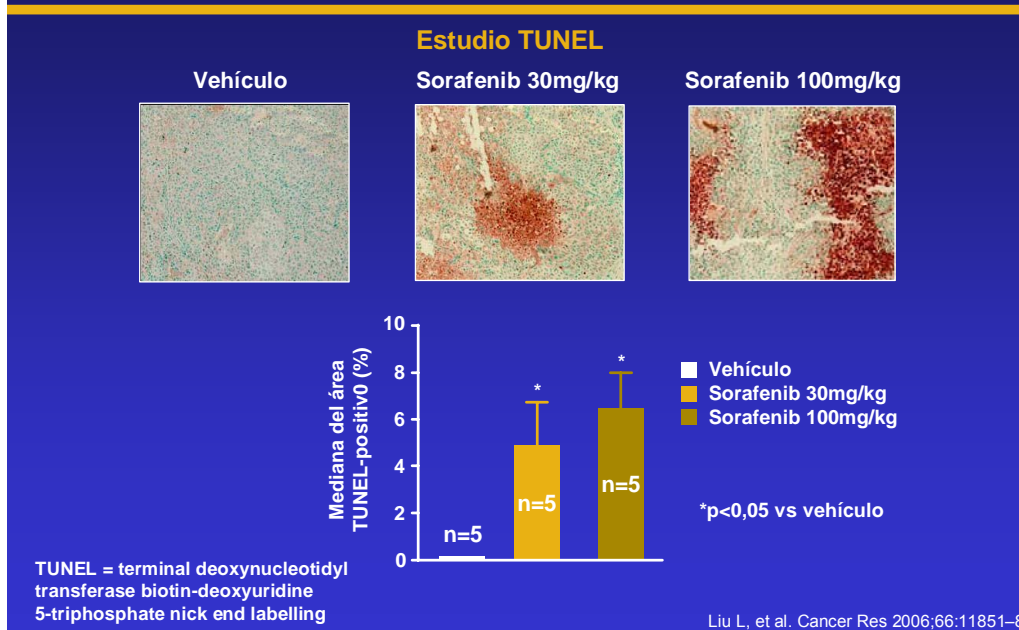


Figura 18

Quimioterapia regional. A diferencia de los resultados infructuosos de la quimioterapia por vía general, varios fármacos que se administran a través de la arteria hepática son activos contra el hepatocarcinoma circunscrito al hígado. Dos estudios comparativos aleatorios encontraron una prolongación de la supervivencia con la TACE en un subgrupo escogido de pacientes. En uno se utilizó doxorubicina y en el otro cisplatino. A pesar de que se ha demostrado una mayor extracción hepática en los fármacos, algunos como el cisplatino, la doxorubicina, la mitomicina C, y posiblemente la neocarzinostatina, originan respuestas objetivas sustanciales en la quimioterapia regional. Existe muy poca información sobre la administración de medicamentos en solución continua dentro de la arteria hepática contra el hepatocarcinoma, pero varios estudios con cisplatino han originado respuestas alentadoras. Los resultados publicados no han estratificado las respuestas por la supervivencia con base en la estadificación TNM, por lo que es difícil conocer el pronóstico a largo plazo en relación con la extensión tumoral. Asimismo, muchos de los estudios sobre quimioterapia regional en la arteria hepática han utilizado algún embolizante, como etiodol, partícula de esponja de gelatina o gelfoam, almidón, o microesferas. Dos productos están elaborados a base de microesferas de diámetro definido, embosferas y contour SE. Las partículas miden de 40 a 120, de 100 a 300, de 300 a 500 y de 500 a 1000 um de diámetro. No se ha definido el diámetro último para las partículas de TACE. Hasta la fecha, al parecer, los índices de respuesta objetiva son mayores con la administración arterial de fármacos y con algún tipo de oclusión de la arteria hepática, que con cualquier otra variante de quimioterapia por vía general. La distribución extendida de la embolización combinada con quimioterapia se ha complicado por los aspectos adversos frecuentes, pero transitorios, como lo son la fiebre, el dolor abdominal y anorexia, que ocurre en un 60% o más de los pacientes. Además, en más de un 20% de los pacientes la ascitis empeora o se elevan las transaminasas. Se han publicado algunos casos de espasmo de la arteria cística y coleocistitis. Sin embargo, también se han obtenido índices mayores de respuesta. Los efectos adversos de la embolización en el hígado disminuyen utilizando microesferas de almidón, y los índices de respuesta son de 50 a 60%. Un inconveniente para demostrar una supervivencia más prolongada en los individuos que mejoran con la TACE (quimioembolización transarterial) es que muchos enfermos fallecen por la cirrosis primaria y no por la neoplasia. Sin embargo, un objetivo legítimo de los tratamientos regionales es mejorar la calidad⁴¹³ de vida del paciente. (*Ver Cuadro 2*, pág. 19)

Terapias experimentales. Se están estudiando varios tratamientos en la actualidad. El uso de anticuerpos contra el receptor del factor del crecimiento epidérmico y de inhibidores de la cinasa de dicho receptor se encuentran en fase de investigación clínica, al igual que varias terapias antiangiogénicas. No se han observado efectos evidentes en la supervivencia. El sorafenib oral⁴¹⁵ prolonga la mediana de supervivencia de 6 a 9 meses en los casos de hepatocarcinoma avanzado no extirpable. Para el tratamiento del hepatocarcinoma se han aplicado algunas formas de radioterapia que comprenden el haz externo y la radioterapia conformacional. La hepatitis por radiación sigue siendo un grave problema que limita las dosis aplicadas. El tritio 90 emisor β puro unido a microesferas de cristal o resina ha sido evaluado en estudios en fase 2 contra el hepatocarcinoma encontrando resultados alentadores en la supervivencia y efectos adversos mínimos. Quedan por realizar estudios postaleatorios pormenorizados. La vitamina K, en dosis elevadas, se ha estudiado en seres humanos por su acción inhibidora del hepatocarcinoma, esta idea se basó en el defecto bioquímico característico del hepatocarcinoma, esto es, una mayor concentración de protrombina inmadura, llamada DSP o PIVKA-2, por un defecto en la actividad de la carboxilasa de protrombina que es una enzima supeditada a la vitamina K. En dos estudios comparativos aleatorios sobre vitamina K, en Japón, se observó una mejor frecuencia del tumor. Sería interesante alentar la participación de los pacientes en estudios orientados a la evaluación de nuevas terapias.

1.6.- Prevención.

La prevención de toda enfermedad es ideal. Sin embargo, muchas veces la prevención más importante depende de la aplicación de una vacuna. En el caso de la hepatitis por virus B existe desde 1983 una vacuna para prevenir dicha enfermedad y todas sus consecuencias. Ésta se aplica desde la niñez y prácticamente en cualquier edad.^{26,27}

La utilización de una vacuna para la protección contra el virus de la hepatitis C no está disponible. Debido a la alta variabilidad y mutación del virus, sobre todo en la región no estructural, dicho virus no ha permitido realizar una vacuna eficaz. Por lo tanto estaremos viendo más cirrosis y hepatocarcinomas debido a la etiología del virus de la hepatitis C.^{28,29}

Otro tipo de pacientes que desarrollan hepatocarcinoma por otras etiologías, como el alcohol, la aflatoxina, la medida profiláctica sería evitar la exposición al tóxico, o sea, evitar la exposición a la ingesta de alcohol y a la aflatoxina.^{30,42}

Estas serían las medidas más importantes. Por supuesto, además de evitar la exposición a los virus, a los tóxicos, es importante hacer publicidad en los medios de comunicación, radio, televisión, prensa escrita, y a nivel de la escuela en los centros de enseñanza secundaria y en la universidad, sobre la necesidad de que las nuevas generaciones, así como las actuales, procuren no usar jeringas, no intercambien jeringuillas y desechen todo el material, como lo son jeringas contaminadas, cortaúñas, rasuradoras, o por lo menos que éstas solamente se usen de una manera unipersonal. Es importante reforzar las medidas preventivas en clínicas y hospitales, ya que recientemente en los Estados Unidos en este año se presentó la contaminación de 70 pacientes con el virus de la hepatitis C a través de una jeringuilla de anestesia contaminada. Debe realizarse concientización insistente, como he dicho, en todos los medios de comunicación para modos de vivir más seguros. En el caso del virus de la hepatitis B deben mantenerse relaciones sexuales con protección. En el caso del virus de la hepatitis C no se ha demostrado transmisión vía sexual, sin embargo podría ser posible. En todo caso, el mantener un peso ideal, mantener el control adecuado de la diabetes mellitus, evitar el fumar, y comer frutas y verduras frescas así como carnes, nos ayudarán a prevenir la mayoría de las enfermedades relacionadas con el hepatocarcinoma.²

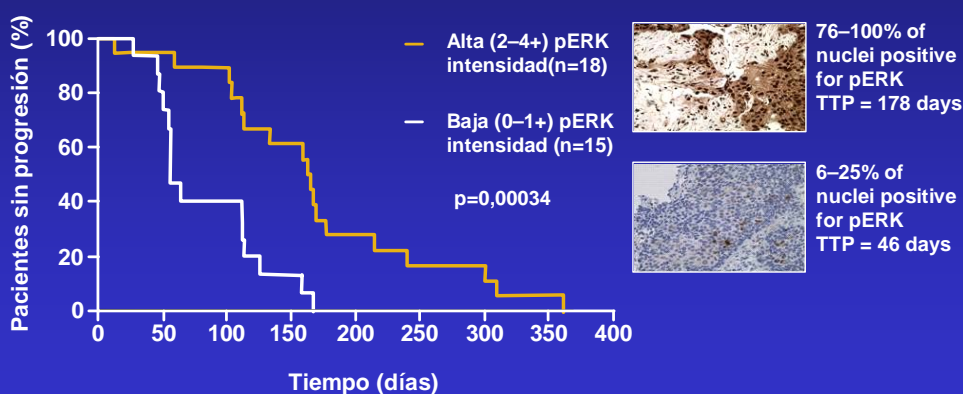
1.7.- Necesidad de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

Está claro que el estado actual del diagnóstico y tratamiento del hepatocarcinoma nos deja muchos sinsabores, fundamentalmente porque parece ser que el paciente, cuando le hacemos el diagnóstico de hepatocarcinoma, prácticamente ya se nos está yendo de las manos. (*Ver Figuras 19 y 20*).

Estudio Fase II de sorafenib en pacientes con CHC avanzado: Biomarcadores

TTP y ERK fosforilada (pERK)

TTP en relación con pERK status (n=33)



Abou-Alfa GK, et al. J Clin Oncol 2006;24:4293–300

Figura 19

Estudio Fase II de sorafenib en pacientes con CHC avanzado: Conclusiones

- Sorafenib fue bien tolerado y mostró actividad antitumoral en CHC avanzado
 - RP ó RM en 8% de los pacientes, EE durante ≥ 16 semanas en 34% de los pacientes
 - La mediana del TTP valorada independientemente fue 5,5 meses
 - La mediana de SG valorada por el investigador fue 9,2 meses
- No se observaron diferencias farmacocinéticamente relevantes entre pacientes Child–Pugh A y B:
 - Sorafenib fue igualmente bien tolerado en ambos subgrupos

Figura 20

La idea sería profundizar en la dinámica molecular de la etiopatogenia del hepatocarcinoma para buscar factores diagnósticos que pudieran definir la posibilidad de muchos grupos, con factor de riesgo para el desarrollo del hepatocarcinoma. O sea, métodos diagnósticos o buscar un factor diagnóstico que pueda ser empleado en una fase preneoplásica, que en el caso del hepatocarcinoma sería en los pacientes con hepatitis crónica y en los pacientes con cirrosis, sobre todo aquellos de naturaleza y etiopatogenia viral, tomando en cuenta sobre todo el virus de la hepatitis C, para el cual no tenemos vacunación. Por lo tanto, podríamos pensar que una de las dianas terapéuticas más importantes se pueden aplicar en una fase de preneoplasia, y entonces no solamente sería una estrategia diagnóstica novedosa sino al mismo tiempo con una vertiente terapéutica preventiva. Estoy hablando de la posibilidad de usar la telomerasa y los inhibidores de la telomerasa. La telomerasa es realmente una enzima revolucionaria y tiene que ver con el telómero celular, de ahí su nombre. El telómero se encuentra situado en los extremos de los cromosomas y nos protege de la degradación de cada ciclo celular hasta que el desgaste del mismo en los diversos ciclos celulares impide su función protectora, haciendo que se produzca errores celulares, inestabilidad cromosómica, errores en la segregación y aparición de diversas mutaciones y apoptosis.^{112,113,119}

Para mantener el tamaño de los telómeros está la enzima telomerasa³⁸⁴, solamente que en condiciones normales la mayoría de nuestras células suprimen la actividad de esta enzima que restaura la secuencia de nucleótidos del telómero. Está compuesta de dos subunidades, la transcriptasa inversa de telomerasa (o TERT) y la unidad proteica catalítica (TERC). Se ha demostrado que lesiones preneoplásicas en cáncer gástrico³⁸⁹ y en hepatocarcinoma⁴⁰⁵ pueden producir telomerasa en diversos porcentajes. Sabemos también que el 90% de las células de los tumores malignos, incluyendo el hepatocarcinoma y el cáncer gástrico, producen telomerasa. Por lo tanto la telomerasa nos sirve de patrón o estándar áureo de referencia para el estudio de esta enzima. Si se logra uniformar el diagnóstico a base de telomerasa podríamos pensar que una posibilidad importante sería crear inhibidores de la telomerasa que sean específicos para cada tumor y no interfieran con la producción de telomerasa de las células madre hematopoyéticas y de otras células madre como lo son las del testículo y las del oocito. Existen otras células madre que se han demostrado en la piel, en el hígado mismo, en el corazón, en el tejido graso, que al ser células tronco o células madre tienen la capacidad de expresar telomerasa, y un medicamento que inhibe la telomerasa³⁸⁵ que no sea

específico de un tumor podría alterar el desarrollo celular de las funciones de las células madre de estos pacientes en órganos específicos.

En cuanto a la posibilidad de nuevas dianas terapéuticas encontradas en el diagnóstico aportadas por la nueva Biología Molecular y Celular tendrían el problema básico de ver cuál es más importante que la otra, porque en la señalización tumoral existen de 60 a 100 vías diferentes por tumor, mientras que si bloqueamos por ejemplo la telomerasa es como bloquear uno de los pasos más importantes y generales en el desarrollo de la célula tumoral. De ahí la esperanza que se nos abre, no solamente como factor diagnóstico, sino también como un factor importante en la prevención o en el tratamiento de los pacientes con hepatocarcinoma. Dicho de otra manera, un paciente con una hepatitis crónica o una cirrosis hepática que se le demuestre altos índices de telomerasa, se le podría administrar el inhibidor de la telomerasa para que no vaya a evolucionar a hepatocarcinoma y también podríamos pensar qué efecto puede tener un medicamento inhibidor de la telomerasa³⁹⁵ sobre el índice de fibrosis de la enfermedad hepática, por virus B y por virus C de la hepatitis, o sea, evitar que los pacientes que tienen grados diversos de hepatitis crónica evolucionen hacia la cirrosis. Estos son planteamientos teóricos que podrían ser muy importantes en la hepatología de nuestros días.

¿Qué otras perspectivas novedosas tenemos? Podríamos tener una vacuna⁴⁰⁰ antitelomerasa de la fracción TERT. La otra cuestión importante es que estos nuevos marcadores tumorales podrían también ser detectados en la biopsia hepática. En muchos exámenes de laboratorio, entre ellos la alfafetoproteína, transaminasas y un derivado de la protrombina, los investigadores han querido sustituir la biopsia hepática por el desarrollo de un sistema en que se incluya la alfafetoproteína, las transaminasas y la detección de una protrombina anómala, o sea, un análisis químico sanguíneo quiere sustituir al análisis histopatológico. Penamos que ninguno de los dos, sino que las dos medidas deben ser tomadas siempre y cuando el paciente no sufra ningún detrimento. Vale decir que una técnica para biopsia hepática bien ejecutada nos puede dar mucha información, y como la obtención de las muestras sanguíneas no requiere mayor capacitación (lo podemos hacer sin ningún problema), entonces ambas estrategias diagnósticas deberían de realizarse. Obviamente los pacientes tienen que tener una serie de requisitos hematológicos para que la biopsia hepática no se convierta en yatrogenia. No podemos abandonar el estudio histopatológico de nuestros pacientes del aparato

digestivo. No podemos dejar de lado que existen clasificaciones, por ejemplo el de la displasia celular, que nos pueden ser de mucha utilidad, y que además existen técnicas inmunohistoquímicas que permiten determinar una gran cantidad de antígenos, de proteínas, de enzimas, como lo son la alfafetoproteína, el P 53, la telomerasa y otros que nos pueden ayudar en el diagnóstico pronóstico y riesgo de todos nuestros pacientes. Cada día se encuentran nuevos marcadores que pueden ser todavía de mayor utilidad y que están enmarcados en la técnica inmunohistoquímica⁴⁰⁶ y de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

2.- BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL HEPATOCARCINOMA Y EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

La Biología Molecular de las células es un área de investigación activa cuyo entendimiento es fundamental para todas las ciencias biológicas. Esto es cierto no sólo desde el punto de vista de partida de las ciencias básicas sino también respecto a un número creciente de aplicaciones prácticas en Biotecnología, Medicina y Agricultura. Especialmente tras haber completado la secuencia del genoma humano, el progreso de la Biología Celular y Molecular está abriendo nuevos horizontes en la práctica médica diaria. En efectos llamativos se incluyen el desarrollo de nuevos medicamentos especialmente diseñados para interferir con el crecimiento acelerado de las células cancerosas y con el uso potencial de células madre no embrionarias para sustituir tejidos dañados y tratar pacientes. Ya se ha demostrado que las células madre embrionarias podrían ser más bien nocivas porque pueden desarrollar diversos tipos de tumores y éticamente tienen muchos problemas para su utilización.

La apreciación de la similitud y diferencias entre las células resulta particularmente importante para entender la Biología Celular. Todas las células comparten propiedades fundamentales que se han conservado a través de los tiempos en la evolución.³⁸⁶ Por ejemplo todas las células utilizan ADN como material genético, están rodeadas por una membrana plasmática y usan los mismos mecanismos básicos para el metabolismo energético. Por otro lado, las células actuales han evolucionado en diferentes estilos de vida. Muchos microorganismos como bacterias, amebas y levaduras, se componen de células únicas capaces de autorreplicarse independientemente. Los organismos más complejos están compuestos por una colección de células que funcionan

de una manera coordinada, con diferentes células especializadas para desarrollar funciones particulares. El ser humano, por ejemplo, está compuesto por más de 200 tipos diferentes de células, cada uno de ellos especializado para cada función distinta, como es la memoria, la vista, el movimiento muscular o la digestión. La diversidad exhibida es sorprendente si consideramos las diferencias entre las bacterias y las células cerebrales. Hay un marco común y en la Biomedicina experimental es importante reconocer que puede haber eventos que se puedan extrapolar de células en el laboratorio para su aplicación en el ser humano.

Origen y evolución de las células. La célula se define como la unidad anatómica y funcional de los seres vivos, y se divide en dos clases principales, según donde se sitúe el núcleo. Primero, las células procariotas, que son las bacterias, que carecen de envoltura nuclear; luego, las células eucariotas, que presentan un núcleo donde el material genético está separado del citoplasma. Las células procariotas son generalmente más pequeñas y simples que las células eucariotas, además de la ausencia de núcleo sus genomas son menos complejos y no contienen organelas citoplasmáticas o citoesqueleto. Al margen de estas diferencias los mismos mecanismos básicos moleculares gobiernan la vida de ambas indicando que todas las células presentes hoy descienden de un ancestro primordial único.

La primera célula. Parece ser que la vida emergió hace unos 3.800 millones de años aproximadamente, unos 750 millones de años después de que se formara la Tierra, y aproximadamente de 12.000 a 13.000 millones de años después del Big-Bang. Por lo tanto si dividiéramos el tiempo en eones podríamos decir que los 100.000 años de vida que tiene el homo sapiens, es más o menos una hora en una semana de existencia del universo tal como lo conocemos. Cómo se originó la vida y cómo la primera célula se convirtió en un ser son cuestiones especulativas, puesto que no se pueden reproducir en un laboratorio, sin embargo algunos experimentos han proporcionado pistas acerca de este proceso.³⁸⁶

En 1920 se sugirió por primera vez que moléculas orgánicas podían polimerizarse espontáneamente y formar macromoléculas bajo condiciones que se suponía existían en aquella atmósfera primitiva. En el momento en el que surgió la vida la atmósfera de la Tierra se piensa que contenía poco o nada oxígeno libre constando principalmente de CO₂ y N₂ además de pequeñas cantidades de gases como H₂, H₂S y CO. Cada atmósfera

proporciona condiciones reductoras en las que las moléculas orgánicas con una fuente de energía como la luz solar o descargas eléctricas, se pueden formar espontáneamente. O sea, que primero están los átomos, luego las moléculas orgánicas y luego las moléculas orgánicas más complejas¹⁸¹. La formación espontánea de las moléculas orgánicas fue demostrada por primera vez en los años cincuenta, cuando Stanley Miller, un estudiante graduado, demostró que la descarga de chispas eléctricas en una mezcla de hidrógeno, metano y amonio en presencia de agua conducían a la formación de una variedad de moléculas orgánicas incluyendo varios aminoácidos. Aunque el experimento de Miller no usaba con precisión las condiciones primitivas de la Tierra, claramente demostró la posibilidad de la síntesis espontánea en las moléculas orgánicas, proporcionando los materiales básicos donde surgieron los primeros organismos vivos.¹⁸¹

En el siguiente paso de la evolución se empezaron a formar las primeras macromoléculas. Se ha demostrado que los bloques monoméricos que constituyen las macromoléculas polimerizan espontáneamente bajo condiciones prebióticas aceptables. El calentamiento de mezclas secas de aminoácidos por ejemplo da como resultado polimerización para formar polipéptidos. Pero la característica fundamental de la macromolécula de la que surgió la vida debe tener la habilidad de replicarse por sí misma. Solamente una macromolécula capaz de dirigir la síntesis de nuevas copias de la misma sería capaz de reproducirse y evolucionar. De las dos clases principales de macromoléculas que aportan información a las células actuales (entre ácidos nucleicos y proteínas) sólo los ácidos nucleicos son capaces de dirigir su propia replicación. Los ácidos nucleicos pueden servir como molde para su propia síntesis como resultado del apareamiento de bases específicas entre nucleótidos complementarios. Uno de los pasos críticos en el aprendizaje de la evolución molecular ocurrió a principios de los años ochenta, cuando se descubrió en los laboratorios de Sit Altman y Tom Cech que el ARN es capaz de catalizar numerosas reacciones químicas, incluyendo la polimerización de nucleótidos. El ARN es por tanto el único capaz de servir como molde y catalizar su propia replicación. Como consecuencia se cree que el ARN ha sido el sistema genético inicial y que en una etapa temprana de la evolución química estuvo basada en moléculas de ARN con replicación propia. Es conocido como el periodo evolutivo "el mundo del ARN". Las interacciones en orden entre el ARN y los aminoácidos lo que hacían era coger el código genético y eventualmente el ADN reemplazó al ARN como material genético.

La primera célula se supone que surgió de la envoltura del ARN de la aplicación propia en una membrana compuesta por fosfolípidos. Tal y como se discutirá con detalle los fosfolípidos son los componentes básicos de todas las membranas biológicas presentes hoy día, incluyendo la membrana plasmática de células procariotas y eucariotas, sobre todo cuando hablemos de las relaciones entre células vecinas y entre células maduras hepatocitarias y células madre hepáticas y precursoras. La característica clave de los fosfolípidos que forman las membranas es que son moléculas anfipáticas, lo que quiere decir que una porción de la molécula se disuelve en agua y la otra no. Los fosfolípidos presentan largas cadenas hidrocarbonadas insolubles en agua, o sea, hidrofóbicas, unidos al grupo soluble en agua (hidrofílicas) que contienen fosfatos. En contacto con el agua los fosfolípidos espontáneamente se agrupan en una bicapa con los grupos que contienen fosfatos en el exterior y sus colas hidrocarbonadas en el interior en contacto unas con otras. Esta bicapa fosfolipídica forma una barrera estable entre dos compartimientos acuosos, por ejemplo separando el interior de la célula de su ambiente externo. Lo mismo ocurre entre la membrana del núcleo celular y el citoplasma de las células humanas por ejemplo.

La envoltura del ARN autorreplicante y la membrana lipídica se han mantenido por tanto como una unidad capaz de reproducirse a sí misma y evolucionar. La síntesis de proteínas a partir del ARN pudo ya haber evolucionado, en cuyo caso la primera célula consistiría en un ARN de replicación propia y sus proteínas codificadas.

Evolución del metabolismo. Debido a que las células se originaron en un mar de moléculas orgánicas, éstas eran capaces de obtener alimento y energía directamente de este ambiente. Pero una situación como esta es difícil en sí misma porque las células necesitan obtener energía y sintetizar las moléculas necesarias para su replicación. La utilización controlada de la energía metabólica es primordial para todas las actividades celulares y los procesos principales de metabolismo energético, se han mantenido en el tiempo prácticamente intactos en las células actuales, ya que todas utilizan adenosina 5'trifosfato (ATP) como fuente de energía metabólica para llevar a cabo la síntesis de los constituyentes celulares y conducir a otras actividades que requieren energía, como el movimiento, en la contracción muscular. Los mecanismos utilizados por las células para generar ATP han evolucionado en tres etapas correspondientes a la evolución de la glicólisis, fotosíntesis y metabolismo oxidativo. El desarrollo de estos procesos

metabólicos cambió la atmósfera de la Tierra alterando el curso de la evolución. En la atmósfera anaerobia inicial de la Tierra las primeras reacciones generadoras de energía posiblemente implicaron la escisión o ruptura de moléculas orgánicas en ausencia de oxígeno. Estas reacciones parecen ser una forma de la actual glicólisis, que es la rotura anaerobia de la glucosa o ácido láctico con la ganancia neta de energía de dos moléculas de ATP. Además de utilizar ATP como fuente de energía química intracelular, todas las células actuales llevan a cabo la glicólisis de acuerdo con la idea de que estas regiones surgieron muy pronto en la evolución. La glicólisis proporcionó un mecanismo mediante el cual la energía de moléculas orgánicas ya formadas, por ejemplo la glucosa, podían convertirse en ATP que podría ser utilizado como la fuente de energía para dirigir otras reacciones metabólicas.

En las células vegetales el desarrollo de la fotosíntesis fuerza el paso más importante de su evolución, que permitió a las células generar energía a partir de la luz solar y ser independientes de la formación de las moléculas orgánicas ya existentes. La primera bacteria fotosintética que evolucionó hace más de tres billones de años probablemente utilizaba H_2S para convertir CO_2 en moléculas orgánicas, y todavía alguna vez se utiliza un proceso de fotosíntesis similar. La utilización de agua como donante de electrones e hidrógeno para la conversión del CO_2 a compuestos orgánicos evolucionó más tarde y tuvo importantes consecuencias en cambiar la atmósfera de la Tierra. El uso de agua en reacciones fotosintéticas produce oxígeno libre, y se cree que este mecanismo ha sido el responsable de llenar a la atmósfera de la Tierra con abundante oxígeno, alrededor del 20%.

La liberación de oxígeno como consecuencia de la fotosíntesis cambió el medio en que las células evolucionaron y se cree que en determinados desarrollos del metabolismo oxidativo. Alternativamente el metabolismo oxidativo podría haber evolucionado antes que la fotosíntesis y el aumento del oxígeno atmosférico proporcionaría una importante ventaja selectiva a los organismos capaces de utilizar oxígeno en la relación de las reacciones de liberación de energía. En cualquier caso el oxígeno es una molécula altamente reactiva y el metabolismo oxidativo, utilizando esta réplica ha proporcionado un mecanismo de generación de energía a partir de moléculas orgánicas mucho más eficiente que la glicólisis anaerobia. Por ejemplo la ruptura oxidativa de glucosa en CO_2 y H_2O , proporciona energía equivalente a 36 o 38 moléculas de ATP, en comparación con las dos moléculas de ATP que se forman en la glicólisis

anaerobia. Con pocas excepciones las células actuales utilizan reacciones oxidativas como fuente principal de energía.

Procariotas actuales. Los procariotas actuales que incluyen todos los tipos de bacterias están divididos en dos grupos: las arqueobacterias y las eubacterias, que se diferenciaron al principio de la evolución. Algunas arqueobacterias tienen condiciones extremas que hoy en día son inusuales pero que pudieron prevalecer en la primitiva Tierra. Por ejemplo los termoacidófilos viven en pozos calientes de sulfuro con temperaturas de hasta 80° C y valores de pH de 2. La mayoría de las células bacterianas son esféricas en forma de bastón o espiral con diámetros que oscilan de 1 a 10 micrómetros. Su contenido de ADN varía, desde unos puntos 6 millones a 5 millones de pares de bases, cantidad suficiente para codificar unas 5.000 proteínas diferentes. Los procariotas más grandes son las cianobacterias, bacterias en las que evolucionó la fotosíntesis. La estructura de célula procariota típica es la de la *Escherichia coli*, un habitante común del tracto intestinal humano. La célula tiene forma de bastón de alrededor de 1 micrómetro de diámetro y cerca de 2 micrómetros de longitud. Como la mayoría de los otros procariotas *Escherichia coli* está rodeada por una pared celular rígida compuesta de polisacáridos y polipéptidos. Dentro de la pared celular se encuentra la membrana plasmática que es una bicapa de fosfolípidos y proteínas asociadas. Mientras que la pared celular es porosa y puede ser penetrada por una variedad de moléculas la membrana plasmática proporciona una separación funcional entre el interior y el exterior de la célula. El ADN de *Escherichia coli* es una molécula única circular diploide en comparación con el núcleo de los eucariotas no está rodeada por una membrana que lo separe del citoplasma. El citoplasma contiene aproximadamente 30.000 ribosomas, lugar donde se realiza la síntesis proteica y tiene aspecto granular.

Células eucariotas. Como las células procariotas todas las células eucariotas están rodeadas por membranas plasmáticas y contienen ribosomas. No obstante las células eucariotas son mucho más complejas y contienen un núcleo y variedad de organelas citoplasmáticas y un citoesqueleto. La organela más grande y proveniente de células eucariotas es el núcleo, con un diámetro aproximado de 5 micrómetros. El núcleo contiene la información genética de las células que en los eucariotas se encuentra quizás de forma lineal en lugar de moléculas de ADN circular. El núcleo es el sitio de la

replicación del ADN y de la síntesis del ARN; la traducción del ARN en proteínas tiene lugar en los ribosomas del citoplasma.

Además de un núcleo las células eucariotas contienen una variedad de organelas delimitadas por membranas dentro del citoplasma. Estas organelas proporcionan diferentes compartimentos en los que se localizan distintas actividades metabólicas. Las células eucariotas son por lo general más grandes que las procariotas, y con frecuencia presentan un volumen celular cien veces mayor. La compartimentalización proporcionada por las organelas citoplasmáticas es la que permite a las células eucariotas funcionar con eficiencia. Dos de estas organelas, las mitocondrias¹⁸⁰ y los cloroplastos juegan papeles imprescindibles en el metabolismo energético. Las mitocondrias, que se encuentran en casi todas las células eucariotas, son los centros de metabolismo oxidativo y por lo tanto responsables de generar la mayor parte de ATP derivado de la ruptura de las moléculas orgánicas. Los cloroplastos son los centros donde se lleva a cabo la fotosíntesis y se encuentran exclusivamente en las células de las plantas y algas verdes. Los lisosomas y peroxisomas también proporcionan compartimientos metabólicos especializados para la ingestión de macromoléculas y varias reacciones oxidativas respectivamente. Además la mayoría de las células de plantas contienen grandes vacuolas que desarrollan funciones diversas incluyendo digestión de macromoléculas y almacenaje de productos de desecho y nutrientes. También podemos definir las organelas citoplasmáticas como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Se dedican al transporte de proteínas destinadas a la secreción, a la incorporación de la membrana plasmática en los lisosomas. El retículo endoplásmico es una red extensa de membranas intracelulares que se extienden desde la membrana nuclear hasta atravesar todo el citoplasma. No sólo actúa en el proceso y transporte de proteínas sino en la síntesis de lípidos. Desde el retículo endoplásmico las proteínas son transportadas dentro de pequeñas vesículas al aparato de Golgi, donde siguen siendo procesadas y clasificadas para el transporte a destinos finales. Además de esta función de transporte de proteínas el aparato de Golgi presenta síntesis de lípidos.

Las células eucariotas tienen otro nivel de organización interna, el citoesqueleto. Una red de filamentos proteínicos que se extienden por el citoplasma. El citoesqueleto proporciona el marco estructural de la célula determinando la forma celular y la organización general del citoplasma. Además el citoesqueleto es responsable de los

movimientos de todas las células; por ejemplo la contracción de las células musculares, del transporte intracelular y la posición de las organelas y otras estructuras, incluyendo los movimientos de los cromosomas durante la mitosis.

Los eucariotas se desarrollaron hace al menos 2.700 millones de años, después de 1.000 o 1.500 millones de años de la evolución procariota. Los estudios de secuencias de ADN indican que las arqueobacterias y eubacterias son tan diferentes entre sí como lo son de los eucariotas actuales.¹⁸¹ Por lo tanto parece ser que hubo un acontecimiento en la primera etapa de la evolución, y ha sido el motivo de la divergencia de tres líneas de descendencia a partir de un pasado común, dando lugar a las actuales arqueobacterias, eubacterias y eucariotas. Resulta interesante que muchos genes de las arqueobacterias son más similares a los de las eucariotas que a las de las eubacterias, indicando que las arqueobacterias y las eucariotas comparten una línea común de descendencia evolutiva y que están más estrechamente relacionadas entre ellas que con las eubacterias.

Un paso crítico en la evolución de las células eucariotas fue la adquisición de la envoltura membranosa de las organelas subcelulares, permitiendo el desarrollo y la complejidad característica de estas células. Estas organelas se cree que han sido adquiridas como resultado de la asociación de células procariotas con el antepasado de las eucariotas.

La hipótesis de que las células eucariotas evolucionaron a partir de una selección simbiótica de las procarióticas, que se llama endosimbiosis, se sustenta con los estudios de las mitocondrias y los cloroplastos, los cuales se cree que han evolucionado de bacterias que vivían en células grandes. Las mitocondrias¹⁸⁰ y los cloroplastos tienen un tamaño similar al de las bacterias y como ellas se reproducen mediante escisión bipartita. Lo más importante es que las mitocondrias y los cloroplastos contienen su propio ADN que codifica el modo de sus componentes. El ADN de las mitocondrias y cloroplastos se replica cada vez que la organela se divide y los genes que contiene se transcriben dentro de la organela y se traduce en el ribosoma presente. Por lo tanto las mitocondrias y los cloroplastos contienen sus propios sistemas genéticos que son diferentes al genoma nuclear de la célula. Además los ribosomas y los ARN-ribosómicos de estas organelas están más relacionadas con las bacterias que aquellos codificados por el genoma nuclear de los eucariotas.^{180,181}

En general se ha aceptado como origen endosimbiótico de estos orgánulos u organelas suponiendo que las mitocondrias han evolucionado a partir de las bacterias

aerobias y los cloroplastos de las bacterias fotosintéticas como las cianobacterias. La adquisición de bacterias aerobias podría provenir de una célula que haya llevado a cabo un metabolismo oxidativo. La adquisición de bacterias fotosintéticas podría provenir de la independencia conseguida al desarrollar la fotosíntesis. Por tanto estas asociaciones endosimbióticas resultaron muy beneficiosas para lo que fueron seleccionadas en el curso de la evolución. A través del tiempo la mayoría de los genes originalmente presentes en estas bacterias en apariencia pasaron a incorporarse dentro del genoma nuclear de la célula, así que solamente algunos componentes de mitocondrias y cloroplastos siguen siendo codificados por el genoma de las organelas. Esto es importante cuando nos vayamos a referir a las mutaciones porque en la teoría evolutiva neodarwiniana se plantea la mutación como una fuente de variación de las especies. Sin embargo, esta teoría endosimbiótica dice que es la captación de nuevos genomas lo que acelera y propicia la evolución y la creación de nuevas especies. En Medicina las mutaciones son en un 99'9% letales o negativas para el ser humano, o sea, las mutaciones no conforman de ninguna manera nada beneficioso para el hombre y los animales. Esto es importante dejarlo bien claro, sobre todo cuando vayamos a hablar de la simbiosis³⁸⁶ y el papel de los virus que en la mayoría de los casos al igual que las bacterias pueden tener una relación parasítica y no simbiótica con el ser humano. Sin embargo, en la evolución de los mamíferos parece ser que un retrovirus pudo insertarse en el genoma de los mamíferos y así proteger el nuevo sistema que evolucionó, en la preservación de la especie como es pasar de reproducirse a través de huevos a reproducirse a través de gametos masculinos y femeninos, y en el caso de la hembra salvaguardar el desarrollo del organismo nuevo que se acaba de crear, o sea que estos retrovirus probablemente hayan infectado tanto a los mamíferos en general como al hombre en particular y que ha servido a través de la captación de un genoma de la preservación de la especie formando lo que se llama el sincitiotrofoblasto, que es lo que hace una fusión celular y que permite entonces poner en comunicación el tejido materno con el tejido fetal para la unidad fetoplacentaria, y parece ser que esto es heredado de un retrovirus con lo cual estaríamos ante una relación simbiótica o endosimbiótica provechosa y que ha hecho una parte importante del jalón de la evolución. En general se ha aceptado un origen endosimbiótico de las organelas suponiendo que la mitocondria ha evolucionado a partir de las células aerobias y los cloroplastos de las bacterias fotosintéticas, como son las cianobacterias. La adquisición de bacterias aerobias podría provenir de una célula aerobia con la habilidad de llevar a

cabo un metabolismo oxidativo. Así que todo parece concordar, como hemos dicho, que estas asociaciones resultan ser importantísimas para el curso de la evolución.

Instrumentos para la investigación en Biología Celular.³⁸⁸ Como en todas las ciencias experimentales la investigación en Biología Celular depende de los métodos de laboratorio que se puedan utilizar para estudiar la estructura y función celulares. Muchos avances importantes sobre el funcionamiento de las células han conducido directamente al desarrollo de nuevos métodos de investigación. La precisión de los instrumentos experimentales disponibles para el biólogo celular resulta por tanto crítica para ver el estado actual y el futuro de esta área de la ciencia que se mueve con mucha rapidez. Algunos de los métodos generales importantes de la Biología Celular están resumidos de la siguiente forma.

Microscopía óptica. Debido a que la mayoría de las células son demasiado pequeñas para ser observadas a simple vista el estudio de las células ha dependido primordialmente del uso del microscopio. Es más, el descubrimiento real de las células surgió del desarrollo del microscopio. Robert Hooke fue el primero que acuñó el término de célula siguiendo las observaciones de una pieza de corcho con un simple microscopio óptico en 1665, utilizando un microscopio que ampliaba los objetos hasta 300 veces más de su tamaño real. Antony Van Leeuwenhoek en 1670 y años posteriores fue capaz de observar diferentes tipos de células, incluyendo espermatozoides, glóbulos rojos y bacterias. La propuesta de la teoría celular por Matthias Scheldideni Theodor Schwann en 1838 debe tomarse como el nacimiento de la Biología Celular contemporánea. El microscopio óptico continúa siendo un instrumento básico para la Biología Celular.

Posteriormente encontramos microscopía de contraste de fases y microscopía de interferencia de contraste diferencial. También tenemos la microscopía de interferencia con contraste diferencial videopotenciada. También tenemos la microscopía de fluorescencia. Un avance reciente en la microscopía de fluorescencia ha sido el empleo de la proteína verde fluorescente (GFP) para visualizar proteínas en el interior de células vivas y seguir la pista de sistemas subcelulares y funciones. Recientemente, el 8 de octubre de 2008 les han otorgado el Premio Nobel de Química a los doctores Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Tsien. Ellos compartieron el Premio Nobel por sus trabajos con la proteína fluorescente verde (GFP). Además está la microscopía confocal y la microscopía de excitación multifotónica. Posteriormente se ha desarrollado la

microscopía electrónica. Está la microscopía electrónica de transmisión, el sombreado de metal, y también está la preparación de muestras mediante la separación por congelación o criofractura. También una variante llamada el grabado por congelación. Luego hay un segundo tipo de microscopía electrónica llamado microscopía electrónica de barrido, que se utiliza para obtener una imagen tridimensional de las células.

Hablemos ahora de lo que se llama el apartado de separación subcelular. Aunque el microscopio electrónico permite una observación detallada de la estructura celular la microscopía en exclusiva no es suficiente para definir las funciones de los numerosos componentes de las células eucariotas. Para contestar a muchas de las preguntas que atañen a la función de las organelas celulares ha sido necesario aislar a las organelas de las células eucariotas de forma que puedan utilizarse para su estudio bioquímico. Normalmente este se haría mediante la centrifugación diferencial desarrollada por Albert Claudé, Christian de Dube y sus colegas en los años 40 y 50 para separar los componentes de las células de acuerdo con su tamaño y densidad. La suspensión de las células rotas se fracciona en sus componentes mediante una serie de centrifugaciones en una ultracentrífuga. Está entonces la purificación mediante la centrifugación con el ingrediente de densidad. También está la centrifugación por velocidad. También contamos con la centrifugación de equilibrio.

Crecimiento de las células animales en cultivo. La habilidad para estudiar las células depende en su mayoría de la facilidad con la que puedan ser manipuladas en el laboratorio. Estas técnicas han sido desarrolladas desde hace muchos años y el doctor Harry Eagle desarrolló los requisitos de las células de mamíferos en cultivo de tejidos en el año 1955. Los primeros cultivos celulares se basaban en crecimiento celular a partir de fragmentos de tejido y el doctor Eagle fue el primero en definir un medio básico para el cultivo de la célula Hela y los fibroblastos de ratón, el cultivo de células vegetales y también el cultivo de los virus. Los virus son parásitos intracelulares incapaces de replicarse por sí mismos. Se reproducen mediante la infección de células huésped y la usurpación de la maquinaria celular para producir más partículas virales. En sus formas más simples se componen de ácidos nucleicos ya sea ADN o ARN rodeado de una cubierta proteínica. Los virus son importantes para la Biología Molecular y Celular porque proporcionan sistemas simples que pueden ser utilizados para investigar las funciones de las células. El rápido crecimiento y el pequeño tamaño de las bacterias

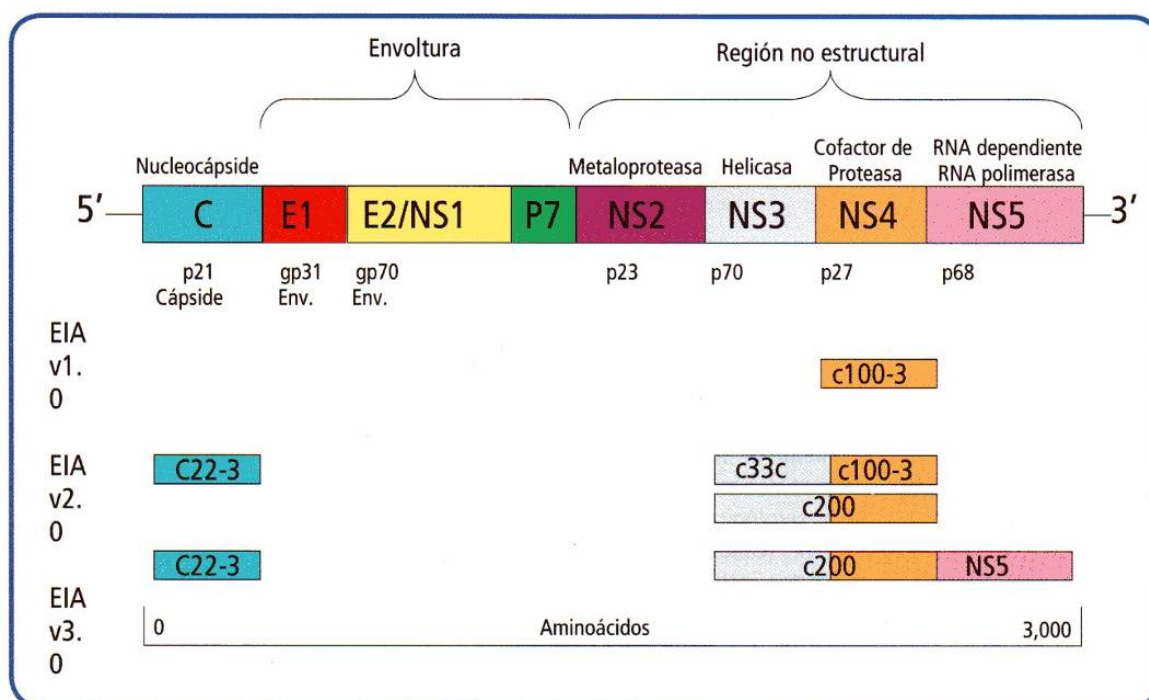
hacen de ellas un elemento excelente para experimentos en Biología Molecular y Celular, y los virus bacterianos llamados bacteriófagos han simplificado el estudio de la genética bacteriana. Existen diversidad de virus animales, cada uno de ellos presentando ADN o ARN como material genético. Una familia de virus animales, los retrovirus, contienen genoma de ARN en sus partículas virales pero sí precisan una copia de ADN de su genoma. Proporcionan un buen ejemplo de la importancia de los virus como modelos ya que los estudios de los retrovirus fueron los que demostraron la síntesis del ADN a partir de los modelos del ARN, una manera fundamental de transferencia de información genética por ahora conocida en células procariotas y eucariotas. Esto podría estar hablándonos de simbiosis en los primeros años de la creación de los mamíferos. Otros ejemplos en los que los virus animales han proporcionado modelos importantes para la investigación del huésped incluyen estudios de la replicación del ADN, transcripción, procesamiento del ARN y transporte y secreción de proteínas. Métodos como la PCR, citometría de flujo y pruebas inmunohistoquímicas, amplían este análisis.

Cabe destacar que la infección por algunos virus animales en lugar de matar a la célula huésped convierten a una célula normal en una célula cancerosa. Los estudios sobre estos virus causantes de los cánceres descritos por primera vez por Peyton Rous en 1911, no sólo han proporcionado las bases de nuestro actual conocimiento del cáncer a nivel molecular y celular sino que también han conducido al descubrimiento de muchos mecanismos moleculares que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células animales.

Virus y cáncer. Los cánceres humanos que están causados por virus incluyen al carcinoma del cervix uterino y otros cánceres anogenitales relacionados con el virus del papiloma, el cáncer de hígado relacionado a los virus de la hepatitis B y C y algunos tipos de linfomas como son el virus Epstein-Barr y el virus humano linfotrópico de células T. Juntos, estos cánceres inducidos por virus representan el 20% del total de los cánceres en el mundo. Ahora vamos a ver cómo se hacen esfuerzos a nivel mundial para estudiar mejor el virus de la hepatitis C y su relación con el hepatocarcinoma.

Virus de la hepatitis C. El virus de la hepatitis C³⁸² antes de ser identificado se denominaba virus de la hepatitis no A no B³²⁷, es un virus de RNA de 9.600 nucleótidos con sentido positivo monocatenario y lineal cuyo genoma es semejante en organización

al de los flavivirus y pestivirus y pertenece al género hepacivirus de la familia flaviviridae. El genoma del virus de la hepatitis C, un solo marco de lectura abierto de tamaño o gen que descodifica una poliproteína vírica de aproximadamente 3.000 aminoácidos, la cual es desdoblada después de la traducción para generar diez proteínas víricas. El extremo 5' del genoma consiste en una región no traducida que contiene un sitio de entrada en el ribosoma interno adyacente a los genes para cuatro proteínas estructurales, la proteína central de la nucleocápside C, dos glucoproteínas de membrana E1 y E2 y una proteína de membrana P7. La región 5' no traducida y el gen central se conservan en alto grado, entre los genotipos pero las proteínas de membrana son codificadas por la región hipervariable que varía de una cepa a otra y que permite al virus evadir la contención inmunitaria del hospedador dirigida a las proteínas de la membrana del virus que son accesibles. El extremo 3' del genoma también incluye una región no traducida que contiene los genes de seis proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5A y NS5B que tiene función de transcriptasa inversa. (Ver Figura 21).



Estructura del genoma del HCV y relación con proteínas recombinantes del ensayo inmunoenzimático (EIA) en relación con las diferentes versiones (v1.0, v2.0, v3.0)

Fuente. Dra. Elsalinda MUÑOZ ESPINOSA. *Hepatología*. México, 2007.

Figura 21

La proteasa de cisteína de NS2 desdobla NS3 a partir de NS2 y la proteasa de serina NS3-4a desdobla todas las proteínas previas a la poliproteína. Las proteínas NS importantes que intervienen en la replicación del virus incluyen la helicasa de NS3, la proteasa de serinas NS3-NS4a y la polimerasa de RNA dependiente NS5B dependiente de RNA. Dado que el virus de la hepatitis C no se replica por medio de un intermediario de DNA, no se integra en el genoma del hospedador. Puesto que el virus de la hepatitis C tiende a circular en círculos relativamente bajos de 10^3 a 10^7 viriones por mililitro sigue siendo difícil visualizar las partículas de virus que se estiman en un diámetro de 40 a 60 nanómetros. Sin embargo, la tasa de replicación del virus C es muy elevada, de 10^{12} viriones por día y su semivida es de 27 horas. El chimpancé es un modelo de animal muy útil pero de difícil manejo. Aunque se carece de un modelo de animal pequeño robusto y reproducible se ha documentado la replicación del virus de la hepatitis C en un modelo de ratón inmunodeficiente que contiene trasplantes de hígado humano y ratón transgénico y varios modelos de rata. Aunque ha sido difícil la replicación in vitro se han descrito linajes celulares derivados de carcinoma hepatocelular (sistema de replicación) que apoyan la replicación del RNA del virus C genéticamente manipulado (pero no de viriones intactos). En tiempos recientes se ha descrito la replicación completa del virus de la hepatitis C y de viriones de 55 nanómetros intactos de sistemas de cultivo celular. Datos preliminares sugieren que las ganancias del virus de la hepatitis C entran en el hepatocito a través del receptor CD81.

Por medio de secuenciación de nucleótidos se han identificado al menos seis genotipos diferentes del virus de la hepatitis C³⁸² y más de 50 subtipos que pueden llegar incluso a 100. Los genotipos difieren uno de otro en su homología de secuencia el 30% o más. Como las divergencias entre los especímenes del virus de la hepatitis C pertenecientes a un genotipo o a un subtipo y aislados en un mismo hospedador pueden no ser suficientes para definir un genotipo diferente, estas diferencias intragenotípicas se denominan cuasiespecies y difieren en su homología de secuencia tan sólo en un pequeño porcentaje. La diversidad de genotipos y cuasiespecies del virus de la hepatitis C, debido a su elevada tasa de mutación interfiere con la inmunidad humoral. Se ha demostrado la existencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la hepatitis C pero suelen ser de breve duración y no se ha probado que la infección por el virus de la hepatitis C induzca inmunidad duradera, en cuanto a la reinfección por diferentes especímenes víricos o incluso por el mismo espécimen.

Virus de la hepatitis						
	Virus de la hepatitis A	Virus de la hepatitis B	Virus de la hepatitis C	Virus de la hepatitis D	Virus de la hepatitis E	Virus de la hepatitis G*
Agente	Cápside icosaédrica, RNA monocatenario	Doble cadena de DNA con envoltura	RNA monocatenario con envoltura	RNA monocatenario con envoltura	RNA monocatenario sin envoltura	Virus RNA monocatenario
Transmisión	Fecal-oral	Parenteral; contactos íntimos	Parenteral; contactos íntimos	Parenteral; contactos íntimos	Contaminación hídrica	Parenteral
Periodo de incubación	2-6 semanas	4-26 semanas	2-26 semanas	4-7 semanas	2-8 semanas	Desconocido
Estado de portador	No	0,1-1,0% de los donantes de sangre en EE.UU. y países occidentales	0,2-1,0% de los donantes de sangre de EE.UU. y países occidentales	1-10% de los pacientes adictos y hemofílicos	Desconocido	1-2% de los donantes de sangre en EE.UU.
Hepatitis crónica	No	5-10 % de las infecciones agudas	> 50%	<5% coinfección, 80% superinfección	No	No
Carcinoma hepatocelular	no	Sí	Sí	No mayor que el VHB	Desconocido, pero poco probable	No

Fuente: SLEISENGER Y FORDTRAN. *Enfermedades gastrointestinales y hepáticas*. 2005.

Cuadro 3

Por tanto, tras la infección producida por el virus de la hepatitis C no parece que se desarrolle inmunidad heteróloga ni homóloga. Algunos genotipos del virus de la hepatitis C están presentes en todo el mundo mientras que otros muestran una mayor limitación geográfica. Además existen diferencias en los genotipos en cuanto a su capacidad de reacción a los antivíricos, sin embargo no han sido corroborados los primeros informes de diferencias en la capacidad patógena de un genotipo a otro. En España el genotipo 1b es el más frecuente.

Los inmunoanálisis de tercera generación actualmente disponibles que incorporan proteínas del núcleo NS3 y regiones NS5 detectan anticuerpos antivíricos de la hepatitis C

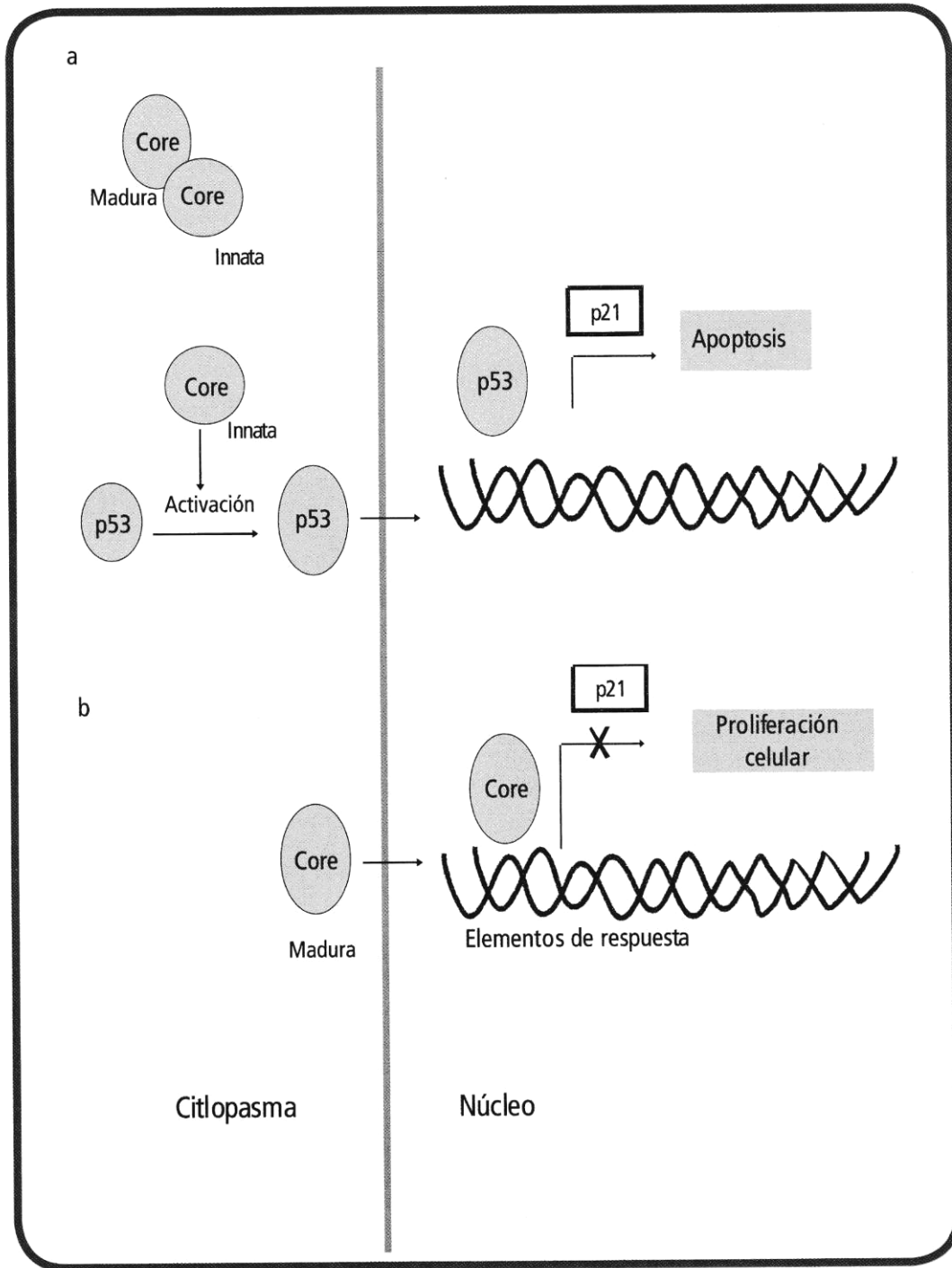
durante la infección aguda. El indicador más sensible por infección del virus de la hepatitis C es la presencia de RNA del virus de la hepatitis C que requiere amplificación molecular por medio de PCR o amplificación regulada por transcripción. Para permitir la estandarización de la cuantificación de RNA del virus de la hepatitis C en los análisis de laboratorio el RNA de la hepatitis C se notifica en unidades internacionales por mililitro; se dispone de análisis cuantitativos que permiten detectar RNA del virus de la hepatitis C con una sensibilidad de hasta cinco unidades internacionales por mililitro. El RNA del virus de la hepatitis C se puede detectar al cabo de pocos días de haber sufrido la exposición al virus mucho antes de que aparezca el HCV o antígeno de la hepatitis C, y tiende a persistir mientras dure la infección por el HCV. Sin embargo, en los pacientes con infección crónica³⁵⁷ por HCV es posible que el RNA del HCV se detecte sólo de manera intermitente. La utilización de sondas moleculares sensibles para el RNA del HCV ha puesto de manifiesto la existencia del HCV con actividad multiplicativa en los linfocitos de la sangre periférica de personas infectadas; sin embargo igual que ocurre con la presencia del HBV en los linfocitos, se ignora la trascendencia clínica de la infección linfocítica por el virus de la hepatitis C. (*Ver Cuadro 3*).

Mecanismos moleculares de la hepatocarcinogénesis. Desde el punto de vista epidemiológico la hepatocarcinogénesis está ligada al daño crónico del hígado; ya que se ha demostrado, sobre todo en nuestros países occidentales, que el hepatocarcinoma está asociado en más de un 50% a casos de cirrosis y hepatitis crónica activa, pero sobre todo muy asociado a la cirrosis. Una de las explicaciones para esta relación es que el cáncer se desarrolla en un hígado donde existe un aumento de la división celular y es donde puede existir una transformación celular. Esto se ha podido demostrar también en forma experimental con ratones donde se les ha hecho una hepatectomía y se ha acelerado la división celular. Esto hace que haya errores de replicación como mecanismo de hepatocarcinogénesis. En los hepatocarcinomas se ha encontrado una alta prevalencia de alteraciones en el número y en la forma de los cromosomas y además translocaciones.^{178,179} La entidad hepática crónica más asociada con el hepatocarcinoma, como hemos dicho, es la cirrosis que se desarrolla entre 20 y 40 años después de sufrir una enfermedad crónica del hígado.¹⁶¹ El riesgo de desarrollar hepatocarcinoma se inicia desde la infección crónica del hígado por el virus pero se incrementa en el estado de cirrosis. Entonces, estudiando los pacientes con cirrosis, estudiando los hígados cirróticos

podemos dilucidar los mecanismos moleculares del desarrollo del cáncer hepático. Los mecanismos moleculares son varios; hay tres mecanismos básicos que pueden acelerar la carcinogénesis en el estado de cirrosis. Hay que recordar que en el estado de cirrosis hay una proliferación celular mantenida a través del tiempo pero cuando la cirrosis aparece esta proliferación de los hepatocitos disminuye francamente y la capacidad replicativa de los mismos es muy baja. Esto puede tener relación con estos mecanismos básicos, que son el acortamiento del telómero y por lo tanto la limitación de la reserva regenerativa de la célula hepática y de la inestabilidad cromosómica. Esto va a tener importancia porque nos indicaría que esta célula tiene que ser "salvada", y cómo el hígado "salva" esta célula. Este es el mecanismo que se conoce menos y que después vamos a plantear una teoría. La disfunción telomérica activa la reparación del DNA¹⁴⁵ por unas vías que pueden introducir fusión cromosómica, y esto conlleva a un problema de translocación de las células. Esto podría conllevar a que la célula se torne más inestable desde el punto de vista cromosómico y pueda dar los pasos iniciales en el desarrollo de una célula cancerosa. Se ha visto que en el hepatocarcinoma las células tienen un acortamiento crítico de los telómeros y además tienen aneuploidía.

El segundo factor es la disminución de la proliferación hepatocitaria. La disminución de la proliferación del hepatocito nos lleva a la formación del cáncer en la cirrosis. En concordancia con esta teoría hemos visto experimentos que inhiben la proliferación hepatocitaria por medio de sustancias carcinogénicas. Con respecto al tercer factor, hay una alteración del medio en que la célula hepática crece y se desarrolla. Entonces hay una alteración del micro y del macroambiente y van a llegar señalizaciones locales y señalizaciones sistémicas que pueden incrementar el riesgo de cáncer en el estado de cirrosis. Esto podríamos relacionarlo fundamentalmente con el virus de la hepatitis C donde hemos observado un estrés oxidativo severo en el estado de cirrosis propiciado por la replicación del virus, la reacción linfocítica con señalización de una gran cantidad de sustancias y la operación de otros sistemas que pueden hacer que se desacelere la formación del cáncer de hígado. Hay que recordar que esta respuesta inflamatoria de las células inmunes va a descargar sustancias que producen daño celular. Por otro lado debemos analizar que también existen señalizaciones que pueden estar inhibidas; entonces hablamos de los genes supresores de tumores que pueden estar lesionados por una mutación como en el caso del P-53 y también oncogenes que han

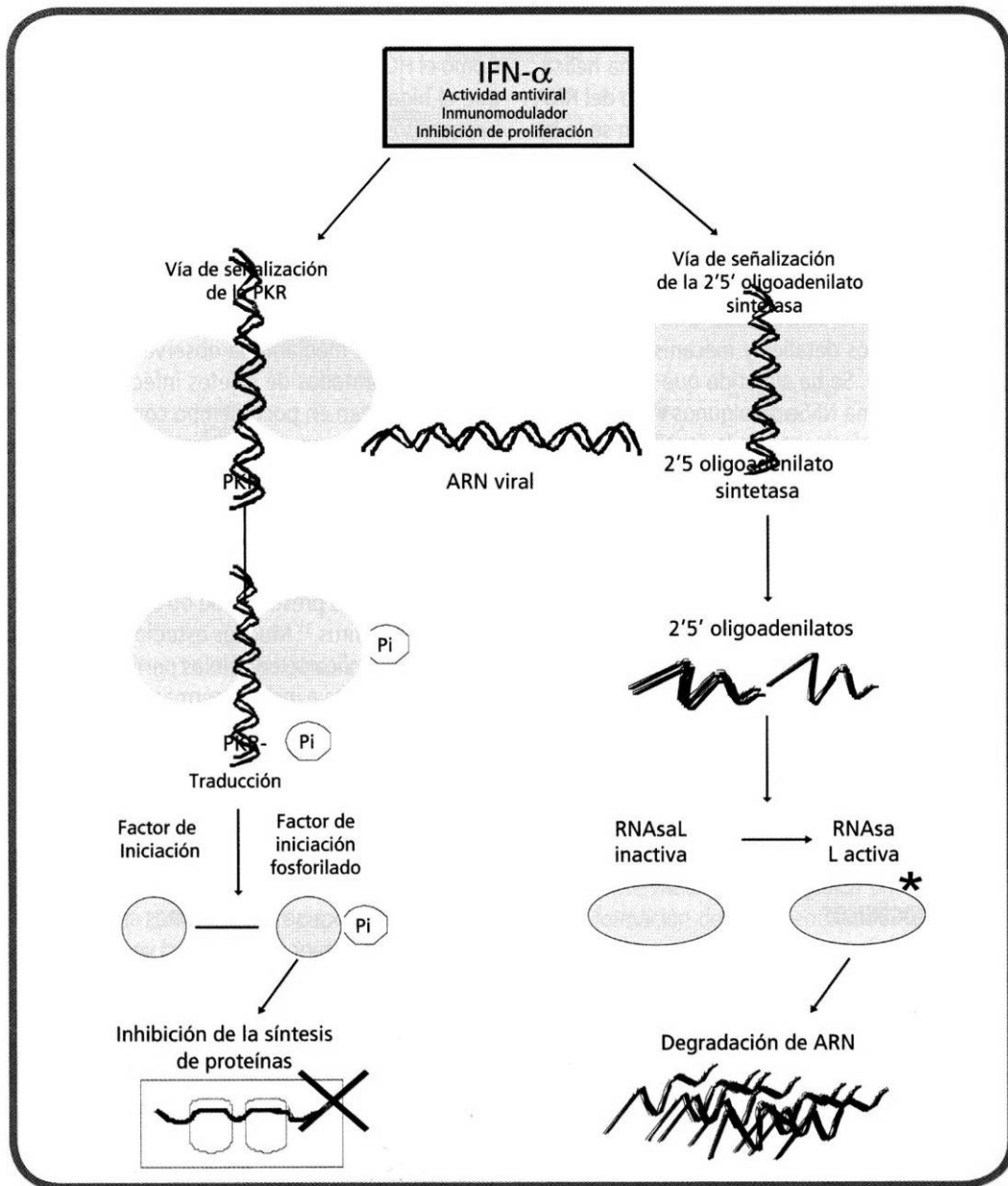
resultado ser vías que por un lado estimulan el desarrollo del tumor y por el otro lado evitan su eliminación. (Ver Figuras 22 y 23).



Posible modelo de la interacción de la proteína central del HCV y la proteína p53.

Fuente. Dra. Elsalinda MUÑOZ ESPINOSA. *Hepatología*. México, 2007.

Figura 22



Principales actividades y vías de señalización que desencadena el IFN- α .

Fuente. Dra. Elsalinda MUÑOZ ESPINOSA. *Hepatología*. México, 2007.

Figura 23

Por tanto, tenemos un microambiente de activación de las células inflamatorias. Hay también una pérdida de la masa hepática y una producción de metabolitos dentro del estrés oxidativo; hay estímulos que hacen proliferar estas células dañadas por un lado pero al mismo tiempo la célula hepatocitaria o hepatocito maduro se encuentra

inhabilitado para replicarse como se replicaba antes del estado de cirrosis. La inestabilidad cromosómica asociada a la disfunción del telómero nos va a llevar a cierta selección de clones malignos de células hepáticas. Aquí es donde nosotros planteamos la posibilidad de algo importante que no es solamente señalar las vías oncogénicas de activación y la desactivación de los genes supresores. Podríamos hablar de la vía del P-27, del ARF, del TGF β , del RB, del P-16, del MDM2, pero sin embargo siempre nos quedará un sinsabor porque nada explica esto en forma completa. Nosotros creemos que primero es la formación de la telomerasa y luego el tumor.⁴⁰⁶ O sea, que tiene que haber algún mecanismo responsable para poder unir una célula hepatocitaria moribunda y una célula madre hepática que tiene una señalización muy diferente pero que está siendo encaminada a una célula precursora¹⁷¹ o una célula oval que en algún momento de la historia natural de la enfermedad cirrótica y por estímulos virales, en este caso del virus de la hepatitis C, va a tender a fusionarse con el hepatocito maduro que está senescente, que está moribundo. De esta fusión celular va a aparecer una nueva célula, que va a tener características de una célula madre o precursora y características de una célula hepatocitaria madura. En este momento, las condiciones químicas, inmunológicas y de señalización son propicias para activar y desactivar oncogenes y genes supresores, y por lo tanto vamos a encontrar cierto desarrollo de ciertas vías, como el *prickle1*, la vía de la *w β catenina*, el *hedgehog*, el *met* y la producción de la telomerasa (*Ver Figura 24*), que estaba completamente suprimida en el hepatocito maduro como es usual, ya que el hepatocito maduro aunque esté en una fase replicativa no tiene por qué producir telomerasa, y en este momento se va a producir mucha telomerasa ya que existen condiciones para la proliferación de esta nueva célula, que es una célula funcional, una célula en la cual hay elementos de la célula madre hepática⁴⁰⁷ o precursora y hay elementos del hepatocito que ha sido lesionado. Entonces se dan todas las condiciones para que esta célula haga lo que se llama un escape apoptótico de una célula francamente displásica, francamente anaplásica, que va a producir el desarrollo de la célula tumoral hepática⁵; sobre todo aquí vienen a converger otras vías oncogénicas como la *micmyc*, la *p13k/acate* y el *petn*. Por lo tanto nosotros lo que planteamos es que se produce una nueva célula por fusión celular, que es una célula que la vamos a llamar célula oncomutagénica hepática por fusión celular. Obviamente esta es una célula inmortal y va a reproducirse aceleradamente desarrollando el cáncer de hígado o hepatocarcinoma.

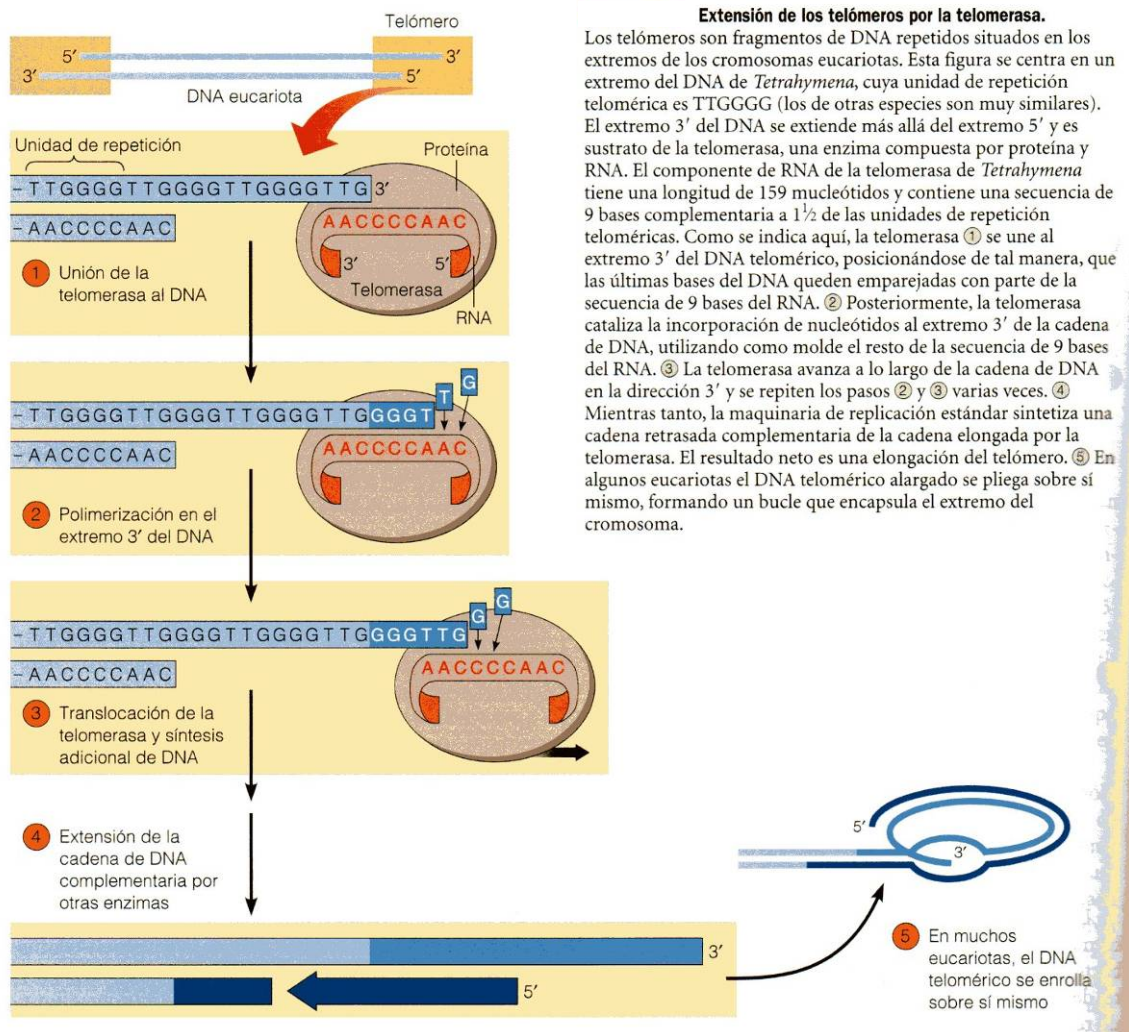


Figura 24

Fuente. Lodish et al. Biología Celular y Molecular. E.M. Panamericana. 5ª Edición.

En síntesis, la fisiopatología de la hepatocarcinogénesis del hepatocarcinoma está ligada intensamente a la evolución de la cirrosis. Hay varios mecanismos en los cuales la cirrosis parece acelerar la formación del cáncer, como dijimos, la disfunción telomérica que induce inestabilidad cromosómica y los factores de crecimiento celular que pueden estar inhibidos para la proliferación del hepatocito, y tercero, alteraciones en el micro y macroambiente que estimula la proliferación celular. El poder dilucidar los diversos mecanismos por los cuales se producen estos cambios nos ayudará fundamentalmente en tratamientos más eficaces para el control del hepatocarcinoma.

La célula de fusión celular que se ha creado, la llamaremos célula simbiooncomutagénica hepática. Es una célula con una capacidad multipotencial que puede generar nuevos vasos llamados de neoformación tumoral y además evolucionar en el hepatocarcinoma, ya que las células inmunocompetentes están deprimidas, probablemente por mutación de la telomerasa y daños en su genoma. Estamos ante la evidencia de una inmunovigilancia deprimida y por tanto el tumor puede desarrollarse a sus anchas.

ESTUDIO CLÍNICO E INMUNOHISTOPATOLÓGICO

1.- PLANTEAMIENTO.

El hepatocito se infecta con el virus de la hepatitis C y se produce una nueva célula heopaticaria al fundirse éste con la célula madre hepática o con la célula precursora hepática. La denominaremos: célula simbiooncomutagénica hepática, la cual luego de reproducirse aceleradamente por el influjo viral y en un contexto anatomopatológico de fibrosis inflamatoria, que puede corresponder a hepatitis crónica o a cirrosis, la misma presenta escape apoptósico y al salvar la apoptosis se sigue reproduciendo gracias a que las células inmunes también presentan agotamiento celular. Al activarse las vías oncogénicas y del desarrollo tumoral respectivamente se produce una catástrofe simbiooncomutagénica. Esta nueva célula bajo el constante influjo de marcadores de superficie y producción exagerada de telomerasa desembocan en la producción o génesis del hepatocarcinoma y células madre acompañantes que derivan en células con capacidad de desarrollo en tejidos aberrantes incluyendo vasos de neoformación para el crecimiento tumoral y más adelante el desarrollo de metástasis. Telomerasa y telómeros tumorales alcanzan la inmortalidad del hepatocarcinoma.

2.- HIPÓTESIS.

En condiciones normales, la mayoría de nuestras células suprimen la actividad de una enzima realmente revolucionaria: la telomerasa, la cual restaura la secuencia de nucleótidos del telómero. Esta secuencia es TTAGGG. Está compuesta de dos subunidades, la transcriptasa reversa de telomerasa (tert) y la subunidad proteica catalítica (terc).

La telomerasa es la máquina del tiempo pero con dos túneles del campo unificado en un solo plano: la inmortalidad. El primer túnel es la vida como la conocemos. El

segundo túnel es la neoplasia (muerte humana). Las células fetales, embrionarias y germinales, así como las neoplásicas expresan telomerasa. Recientes investigaciones muestran la importancia relevante entre telomerasa y cáncer, células madre, envejecimiento y síndromes hereditarios. ¿Es una relación causa-efecto? Nuestra hipótesis es que sí. Primero la telomerasa y luego el tumor en nuestro modelo biomédico de hepatitis crónica y cirrosis hepática asociada a virus C con posterior evolución a hepatocarcinoma.

3.- OBJETIVOS.

La novedad, como aportación general y original de nuestro grupo investigador, es demostrar que células ni embrionarias, ni fetales, ni germinales, que están infectadas por el virus de la hepatitis C inician expresión de telomerasa, sin ser neoplásicas en sus estadios de hepatitis crónica y cirrosis. Con lo cual profundizamos en la dinámica molecular de la etiopatogenia del cáncer así como en el diagnóstico precoz del mismo en fase de preneoplasia. Desde 1995⁴⁰⁵ muchos estudios van orientados hacia este fin, concatenar la teoría de una inmunovigilancia deprimida asociada a un factor oncogénico definido, el virus, y la telomerasa como eslabón perdido produciendo una catástrofe simbioconmutagénica, el hepatocarcinoma.

La perspectiva terapéutica que se nos abre sería la inhibición de la telomerasa en fase preneoplásica de hepatitis crónica y cirrosis virales para evitar la evolución a hepatocarcinoma.

Por lo tanto, medición de la actividad inmunohistoquímica de la telomerasa en biopsias hepáticas¹⁸⁷ de pacientes con diagnóstico de hepatitis crónica o cirrosis hepática por virus de la hepatitis C y su relación con el hepatocarcinoma en general. La variable predictora será la telomerasa y el estándar áureo de referencia el hepatocarcinoma como variable dependiente. También se analizarán: la p-53 y la caspasa 3 de la vía apoptótica, y la alfa-fetoproteína por pruebas inmunohistoquímicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- ESTUDIO CLÍNICO E INMUNOHISTOPATOLÓGICO.

1.1.- Material. Características de los pacientes y sus muestras para biopsia hepática.

Nuestros pacientes se toman del Servicio de Digestivo y Endoscopia y sus respectivas muestras de biopsia hepática del Servicio de Anatomía Patológica, del Hospital Universitario de Salamanca. Se revisan los archivos computadorizados encontrándose 1.768 biopsias hepáticas, recolectadas del primero de diciembre de 1997 al 30 de noviembre de 2007. Para nuestro estudio hemos tomado únicamente 14 biopsias por cirrosis hepática asociada al VHC y 31 biopsias por hepatitis crónica por VHC; además 29 biopsias con el diagnóstico de hepatocarcinoma de diversa etiología. Se excluyen todos los casos asociados a los virus VHB de la hepatitis B y VIH de la inmunodeficiencia humana.

1.2.- Métodos.

1.2.a- Determinaciones inmunohistoquímicas de las muestras para biopsia hepática.

Hemos ido a buscar los bloques de parafina de cada uno de nuestros pacientes en el archivo correspondiente y los hemos localizado todos. Procedimos entonces a llevar las muestras al departamento de inmunohistoquímica del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca e iniciamos un protocolo para la debida obtención de las muestras inmunohistoquímicas, para lo cual existe un protocolo general y específico dependiendo de cada uno de los análisis que se hagan. Lo importante en esto es lo siguiente: se toman los bloques de las parafinas y se dejan en refrigeración por lo menos 24 horas; posteriormente se hacen cortes de cuatro micrómetros y se dejan en una estufa por 24 horas. Más tarde viene el paso del desparafinado y esto se trabaja con un polímero. Luego se procede a llevar la muestra al inmunoteñidor automático de marca Vision Bio Systems, distribuido por Menarini. Antes de poner las muestras en el

inmunoteñidor nosotros clasificamos cada uno de los casos en el ordenador y le ponemos el análisis inmunohistoquímico, por ejemplo: p-53, alfaproteína, caspasa 3 o telomerasa, y se ordenan las muestras que se van a analizar. Esto trabaja a temperatura ambiente y se le aplica una recuperación de antígeno de 15 minutos. Posteriormente se recupera a 100° C. El recuperador de antígenos es el Hier (15 minutos) con ERI; luego viene un programa importante para esta muestra ya que para cada uno de los anticuerpos se efectuaron protocolos distintos y personalizados hasta poner la puesta en evidencia de los antígenos de una manera que se expone a continuación. Una vez procesada la muestra mediante el aparato Vision Bio Systems se efectúan los desmascaramientos antigénicos distintos para cada uno de los anticuerpos hasta obtener el mejor resultado. Se trataron los siguientes: en este caso usamos un desperoxidante con peróxido de hidrógeno para quitar la peroxidasa (3% por 15 minutos con peroxidasa de hidrógeno); segundo, se licúa el antígeno primario por 15 minutos; posteriormente se hace un análisis postprimario con bloqueante de proteínas por 8 minutos y luego se aplica nuevamente un polímero por 8 minutos que es para la unión de enlaces de peroxidasa para la diaminobencidina. La diaminobencidina se aplica 10 minutos seguida una de la otra 5 minutos cada vez. Posteriormente se aplica la hematoxilina por contraste por 7 minutos y luego la laminilla se deshidrata en alcoholes fuera de la máquina y se monta con xilol en forma permanente. Posteriormente, cada una de las determinaciones tendrá su sistema especial y las diluciones respectivas:

A) En primer lugar, telomerasa, que es la telomerasa monoclonal de conejo (G182) (AB32020). Es una sustancia llamada péptido sintético correspondiente a los residuos en C terminal de la telomerasa humana que es una transcriptasa inversa. La casa es la ABCAM. Reacciona con tejido humano, no reacciona ni con ratones ni con ratas ni otras especies. Las aplicaciones son: para citometría de flujo y para inmunohistoquímica. En nuestro caso haremos una dilución de 1 sobre 100. Se hace un control positivo con lisado de células HELA y otro control con adenocarcinoma de pulmón humano. Localización celular: en el núcleo. Relevancia: ya sabemos que tiene que ver la telomerasa con la inmortalidad celular y por ello es la responsable de adicionar o de sumar nucleótidos, en este caso TTAGGG a las partes terminales de los télómeros de cada cromosoma. Clonalidad: monoclonal; número de clon G182 y

subtipo inmunoglobulina G. Forma líquida; debe guardarse a 4° C. La coloración va a ser marrón.

B) Proteína p-53. Esta proteína es el DO-7. Es el anticuerpo monoclonal murino para uso diagnóstico. Principio de procedimiento: las técnicas de tensión inmunohistoquímica permiten la visualización de los antígenos mediante la aplicación secuencial de unos anticuerpos específicos, llamados anticuerpos primarios, dirigidos contra los antígenos y un complejo enzimático con un sustrato cromogénico, con pasos de lavado intercalados. La activación enzimática del cromógeno produce una reacción visible en el sitio del antígeno, luego se puede contrateñir la muestra y cogerla con un cubreobjeto. Los resultados se interpretan tomando el microscopio óptico y ayudan al diagnóstico diferencial de los procesos fisiopatológicos que pueden estar o no vinculados a un determinado antígeno. El clon es el DO-7, proteína P-53 recombinante humana tipo silvestre. Especificidad, proteína P-53 humana silvestre y en sus formas mutadas, tanto a condiciones desnaturalizantes como no desnaturalizantes. Composición del reactivo, RPU P-53 0'7 es un líquido de cultivo tisular de suero de caballo al 5% en PBS. Concentración total de proteína, 1 a 8 gr por litro, (ver etiqueta). Clase de IgG2b inmunoglobulina, recomendaciones de uso inmunohistoquímica en secciones de parafina. Almacenamiento entre 2 y 8° C. La coloración va a ser marrón, y se realiza bajo una dilución de 1 en 100. Para observar el control tisular debe verificarse al microscopio óptico y la técnica nos dice que se localiza en el núcleo celular, igual que la telomerasa.

C) La alfafetoproteína (A008 lote 032). La alfafetoproteína es una fracción de inmunoglobulina purificada de conejo de la empresa Dako anti alfa1fetoproteína humana en suero de conejo. La concentración es 2'2 gr por litro. El inmunógeno es la alfa1fetoproteína aislada de cordón umbilical humano. La especificidad es para humanos, y se realiza bajo una dilución de 1 en 300. La aplicación se puede utilizar en técnicas de inmunoprecipitación en RIA y en inmunohistoquímica y se debe de guardar entre 2 y 80° C, y debe ser policlonal. Para visualizarlo lo haríamos en el microscopio óptico y encontraríamos la alfafetoproteína de un color café en el citoplasma.

D) Caspasa-3. Es un anticuerpo monoclonal de ratón que se usa exclusivamente para investigación. Es una proteína llamada cisteína que es un miembro de la interleucina 1 β de la enzima conversora. El clon es HBJM62; tipo de inmunoglobulina IgG1. Se deriva del mieloma del ratón. La preparación es liofilizada entre cultivo de tejidos. Se usa en inmunohistoquímica con los controles y procedimientos ya descritos en forma general. Se va a observar fundamentalmente en el citoplasma una coloración marrón. Está producida por Novocastra Laboratorios S.L.

1.2.b- Microscopía óptica.

Se hace la revisión de las laminillas de las muestras para biopsia hepática de todos nuestros casos, con técnicas para tinciones de hematoxilina eosina, tricómico de Masson, reticulina de Wilder, hierro y PAS-diestasa. Se revisan todas las laminillas procesadas para las cuatro pruebas histoquímicas, buscando el color marrón en el núcleo (p-53 y telomerasa) y en el citoplasma (caspasa-3 y alfa-fetoproteína), dando una calificación cualitativa de la actividad.

2.- METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realiza un estudio transversal analítico descriptivo para determinar una variable como factor diagnóstico, pronóstico y de riesgo, para el desarrollo de hepatocarcinoma, que es el estándar áureo de referencia. Se analizará la prevalencia y distribución de variables categóricas ordinales.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS Y ESTADÍSTICOS.

Los resultados del análisis epidemiológico y bioestadística de la hepatitis crónica y cirrosis asociadas al virus de hepatitis C y su relación con el hepatocarcinoma, se obtuvieron de la información digital estudiada del 1 de diciembre del año 1997 al 30 de noviembre del 2007, en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca. En este periodo se practican 1768 biopsias hepáticas en los Servicios de Digestivo y Cirugía General. De este universo: 364 biopsias corresponden a hepatitis crónica de diversa etiología y de éstas, a su vez, 126 corresponden a casos de hepatitis crónica por virus de hepatitis C, (*Ver Figura 1*). De éstas, la distribución de géneros ubica 68% en hombres y 32% en mujeres, (*Ver Figura 2*). Se toman 31 casos al azar (para estudio histoquímico) a través de ordenador.

La cirrosis hepática a virus C con 14 casos corresponde a 0,79% del universo de 1768 biopsias, (*Ver Figura 3*). La distribución por género determina 79% hombres y 21% mujeres, (*Ver Figura 4*).

La media aritmética de distribución por edades de los pacientes con cirrosis HCV es de 45'2 años, (*Ver Figura 5*).

De 112 cirrosis de diversa etiología, el 13% corresponden a cirrosis por virus de la hepatitis C, (*Ver Figura 6*).

Con 29 casos, el hepatocarcinoma, de etiología variada, presenta una frecuencia por intervalos de edad, (*Ver Figura 7*), con una media aritmética de edad de 67'9 años, (*Ver Figura 8*).

El hepatocarcinoma representa el 1,64% del total de biopsias hepáticas, (*Ver Figura 9*).

Es claro y evidente el predominio del género masculino en nuestros tres grupos de estudio, (*Ver Figura 10*), y del hepatocarcinoma en particular, (*Ver figura 11*).

Figura 1. Diagrama de sectores hepatitis crónica HVC y por otras causas.

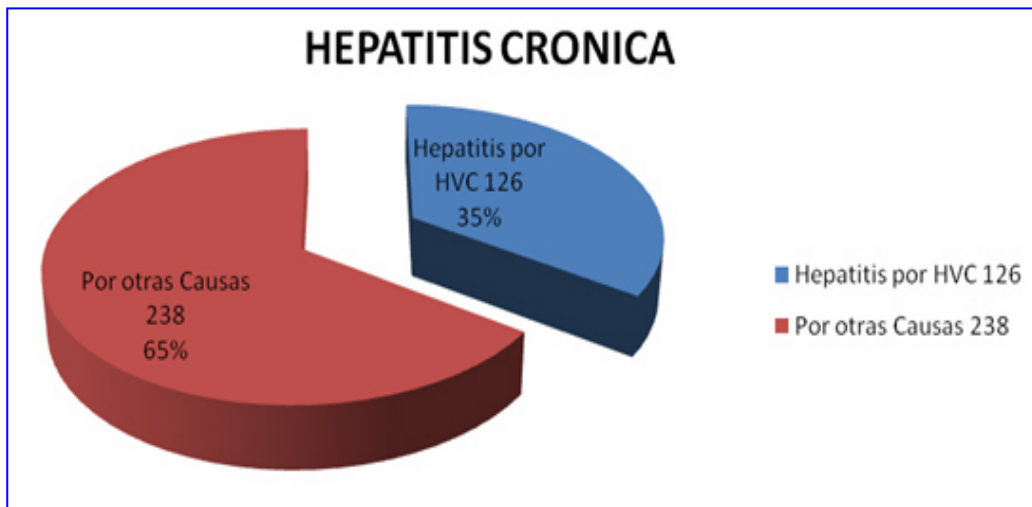


Figura 2. Diagrama de sectores por frecuencia de género.

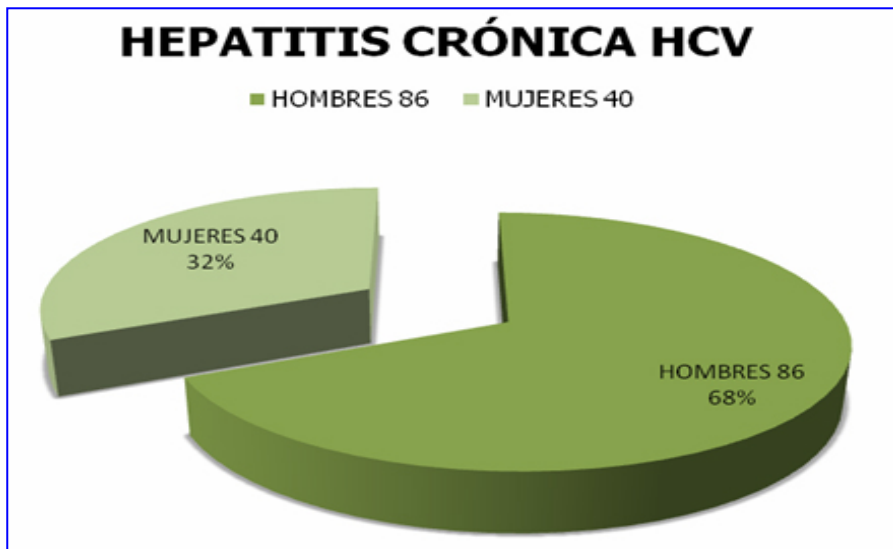
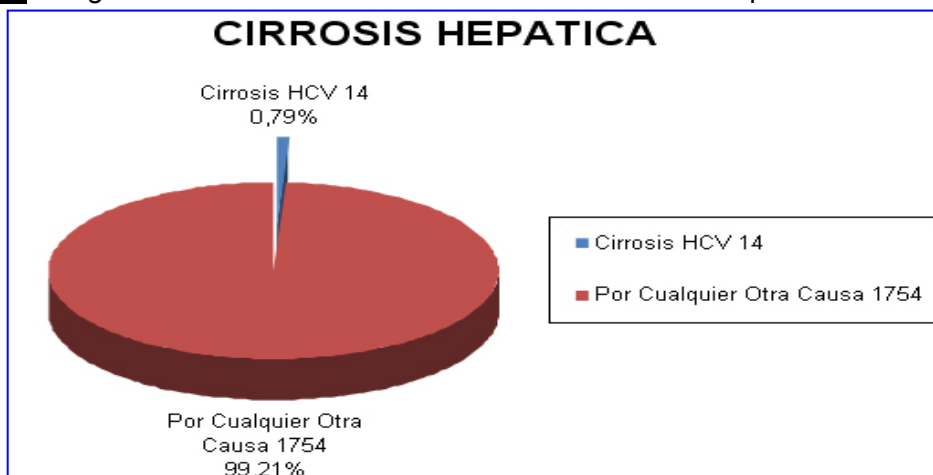


Figura 3. Diagrama de sectores cirrosis HVC en universo de biopsias.



Fuente: Bioestadística del Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Salamanca. Dic 1997-Nov 2007.

Figura 4. Diagrama de sectores por frecuencia de género.

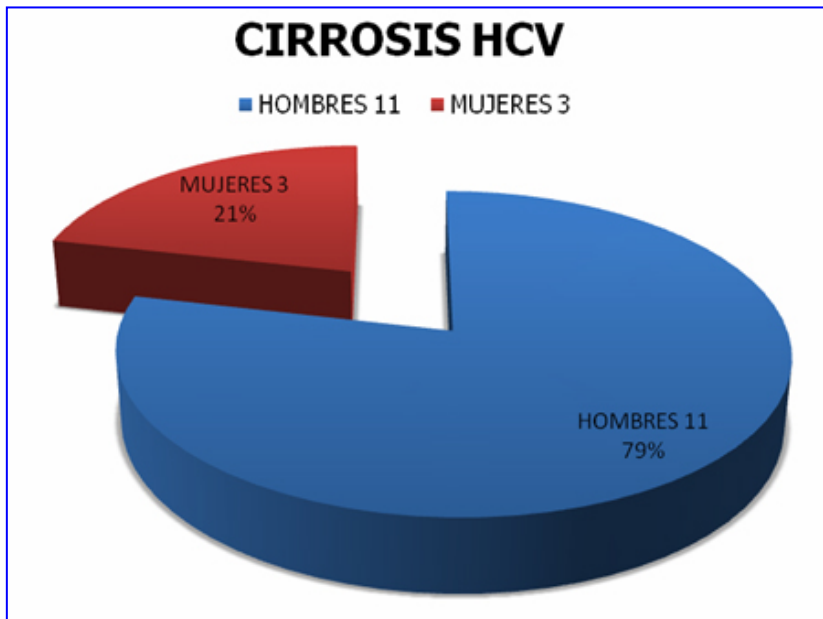


Figura 5. Media aritmética de distribución de edades por cirrosis HCV.

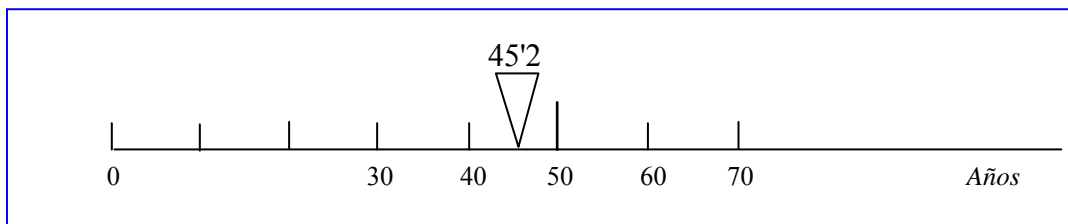
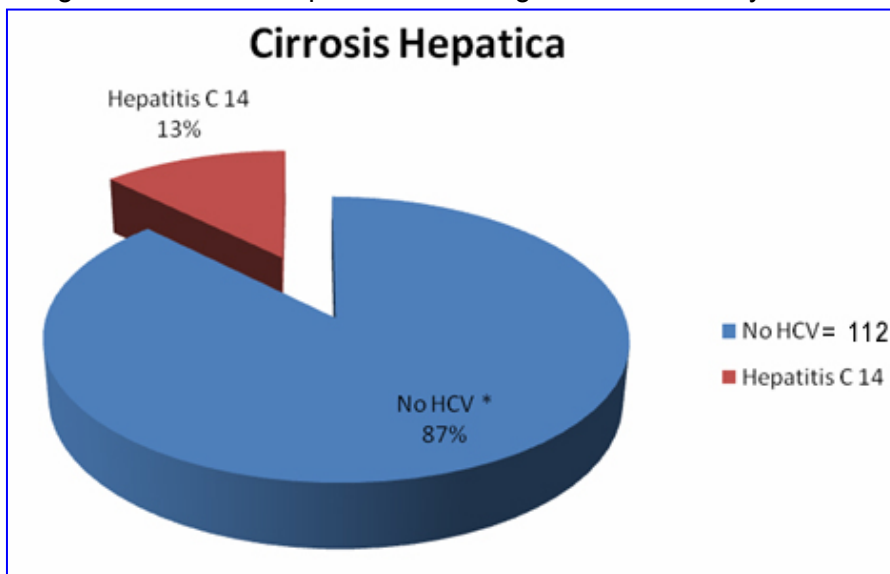


Figura 6. Diagrama de sectores por causa etiológica en cirrosis C y no HCV.



Fuente: Bioestadística del Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Salamanca. Dic 1997-Nov 2007.

Figura 7. Diagrama de sectores de frecuencia por intervalos de edad.

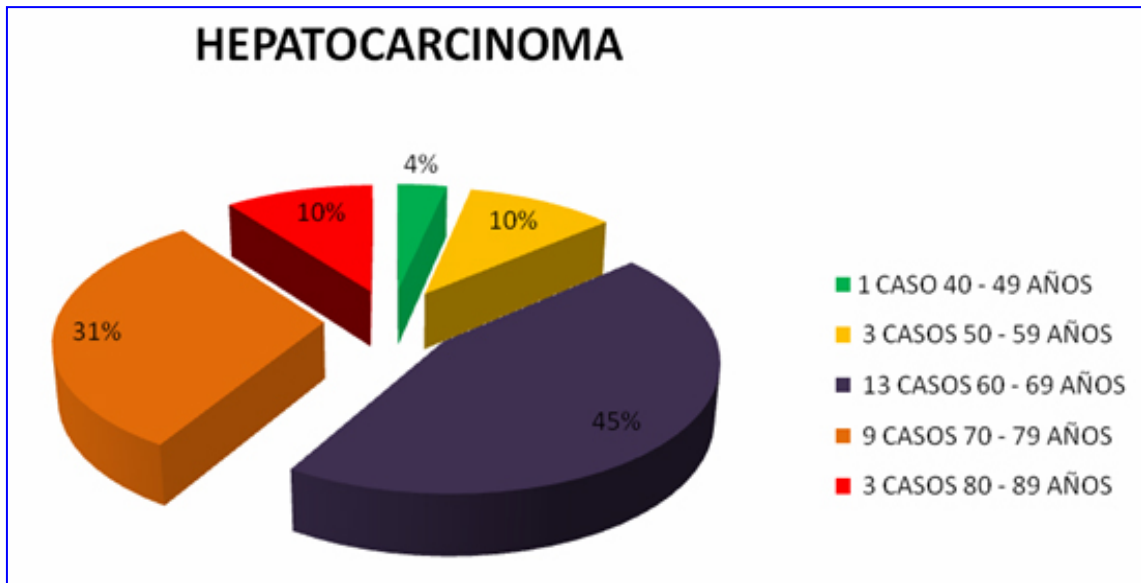


Figura 8. Media aritmética de distribución de edades por hepatocarcinoma.

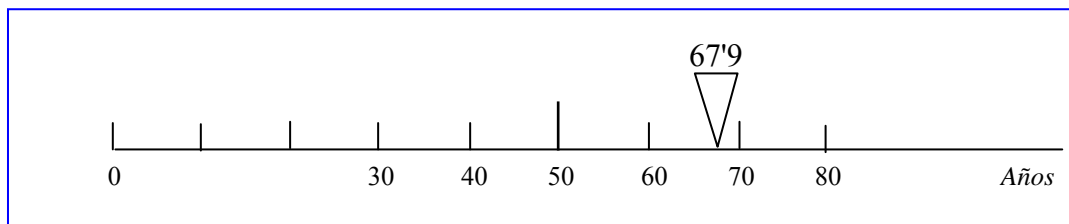
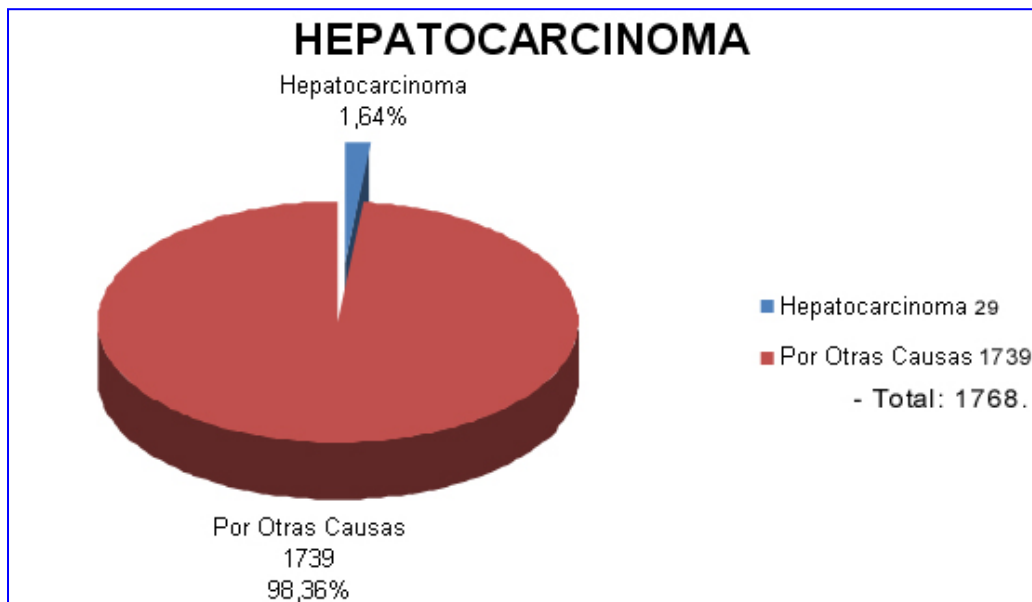


Figura 9. Biopsias hepáticas por hepatocarcinoma y otras causas.



Fuente: Bioestadística del Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Salamanca. Dic 1997-Nov 2007.

Figura 10. Diagrama de barras de frecuencia de género según grupos.

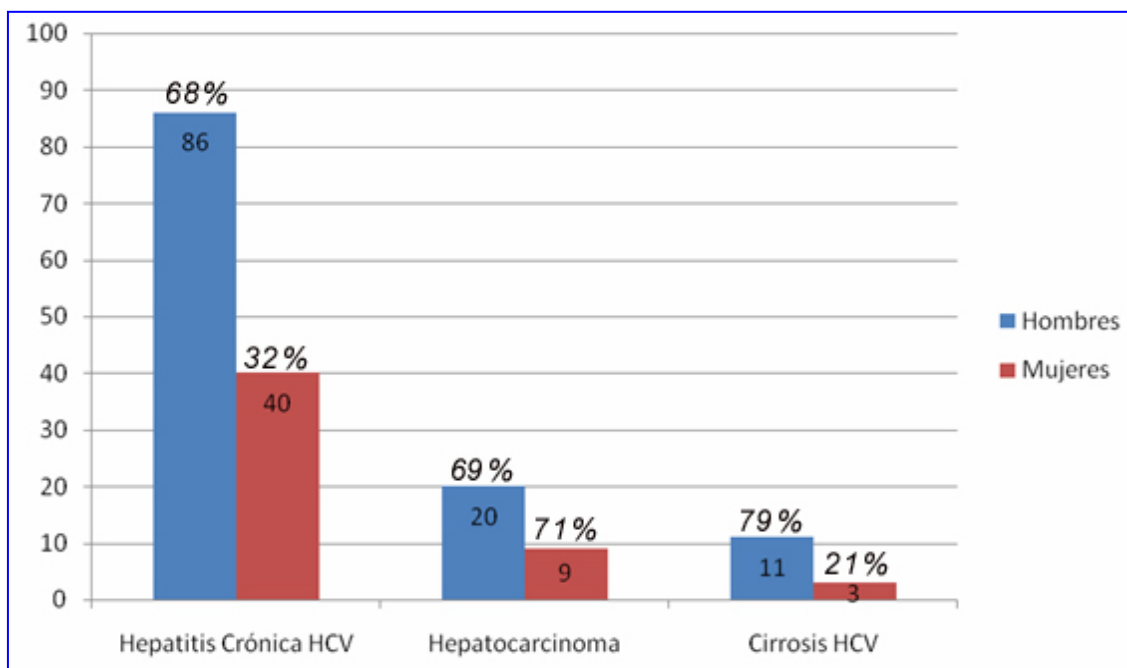
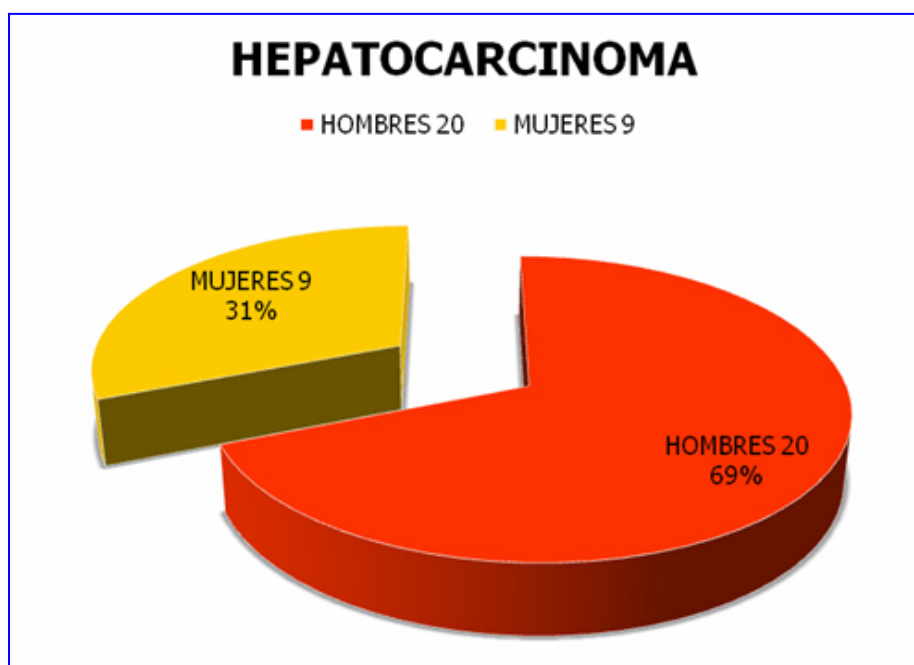


Figura 11. Diagrama de sectores por frecuencia de género.



Fuente: Bioestadística del Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Salamanca. Dic 1997-Nov 2007.

2.- RESULTADOS DE LAS PRUEBAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DE LAS BIOPSIAS HEPÁTICAS.

Se realizan cuatro pruebas inmunohistoquímicas: telomerasa, p-53, alfafetoproteína y caspasa-3 a tres grupos de pacientes, denominados hepatocarcinoma, cirrosis VHC y hepatitis crónica VHC, en muestras de biopsia hepática.

Se estudian 29 hepatocarcinomas, encontrando la telomerasa negativa en el 100% de los casos. La p-53 es positiva en 12 pacientes, para una positividad del 41%. La alfafetoproteína presenta positividad en 18 pacientes, para un 62% de los casos. La caspasa-3 presenta 20 casos, para una positividad del 69%. (*Ver Tabla 2.1*).

Se analizan 14 casos de cirrosis VHC, encontrando la telomerasa 100% negativa; la p-53 tiene 4 casos positivos, para un 29% de positividad. La alfafetoproteína es negativa en el 100% de los casos; la caspasa-3 es positiva en 1 caso, para un 7% del total de casos. (*Ver Tabla 2.2*).

De los 31 casos de hepatitis VHC encontramos 100% negativa la telomerasa; 97,5% negativo el p-53; 97,5% negativo la alfafetoproteína, y 97,5% negativa la caspasa-3. (*Ver Tabla 2.3*).

HOJA TABULACIÓN HEPATOCARCINOMAS

Tabla 2.1

SEXO	EDAD	AFP	CASPASA-3	TELOMERASA	P-53
H	69	-	+	-	-
H	82	+	++	-	+
M	64	-	-	-	-
H	70	+	++	-	-
H	82	-	+	-	-
M	71	-	-	-	-
M	51	-	+	-	-
H	62	+	+	-	+
M	73	+	-	-	-
H	67	++	+	-	-
M	81	+	+	-	+
H	68	++	-	-	+
H	65	-	+	-	-
H	66	-	+	-	+
H	48	+	-	-	+
H	70	-	+	-	-
M	53	+	+	-	+
M	69	+	-	-	-
H	62	+	+	-	+
H	65	+	+	-	+
H	67	-	+	-	-
H	75	-	+	-	-
H	75	+	+	-	-
H	64	+	-	-	-
H	77	+	+	-	-
H	65	+	-	-	+
H	77	+	+	-	-
M	55	+	-	-	-
M	76	-	+	-	+

Actividad: LEVE: + ; MODERADA:++ ; INACTIVA:- .

Fuente. Muestras de biopsia del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca. Dic 1997 - Nov 2007.

HOJA TABULACIÓN CIRROSIS HCV*Tabla 2.2*

SEXO	EDAD	AFP	CASPASA-3	TELOMERASA	P-53
H	42	-	-	-	+
H	35	-	-	-	+
M	62	-	-	-	-
H	39	-	-	-	-
M	50	-	-	-	-
H	43	-	-	-	-
H	41	-	-	-	+
H	43	-	+	-	-
H	69	-	-	-	-
H	39	-	-	-	+
H	49	-	-	-	-
M	44	-	-	-	-
H	47	-	-	-	-
H	37	-	-	-	-

Actividad: LEVE: + ; INACTIVA:- .

Fuente. Muestras de biopsia del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca. Dic 1997 - Nov 2007.

HOJA TABULACIÓN HEPATITIS CRÓNICA HCV

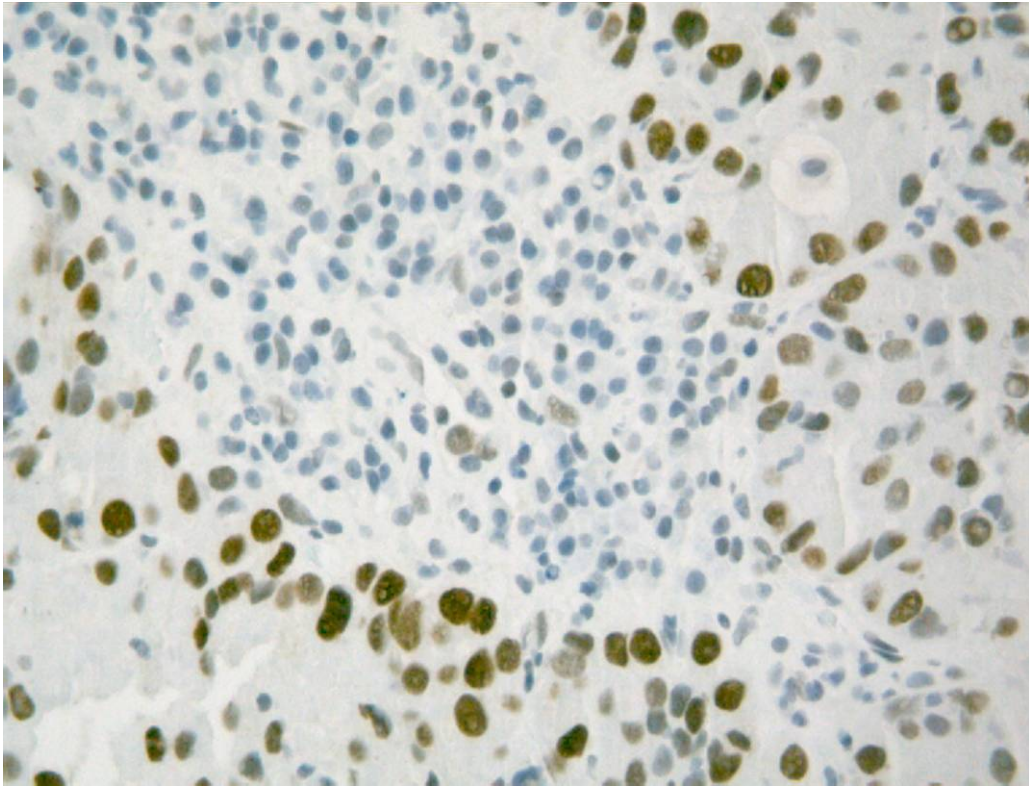
Tabla 2.3

SEXO	EDAD	AFP	CASPASA-3	TELOMERASA	P-53
M	64	-	-	-	-
H	25	+	-	-	-
H	27	-	-	-	-
H	38	-	-	-	-
H	29	-	-	-	-
M	65	-	-	-	-
H	58	-	-	-	-
M	35	-	-	-	-
H	55	-	-	-	-
H	31	-	-	-	-
H	43	-	+	-	-
H	37	-	-	-	-
H	30	-	-	-	-
H	43	-	-	-	-
M	61	-	-	-	-
H	26	-	-	-	-
M	44	-	-	-	-
H	51	-	-	-	-
H	28	-	-	-	-
M	52	-	-	-	-
M	41	-	-	-	-
H	60	-	-	-	-
H		-	-	-	-
H	45	-	-	-	+
H	26	-	-	-	-
H	31	-	-	-	-
M	60	-	-	-	-
H	36	-	-	-	-
H	25	-	-	-	-
M	44	-	-	-	-
H	65	-	-	-	-

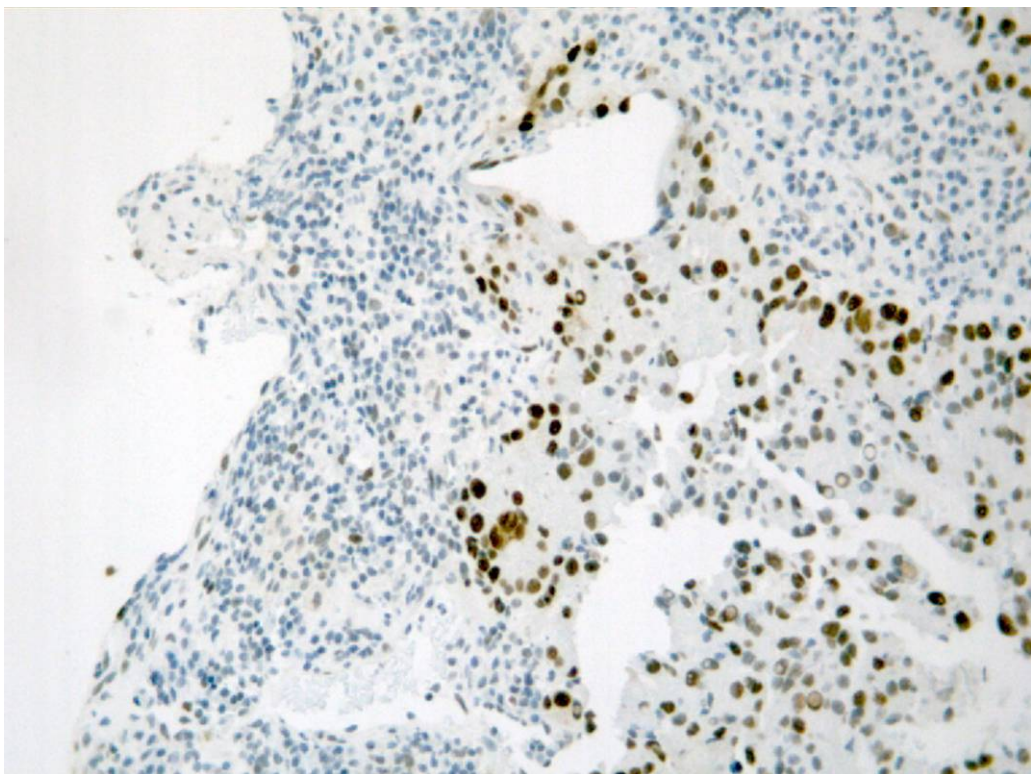
Actividad: LEVE: + ; INACTIVA:- .

Fuente. Muestras de biopsia del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca. Dic 1997 - Nov 2007.

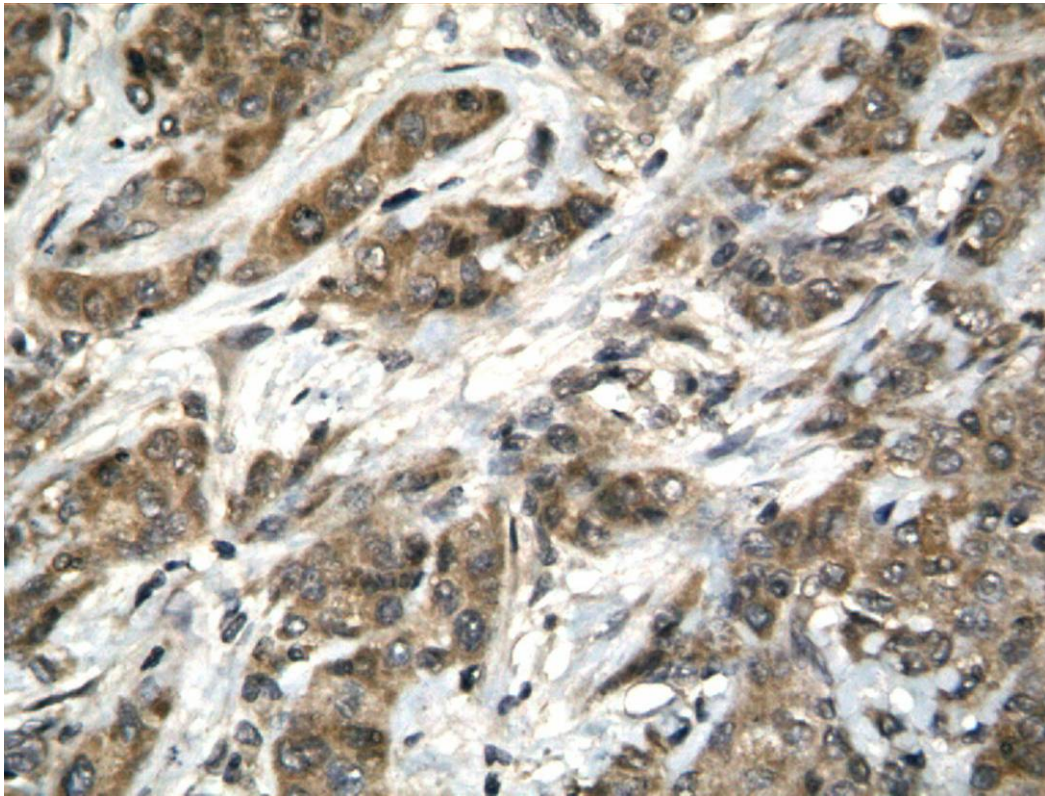
— PRUEBAS HISTOQUÍMICAS —



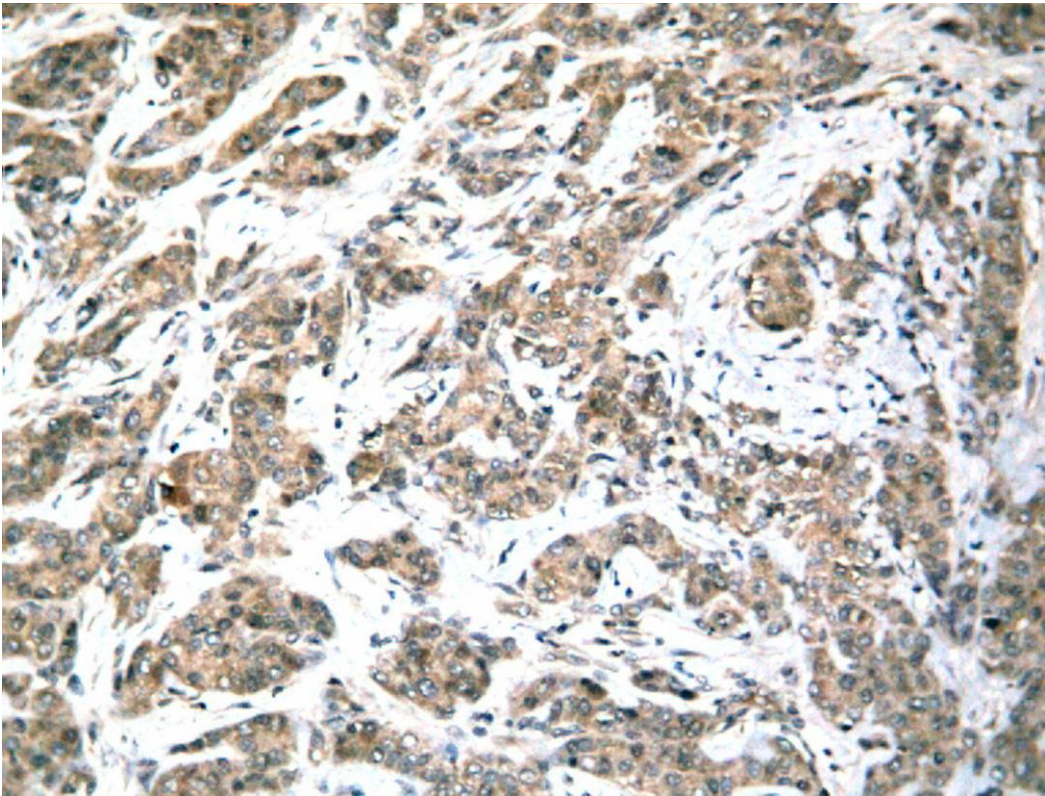
p-53 40x



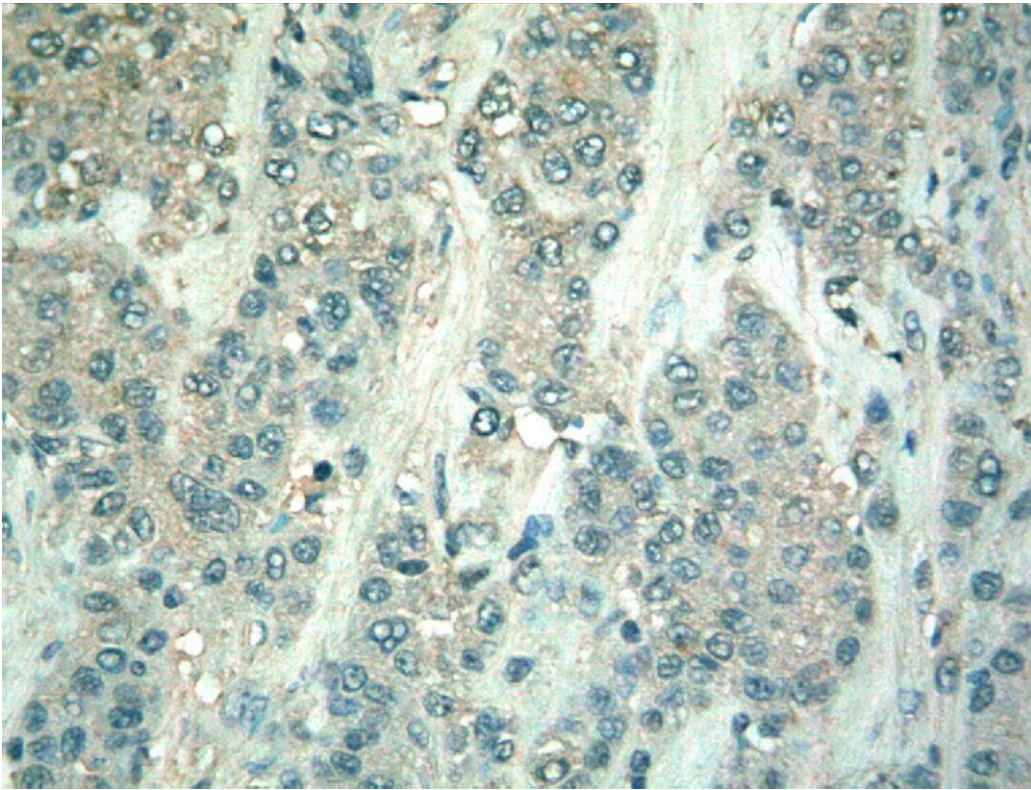
p-53 20x



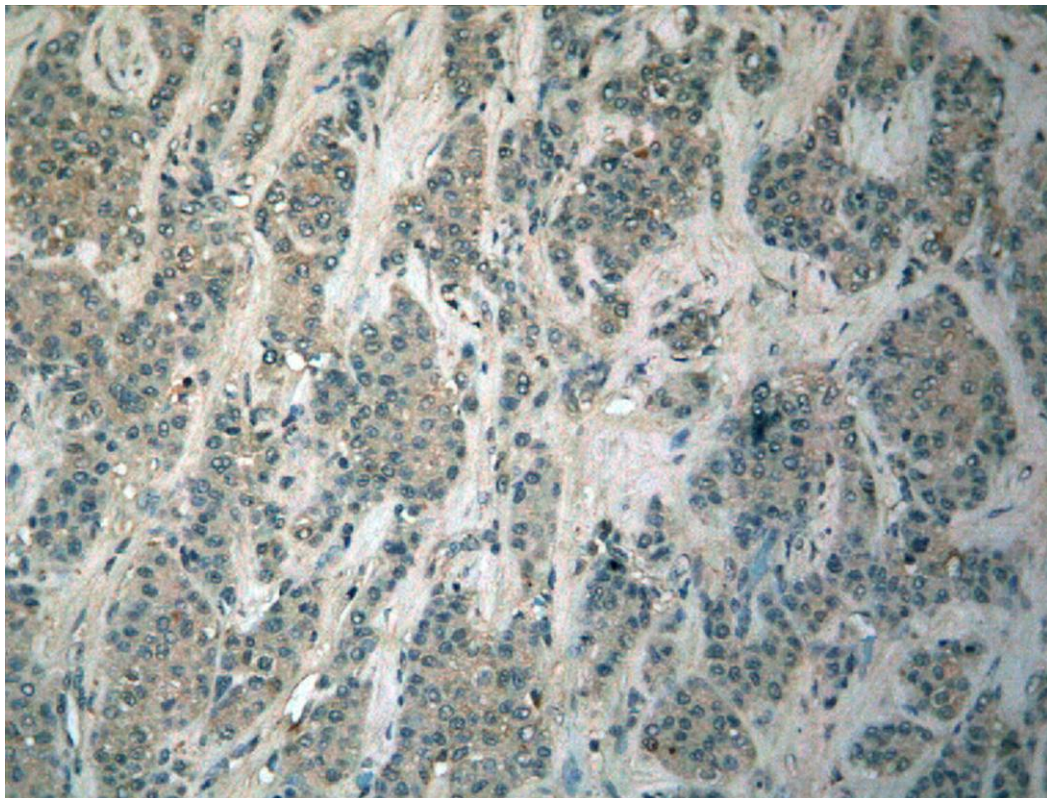
α -fetoproteína 40x



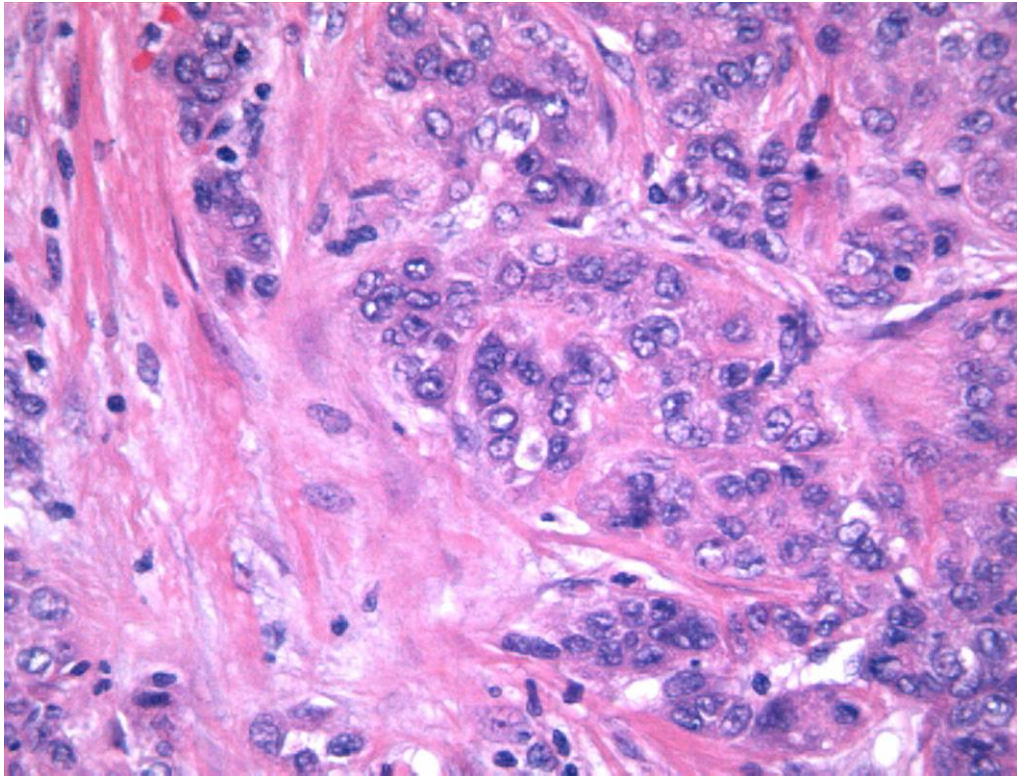
α -fetoproteína 40x



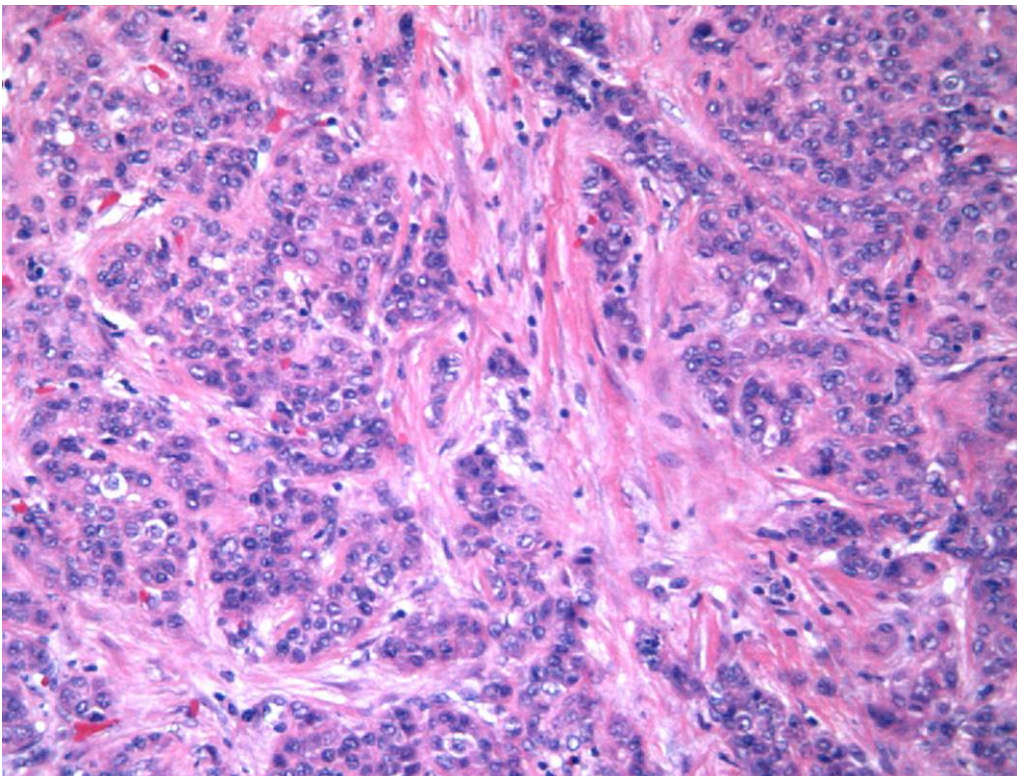
caspasa 40x



caspasa 40x



Hematoxilina eosina
Hepatocarcinoma 40x



Hematoxilina eosina
Hepatocarcinoma 20x

3.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Frecuencia y distribución absoluta y porcentual Tabla 3.1

Actividad de Telomerasa, p-53, α -fetoproteína y caspasa-3, en biopsias diagnósticos de hepatocarcinoma, cirrosis-VHC y hepatitis crónica VHC.

<i>Biopsias</i>	29 HCA					14 Cirrosis-VHC					31 Hepatitis VHC				
	+	++	+++	-	Total positivos	+	++	+++	-	Total positivos	+	++	+++	-	Total positivos
Telomerasa				29					14					31	
p-53	11	1		17	41%	4			10	29%	1			30	3%
A-fetoproteína	16	2		11	62%				14		1			30	3%
Caspasa-3	18	2		9	69%	1			13	7%	1			30	3%

Actividad: Leve = + ; Moderada = ++ ; Fuerte = +++ . Inactiva = -

HCA = Hepatocarcinoma

VHC = virus hepatitis C

Fuente. Muestras de biopsia del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca. Dic 1997 - Nov 2007.

Tabla 3.2

Frecuencia y distribución relacionada de resultados de pruebas inmunohistoquímicas en HCA

29 Hepatocarcinomas	4 HCA	4 HCA	4 HCA	4 HCA	Positividad
<i>p-53</i>	+	-	+	-	12 / 41 %
<i>Caspasa-3</i>	-	+	+	-	20 / 69 %
% <i>c-3 ± p-53 +</i>	13,8	41,4	27,5	17,2	
<i>Alfafetoproteína +</i>	3	5	6	4	18 / 62 %
<i>Alfafetoproteína -</i>	1	7	2	1	11 / 38 %
Total	4	12	8	5	29 / 100 %

* Positivo: + ; Negativo: -

HCA = Hepatocarcinoma

Caspasa-3 = c-3

Fuente. Muestras de biopsia del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca. Dic 1997 - Nov 2007.

DISCUSIÓN

Con el estudio inmunohistoquímico de las lesiones hepáticas producidas por el virus de la hepatitis C y su relación con hepatocarcinoma, nos ubicamos en un grupo específico de análisis, de las neoplasias malignas asociadas a un virus, que corresponden a un 20%, de todos los cánceres. Por ejemplo virus ADN: virus hepatitis B, papilomavirus, herpes virus (Epstein-Barr) en relación a hepatocarcinoma, carcinoma cervical y linfomas; los ARN virus como VHC y retrovirus asociados al hepatocarcinoma y leucemia de células T en adultos.⁴¹³

El fascinante universo celular, lleno de enigmas y aparentes paradojas nos sustrae a un pequeño mundo ortomolecular. Los virus son "genes ambulantes" que necesitan una máquina replicativa. También los genes animales controlan la proliferación y diferenciación celular. En primer lugar hay genes promotores del ciclo celular, que favorecen la proliferación celular. En segundo lugar hay genes supresores que realizan todo lo contrario, que frenan el ciclo celular.⁴²⁵ El cáncer se define como una enfermedad genética a nivel celular, a nivel genómico nuclear, pero también mitocondrial. Las alteraciones moleculares incluyen mutaciones dominantes de ganancia de función en los oncogenes y de tipo recesivo, con pérdida de función en los genes oncosupresores y en los que reparan DNA, en la amplificación génica y las redistribuciones cromosómicas.

Pero lo realmente revolucionario en la génesis del cáncer, su inmanente característica esencial: la inmortalidad, gracias a la producción de telomerasa.⁴²³ Primero la telomerasa, luego la inmortalidad tumoral. Veamos cómo la polimerasa del DNA no puede replicar el extremo de los cromosomas, lo que da por resultado la pérdida de DNA en los extremos especializados de los cromosomas o telómeros, con cada división celular.³⁸⁵ Al nacimiento los telómeros humanos son pares de 15 a 20 kilobases de longitud y presentan repeticiones en tándem de una secuencia de seis nucleóticos (TTAGGG), que se asocian a proteínas especializadas de fijación del telómero, formando una estructura en T, en forma de asa que protege los extremos cromosómicos para que, entre otras funciones, no sean reconocidos como dañados. La pérdida telomérica, después de cada ciclo celular, produce un acortamiento gradual del telómero, lo que

origina detención del crecimiento (senectud replicativa). Cuando los telómeros críticamente cortos aparecen, se dispara una respuesta del punto de verificación de daños del DNA que es regulada por p-53.

Las células pueden salvar la detención del crecimiento si el pRB y la p-53⁴²⁴ no son funcionales, sin embargo sobreviene la apoptosis, cuando los extremos desprotegidos de los cromosomas desencadenan fusiones cromosómicas y redistribuciones de DNA catastróficas (crisis). Aquí estamos en el punto álgido, pues se considera que la capacidad de evadir las limitaciones del crecimiento basadas en los telómeros es un paso decisivo en la evolución de casi todos los tipos de cáncer. En nuestro modelo de hepatocarcinoma y de casi todos los cánceres¹⁸⁴⁻³¹⁹ se necesita la expresión de telomerasa.¹⁰⁷⁻¹⁷⁹ Pero ni el hepatocito maduro, ni el hepatocito senescente o displásico producen telomerasa. Hay un delicado equilibrio entre proliferación y apoptosis celulares normalmente en el tejido hepático. En el parénquima hepático del paciente con cirrosis HCV relacionada³²²⁻³⁸⁰, el hepatocito senescente envía constantemente señales para la proliferación celular de hepatocitos de recambio. Este papel lo protagoniza la célula madre hepática, la única capaz de producir telomerasa y desdiferenciarse en células precursoras ovoides, que pueden mantener la capacidad de autorrenovarse y producir telomerasa. Muchas de estas células se fusionan dependiendo para ello de factores de crecimiento extracelulares y de interacciones célula-célula.⁴¹³ En el hígado normal es posible ver hepatocitos con doble núcleo. Se fusionan entre sí hepatocitos senescentes, pero también hepatocitos senescentes –se van a fusionar– con células madre hepáticas o precursoras que tienen capacidad de producir telomerasa. Aparece una nueva célula híbrida con un genoma, que proviene de un hepatocito, que se ha salvado de la apoptosis, por señales de supervivencia enviadas por otras células, o bien porque ya tiene suprimida las vías de Rb y p-53, y por otra vertiente la aportación genómica de la célula madre hepática o hepatocitoblasto multipotencial. A esta célula, fruto de la fusión celular^{414,417} igual que el espermatozoide que se fusiona con el óvulo formando un nuevo ser humano en la concepción, la denominaremos célula simbiocomutagénica hepática.³⁸⁶ En nuestros casos de hepatocarcinoma, se encontró una positividad global del 41% para el p-53. Se acepta alrededor de un 50% de positividad. Los virus pueden bloquear la función del p-53 normal y explicar la negatividad del mismo en 50-60% de los cánceres, (*Ver Tabla 3.1, pág 78*).

Por supuesto que el p-53 que hemos determinado es el que está mutado y se asocia a caspasa-3 en un 27% de los casos, (*Ver Tabla 3.2, pág 77*), lo que indica que el proceso de apoptosis se sigue presentando independientemente de la presencia del p-53 mutado, en nuestros pacientes con hepatocarcinoma. El gen p-53 se encuentra localizado en el cromosoma 17p y es el gen supresor que está más ampliamente implicado en los tumores humanos.⁴²⁵ La delección en el brazo corto del cromosoma 17p se asocia con mutaciones puntuales en el alelo p-53 del cromosoma homólogo.

Desde hace muchos años se conoce que los virus pueden inducir fusión celular. El Profesor Dr. José Ignacio Paz⁴¹⁴ ha podido reproducir cambios celulares con el virus del Herpes I y II en 1978; los virus oncogénicos, en particular el virus de Epstein-Barr, podría inducir la célula multinucleada de fusión celular, Reed-Sternberg del linfoma de Hodking, donde se observa DNA y antígenos virales.⁴¹³

Por lo tanto los virus hepatitis B y C podrían inducir también la fusión celular, produciendo como dijimos un híbrido celular con escape apoptótico. Probablemente la célula madre hepática o precursora ya tenga algún grado de daño celular y señalización inherentes a un parénquima hepático con 60 a 100 vías de señalización diferentes. En experimentos de líneas celulares en cultivo, se han fusionado células tumorales con células normales y sólo menos del 10% de estas células híbridas desarrollan neoplasias.⁴¹³ Por otro lado, en cultivo de células madre de ratón "normales" provenientes de teratocarcinomas, se pudo demostrar que los embriones tempranos de ratón con frecuencia desarrollaban tumores cuando eran retirados del útero y trasplantados a otro sitio anómalo. Esto se debía a que el nuevo sitio de implantación no presentaba las señales apropiadas, para la diferenciación celular.⁴¹³

Realmente la única célula capaz de producir un cáncer es la célula fusionada de simbiocomutagénesis. ¿Por qué una célula madre hepática embrionaria esperaría de 20 a 40 años para el desarrollo de una cirrosis VHC para producir un hepatocarcinoma por sí sola? Si lo hace lo debería haber hecho mucho antes, ya que dispone de telomerasa para su escape apoptótico. Por otro lado el hepatocito maduro lesionado de la cirrosis no produce telomerasa nunca. Su capacidad regenerativa en el mito de Prometheus⁴¹⁶ se le debe a la célula madre hepática.

Al igual que todas las células, el hepatocito llega al "problema del fin de la replicación". Es la hora de la apoptosis con la alarma mortal del reloj mitótico. Las células en promedio después de 70 replications⁴²¹ pierden gradualmente el DNA cromosómico y pasan de la fase G₁ a la fase S, del ciclo celular senescente que termina en muerte celular.

Aquí no hay escape apoptótico porque aunque no haya p-53 normal o Rb la célula moriría por fragmentación cromosómica activando otras vías de apoptosis, ya que no es capaz –nunca lo será– de producir telomerasa, a menos que se fusione con la célula madre hepática, produciendo una catástrofe simbiocomutagénica hepática: el hepatocarcinoma.⁴⁰⁷

Ahora bien, se han hecho experimentos que fusionan células normales, con células de tumores metastáticos produciendo células tumorales, sin capacidad de metastizar.⁴²⁵ Por tanto en la célula normal existen inhibidores titulares que bloquean la proteólisis y la angiogénesis frenando la diseminación metastásica. Son proteínas supresoras de metástasis. El primer inhibidor que se describió fue el TIMP-1 y el gen que lo codifica ha sido clonado y mapeado en el cromosoma X⁴²⁵, esto nos plantea la resolución del problema de por qué el hepatocarcinoma es más frecuente en hombres. Se dice que los estrógenos pueden proteger a las mujeres y que los hombres tienen más adicciones con uso de jeringuillas.² Esto último si está claro, ya que en nuestro estudio los tres grupos: hepatocarcinoma (de variada etiología), la cirrosis por HVC y la hepatitis crónica por VHC tienen un franco predominio del género masculino, (*Ver Figura 10, pág 69*), indicando que las personas del sexo masculino se infectan más con el VHC y que por tanto desarrollan más frecuentemente las complicaciones propias de dicha infección.

En nuestra serie de hepatocarcinomas, por cualquier causa, sus determinaciones histoquímicas se tomaron como estándar áureo de referencia o variable predictiva. Esto debido a que el número de casos de hepatocarcinoma por virus C es muy pequeño. Algo parecido ocurre con las cirrosis HCV. Pero con el grupo de hepatitis crónica HCV relacionado ocurre todo lo contrario y dentro de unos años los casos de cirrosis y hepatocarcinoma HCV se van a multiplicar. Para hacer inferencias a nivel nacional español, se necesita un gran número de casos, representativos de toda la comunidad española.⁴⁰⁴ De todas maneras sería importante el estudio cromosómico –del cromosoma X también– de las mitocondrias hepáticas¹⁸⁰, dada la predominancia del hepatocarcinoma

en los hombres. En la infección crónica por virus C hay gran stress oxidativo, lo cual produce mayor lesión mitocondrial, perdiéndose el gradiente de potencial –de la teoría quimiosmótica de Peter Mitchell– de la membrana interna mitocondrial.

En cuanto al resultado de las pruebas inmunohistoquímicas de los grupos cirrosis y hepatitis por VHC lo más llamativo es la negatividad del 100 y 97% respectivamente, con respecto al análisis inmunohistoquímico de la alfa-fetoproteína que se usa como factor diagnóstico y pronóstico de cáncer hepatocelular en pacientes con hepatitis crónica y cirrosis hepática.

En los casos de cirrosis hepática VHC la variable predictora p-53⁴²⁵ presentó una positividad del 29%, por lo que puede servirnos como factor de riesgo de la variable dependiente que es el hepatocarcinoma.

Las pruebas histoquímicas de telomerasa resultaron negativas en un 100% de todos los casos, de los tres grupos de pacientes. Por tanto no se recomienda realizar pruebas de inmunohistoquímica para detección de telomerasa, sino realizarlos mejor por el método de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Desde hace muchos años se conoce de la asociación de lesiones hepáticas producidas por el virus C, como hepatitis crónica y cirrosis y actividad de telomerasa aumentada. Es claro que el hepatocarcinoma⁴⁰⁵ expresa una actividad de 90% de telomerasa. Pero en casi todos estos estudios mundiales la telomerasa se ha determinado por el método de la P.C.R.⁴⁰⁶

CONCLUSIONES

- 1- En la distribución por frecuencias de género, se observa un claro predominio del sexo masculino, para los tres grupos de pacientes estudiados.
- 2- La prueba histoquímica de la telomerasa, no se recomienda su uso, dado el 100% de negatividad, en todos los casos de los tres grupos. Debe realizarse la prueba de la P.C.R. (reacción en cadena de la polimerasa).
- 3- La prueba histoquímica de la p-53 resultó positiva como variable predictora en un 29% de los casos de cirrosis VHC y en un 41% como variable dependiente en el grupo de hepatocarcinoma. Por lo tanto se recomienda su uso, como factor de riesgo y diagnóstico, respectivamente, en dichos grupos.
- 4- Debe ampliarse el estudio con nuevas pruebas como la determinación de antígenos de superficie, para la caracterización de la célula hepatocitaria tumoral con P.C.R.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- CAPOCACCIA RICCARDO, Sant Milena et al. Hepatocellular carcinoma: trends of incidence and survival in Europe and the United States at the end of the 20th century. *AM.J. Gastroenterol*, 2007; 102: 1661-1670.
- 2- EL-SERAG HB, RUDOLPH KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2007; 132: 2557-2576.
- 3- NEAL KEITH, R. On Behalf of the Trent Hepatitis C Study Group. *GUT* 2007; 56: 1098-1104.
- 4- SUN WEI, XING BAOCAL et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Molecular and Cellular proteomics*, 2007; 6: 1798-1808.
- 5- ZEN YOH, FUJII TAKAHIKO et al. Histological and culture studies respect to ABC62 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma. *AJP*, 2007; 170: 1750-1762.
- 6- PARKIN DM, BRAY F, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94:153-156.
- 7- RUDOLPH KL, CHANG S, MILLARD M, SCHREIBER-AGUS N, DEPINHO RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science*, 2000; 287: 1253-1258.
- 8- YU MW, CHEN CJ. Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 1993; 53: 790-794.
- 9- YU MW, YANG YC, YANG SY, et al. Hormonal markers and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study among men. *J Natl Cancer Inst*, 2001; 93: 1644-1651.
- 10- YOSHIZAWA H. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology*, 2002; 62 (suppl 1): 8-17.
- 11- ARMSTRONG GL, ALTER MJ, MCQUILLAN GM, MARGOLIS HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology*, 2000; 31: 777-782.
- 12- WONG JB, MCQUILLAN GM, MCHUTCHISON JG, POYNARD T. Estimating future hepatitis C morbidity, mortality, and costs in the United States. *Am J Public Health*, 2000; 90: 1562-1569.

- 13- EL-SERAG HB, MASON AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, 1999; 340:745-750.
- 14- EL-SERAG HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology*, 2004; 127 (5 suppl 1): S27-S34.
- 15- EL-SERAG HB, DAVILA JA, PETERSEN NJ, MCGLYNN KA. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann Intern Med*, 2003; 139: 817-823.
- 16- DAVILA JA, MORGAN RO, SHAIB Y, MCGLYNN KA, EL-SERAG HB. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. *Gastroenterology*, 2004; 127: 1372-1380.
- 17- EL-SERAG HB, MASON AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med*, 2000; 160: 3227-3230.
- 18- HASSAN MM, FROME A, PATT YZ, EL-SERAG HB. Rising prevalence of hepatitis C virus infection among patients recently diagnosed with hepatocellular carcinoma in the United States. *J Clin Gastroenterol*, 2002; 35: 266-269.
- 19- KULKARNI D, BARCAK E, EL-SERAG HB, GOODGAME R. The impact of immigration on the increasing incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004; 20: 445-450.
- 20- MCMAHON BJ, ALBERTS SR, WAINWRIGHT RB, BULKOW L, LANIER AP. Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers. *Arch Intern Med*, 1990; 150: 1051-1054.
- 21- KAO JH, CHEN PJ, LAI MY, CHEN DS. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol*, 2002; 40: 1207-1209.
- 22- CAMMA C, GIUNTA M, ANDREONE P, CRAXI A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *J Hepatol*, 2001; 34: 593-602.
- 23- TORBENSON M, THOMAS DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis*, 2002; 2: 479-486.
- 24- YUKI N, NAGAOKA T, YAMASHIRO M, et al. Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. *Hepatology*, 2003; 37: 1172-1179.
- 25- BEASLEY RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1988; 61: 1942-1956.
- 26- KANE MA. Global control of primary hepatocellular carcinoma with hepatitis B vaccine: the contributions of research in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003; 12: 2-3.

- 27- GOLDSTEIN ST, ZHOU F, HADLER SC, BELL BP, MAST EE, MARGOLIS HS. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol*, 2005; 34: 1329-1339.
- 28- IKEDA K, SAITOH S, ARASE Y, et al. Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: a long-term observation study of 1.643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology*, 1999; 29: 1124-1130.
- 29- BRUNO S, BATTEZZATI PM, BELLATI G, et al. Long-term beneficial effects in sustained responders to interferon-alfa therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol*, 2001; 34: 748-755.
- 30- DONATO F, TAGGER A, GELATTI U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*, 2002; 155: 323-331.
- 31- FREEMAN AJ, DORE GJ, LAW MG, et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 2001; 34 (4 Pt 1): 809-816.
- 32- CRAMP ME. HBV + HCV = HCC? *Gut*, 1999; 45: 168-169.
- 33- SERFATY L, AUMAITRE H, CHAZOILLERES O, et al. Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology*, 1998; 27: 1435-1440.
- 34- No authors listed. Effect of interferon-alpha on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. International Interferon-alpha Hepatocellular Carcinoma Study Group. *Lancet*, 1998; 351: 1535-1539.
- 35- IMAI Y, KAWATA S, TAMURA S, et al. Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. Osaka Hepatocellular Carcinoma Prevention Study Group. *Ann Intern Med*, 1998; 129: 94-99.
- 36- NIEDERAU C, LANGE S, HEINTGES T, et al. Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology*, 1998; 28: 1687-1695.
- 37- VALLA DC, CHEVALLIER M, MARCELLIN P, et al. Treatment of hepatitis C virus-related cirrhosis: a randomized, controlled trial of interferon alfa-2b versus no treatment. *Hepatology*, 1999; 29: 1870-1875.
- 38- OKANOUE T, ITOH Y, MINAMI M, et al. Interferon therapy lowers the rate of progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C but not significantly in an advanced stage: a retrospective study in 1.148 patients. Viral Hepatitis Therapy Study Group. *J Hepatol*, 1999; 30: 653-659.
- 39- Overall evaluations of carcinogenicity an updating of IARC monographs. IARC Monographs, 1987; 1-42 (suppl 7), 83-87. Lyon: IARC Press.

- 40- GARNER RC, MILLER EC, MILLER JA. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B 1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. *Cancer Res*, 1972; 32: 2058-2066.
- 41- BRESSAC B, KEW M, WANDS J, OZTURK M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 1991; 350: 429-431.
- 42- TURNER PC, SYLLA A, DIALLO MS, CASTEGNARO JJ, HALL AJ, WILD CP. The role of aflatoxins and hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: A basis for primary prevention in Guinea-Conakry, West Africa. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002; 17 (suppl): S441-S448.
- 43- QIAN GS, ROSS RK, YU MC, et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994; 3: 3-10.
- 44- WOLK A, GRIDLEY G, SVENSSON M, et al. A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control*, 2001; 12:13-21.
- 45- BOFFETTA P, MATISANE L, MUNDT KA, DELL LD. Meta-analysis of studies of occupational exposure to vinyl chloride in relation to cancer mortality. *Scand J Work Environ Health*, 2003; 29: 220-222.
- 46- MARRERO JA, FONTANA RJ, SU GL, CONJEEVARAM HS, EMICK DM, LOK AS. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology*, 2002; 36: 1349-1354.
- 47- BUGIANESI E, LEONE N, VANNI E, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2002; 123: 134-140.
- 48- REGIMBEAU JM, COLOMBAT M, MOGNOL P, et al. Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*, 2004; 10 (2 suppl 1): S69-S73.
- 49- FIORE G, FERA G, NAPOLI N, VELLA F, SCHIRALDI O. Liver steatosis and chronic hepatitis C: a spurious association? *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1996; 8: 125-129.
- 50- COTRIM HP, PARANA R, BRAGA E, LYRA L. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: natural history? *Am J Gastroenterol*, 2000; 5: 3018-3019.
- 51- ZEN Y, KATAYANAGI K, TSUNEYAMA K, HARADA K, ARAKI I, NAKANUMA Y. Hepatocellular carcinoma arising in non-alcoholic steatohepatitis. *Pathol Int*, 2001; 51: 127-131.
- 52- SHIMADA M, HASHIMOTO E, TANIAI M, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, 2002; 37: 154-160.

- 53- ADAMS LA, LYMP JF, ST SJ, et al. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*, 2005; 129: 113-121.
- 54- CALLE EE, RODRÍGUEZ C, WALKER-THURMOND K, THUN Mj. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, 2003; 348: 1625-1638.
- 55- MOLLER H, MELLEMGAAARD A, LINDVIG K, OLSEN JH. Obesity and cancer risk: a Danish record-linkage study. *Eur J Cancer*, 1994; 30A: 344-350.
- 56- RATZIU V, GIRAL P, CHARLOTTE F, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology*, 2000; 118: 1117-1123.
- 57- RATZIU V, TRABUT JB, POYNARD T. Fat, diabetes, and liver injury in chronic hepatitis C. *Curr Gastroenterol Rep*, 2004; 6:22-29.
- 58- ADINOLFI LE, GAMBARDELLA M, ANDREANA A, TRIPODI MF, UTILI R, RUGGIERO G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology*, 2001; 33: 1358-1364.
- 59- HWANG SJ, LUO JC, CHU CW, et al. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C virus infection: prevalence and clinical correlation. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001; 16: 190-195.
- 60- POYNARD T, RATZIU V, MCHUTCHISON J, et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology*, 2003; 38: 75-85.
- 61- WESTIN J, NORDLINDER H, LAGGING M, NORKRANS G, WEJSTAL R. Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *J Hepatol*, 2002; 37: 837-842.
- 62- WONG VS, WIGHT DG, PALMER CR, ALEXANDER GJ. Fibrosis and other histological features in chronic hepatitis C virus infection: a statistical model. *J Clin Pathol*, 1996; 49: 465-469.
- 63- ONG JP, YOUNOSSI ZM, SPEER C, OLANO A, GRAMLICH T, BOPARAI N. Chronic hepatitis C and superimposed non-alcoholic fatty liver disease. *Live*, 2001; 21: 266:271.
- 64- OHATA K, HAMASAKI K, TORIYAMA K, et al. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer*, 2003; 97: 3036-3043.
- 65- RUBBIA-BRANDT L, QUADRI R, ABID K, et al. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol*, 2000; 33: 106-115.

- 66- BUGIANESSI E, MANZINI P, D'ANTICO S, et al. Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in non-alcoholic fatty liver. *Hepatology*, 2004; 39: 179-187.
- 67- EL-SERAG HB, TRAN T, EVERHART JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2004; 126: 460-468.
- 68- ADAMI HO, CHOW WH, NYREN O, et al. Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus. *J Natl Cancer Inst*, 1996; 88: 1472-1477.
- 69- WIDEROFF L, GRIDLEY G, MELLEMKJAER L, et al. Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. *J Natl Cancer Inst*, 1997; 89: 1360-1365.
- 70- EL-SERAG HB, HAMPEL H, JAVADI F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006; 4: 369-380.
- 71- EVANS AA, CHEN G, ROSS EA, SHEN FM, LIN WY, LONDON WT. Eight-year follow-up of the 90,000-person Haimen City cohort: I. Hepatocellular carcinoma mortality, risk factors, and gender differences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002; 11: 369-376.
- 72- TANAKA K, HIROHATA T, FUKUDA K, SHIBATA A, TSUKUMA H, HIYAMA T. Risk factors for hepatocellular carcinoma among Japanese women. *Cancer Causes Control*, 1995; 6: 91-98.
- 73- YU MC, YUAN JM. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2004; 127 (5 suppl 1): S72-S78.
- 74- DE BV, WELSH JA, YU MC, BENNETT WP. p53 mutations in hepatocellular carcinoma related to oral contraceptive use. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 145-149.
- 75- KORULA J, YELLIN A, KANEL G, CAMPOFIORI G, NICHOLS P. Hepatocellular carcinoma coexisting with hepatic adenoma. Incidental discovery after long-term oral contraceptive use. *West J Med*, 1991; 155: 416-418.
- 76- ROSENBERG L. The risk of liver neoplasia in relation to combined oral contraceptive use. *Contraception*, 1991; 43: 643-652.
- 77- MAHESHWARI S, KRAMER J, EL-SERAG HB. The association between oral contraceptives and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Hepatol* (In press).
- 78- CAUZA E, PECK-RADOSAVLJEVIC M, ULRICH-PUR H, et al. Mutations of the HFE gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*, 2003; 98: 442-447.

- 79- WILLIS G, BARDSLEY V, FELLOWS IW, LONSDALE R, WIMPERIS JZ, JENNINGS BA. Hepatocellular carcinoma and the penetrance of HFE C282Y mutations: a cross sectional study. *BMC Gastroenterol*, 2005; 5: 17.
- 80- Blanc JF, De Ledinghen V, Bernard PH, et al. Increased incidence of HFE C282Y mutations in patients with iron overload and hepatocellular carcinoma developed in non-cirrhotic liver. *J Hepatol*, 2000; 32: 805-811.
- 81- FRACANZANI AL, FARGION S, STAZI MA, et al. Association Between heterozygosity for HFE gene mutations and hepatitis viruses in hepatocellular carcinoma. *Blood Cells Mol Dis*, 2005; 35: 27-32.
- 82- BOIGE V, CASTERA L, DE RN, et al. Lack of association between HFE gene mutations and hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Gut*, 2003; 52: 1178-1181.
- 83- HELLERBRAND C, POPPL A, HARTMANN A, SCHOLMERICH J, LOCK G. HFE C282Y heterozygosity in hepatocellular carcinoma: evidence for an increased prevalence. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2003; 1: 279-284.
- 84- YU MW, HSIEH HH, PAN WH, YANG CS, CHEN CJ. Vegetable consumption, serum retinol level, and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 1995; 55: 1301-1305.
- 85- YU MW, HORNG IS, HSU KH, CHIANG YC, LIAW YF, CHEN CJ. Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *Am J Epidemiol*, 1999; 150: 367-374.
- 86- TALAMINI R, POLESEL J, MONTELLA M, et al. Food groups and risk of hepatocellular carcinoma: A multicenter case-control study in Italy. *Int J Cancer*, 2006; 119: 2916-2921.
- 87- SAUVAGET C, NAGANO J, HAYASHI M, SPENCER E, SHIMIZU Y, ALLEN N. Vegetables and fruit intake and cancer mortality in the Hiroshima/Nagasaki Life Span Study. *Br J Cancer*, 2003; 88: 689-694.
- 88- GALLUS S, BERTUZZI M, TAVANI A, et al. Does coffee protect against hepatocellular carcinoma? *Br J Cancer*, 2002; 87: 956-959.
- 89- GELATTI U, COVOLO L, FRANCESCHINI M, et al. Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *J Hepatol*, 2005; 42: 528-534.
- 90- TANAKA K, HARA M, SAKAMOTO T, et al. Inverse association between coffee drinking and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Japan. *Cancer Sci*, 2007; 98: 214-218.
- 91- OHFUJI S, FUKUSHIMA W, TANAKA T, et al. Coffee consumption and reduced risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic type C liver disease: A case-control study. *Hepatol Res*, 2006; 36: 201-208.

- 92- MONTELLA M, POLESEL J, LA VC, et al. Coffee and tea consumption and risk of hepatocellular carcinoma in Italy. *Int J Cancer*, 2007; 120: 1555-1559.
- 93- SHIMAZU T, TSUBONO Y, KURIYAMA S, et al. Coffee consumption and the risk of primary liver cancer: pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Int J Cancer*, 2005; 116: 150-154.
- 94- INOUE M, YOSHIMI I, SOBUE T, TSUGANE S. Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study in Japan. *J Natl Cancer Inst*, 2005; 97: 293-300.
- 95- KUROZAWA Y, OGIMOTO I, SHIBATA A, et al. Coffee and risk of death from hepatocellular carcinoma in a large cohort study in Japan. *Br J Cancer*, 2005; 93: 607-610.
- 96- PAGLIARO L, PASTA L, D'AMICO G, MADONIA S, PIETROSI G. Familial clustering of (mostly) HCV-related cirrhosis. A case-control study. *J Hepatol*, 2002; 37: 762-766.
- 97- ABDELMALEK MF, LIU C, SCHUSTER J, NELSON DR, ASAL NR. Familial aggregation of insulin resistance in first-degree relatives of patients with non-alcoholic fatty liver disease 10. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006; 4: 1162-1169.
- 98- YU MW, CHANG HC, LIAW YF, et al. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92: 1159-1164.
- 99- YU MW, CHANG HC, CHEN PJ, et al. Increased risk for hepatitis B-related liver cirrhosis in relatives of patients with hepatocellular carcinoma in northern Taiwan. *Int J Epidemiol*, 2002; 31: 1008-1015.
- 100- BURTON PR, TOVIN MD, HOPPER JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet*, 2005; 366: 941-951.
- 101- DAWN TM, BARRETT JH. Genetic linkage studies. *Lancet*, 2005; 366: 1036-1044.
- 102- CORDELL HJ, CLAYTON DG. Genetic association studies. *Lancet* 2005; 366: 1121-1131.
- 103- DAVEY SG, EBRAHIM S, LEWIS S, HANSELL AL, PALMER LJ, BURTON PR. Genetic epidemiology and public health: hope, hype, and future prospects. *Lancet* 2005; 366: 1484-1498.
- 104- HATTERSLEY AT, MCCARTHY MI. What makes a good genetic association study? *Lancet* 2005; 366: 1315-1323.
- 105- HOPPER JL, BISHOP DT, EASTON DF. Population-based family studies in genetic epidemiology. *Lancet*, 2005; 366: 1397-1406.
- 106- KHOURY MJ, LITTLE J. Human genome epidemiologic reviews: the beginning of something HuGE. *Am J Epidemiol*, 2000; 151: 2-3.

- 107- LITTLE J, KHOURY MJ, BRADLEY L, et al. The human genome project is complete. How do we develop a handle for the pump? *Am J Epidemiol*, 2003; 156: 667-673.
- 108- WHITE DL, LI D, NURGELIEVA Z, EL-SERAG HB. The glutathione S-transferase variants as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGE systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 2007; 132: A179-180.
- 109- BARBASON H, RASSENFOSSE C, BETZ EH. Promotion mechanism of Phenobarbital and partial hepatectomy in DENA hepatocarcinogenesis cell kinetics effect. *Br J Cancer*, 1983; 47: 517-525.
- 110- KAWAI H, SUDA T, AOYAGI Y, et al. Quantitative evaluation of genomic instability as a possible predictor for development of hepatocellular carcinoma: comparison of loss of heterozygosity and replication error. *Hepatology*, 2000; 31: 1246-1250.
- 111- DELHAYE M, LOUIS H, DEGRAEF C, et al. Relationship between hepatocyte proliferative activity and liver functional reserve in human cirrhosis. *Hepatology*, 1996; 23: 1003-1011.
- 112- WEGE H, CHUI MS, LE HT, STROM SC, ZERN MA. In vitro expansion of human hepatocytes is restricted by telomere-dependent replicative aging. *Cell Transplant*, 2003; 12: 897-906.
- 113- LEVY MZ, ALLSOPP RC, FUTCHER AB, GREIDER CW, HARLEY CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol*, 1992; 225: 951-960.
- 114- WIEMANN SU, SATYANARAYANA A, TSAHURIDU M, et al. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J*, 2002; 16: 935-942.
- 115- WRIGHT WE, SHAY JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol*, 1992; 27: 383-389.
- 116- D'ADDA DI FAGAGNA F, REAPER PM, CLAY-FARRACE L, FIEGLER H, CARR P, VON ZGLINICKI T, SARETZKI G, CARTER NP, JACKSON SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 2003; 426: 194-198.
- 117- SMORGORZEWSKA A, KARLSEDER J, HOLTGREVE-GREZ H, JAUCH A, de Lt. DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol*, 2002; 12: 1635-1644.
- 118- MASER RS, WONG KK, SAHIN E, et al. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is not required for dysfunctional telomere fusion and checkpoint response in the telomerase-deficient mouse. *Mol Cell Biol*, 2007; 27: 2253-2265.
- 119- ARTANDI SE, CHANG S, LEE SL, et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*, 2000; 406: 641-645.

- 120- FARAZI PA, GLICKMAN J, JIANG S, YU A, RUDOLPH KL, DEPINHO RA. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2003; 63:5021-5027.
- 121- SATYANARAYANA A, MANNS MP, RUDOLPH KL. Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 2004; 40: 276-283.
- 122- PLENTZ RR, CASELITZ M, BLECK JS, et al. Hepatocellular telomere shortening correlates with chromosomal instability and the development of human hepatoma. *Hepatology*, 2004; 40: 80-86.
- 123- PLENTZ RR, PARK YN, LEHEL A, et al. Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 2007; 45: 968-976.
- 124- PLENTZ RR, SCHLEGELBERGER B, FLEMMING P, et al. Telomere shortening correlates with increasing aneuploidy of chromosome 8 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2005; 42: 522-526.
- 125- VAN GIJSSEL HE, MAASSEN CB, MULDER GJ, MEERMAN JH. p53 protein expression by hepatocarcinogens in the rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal hepatocytes as a mechanism of hepatic tumour promotion. *Carcinogenesis*, 1997; 18: 1027-1033.
- 126- LACONI S, PANI P, PILLAI S, PASCIU D, SARMA DS, LACONI E. A growth-constrained environment drives tumour progression in-vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 7806-7811.
- 127- BILOUSOVA G, MARUSYK A, PORTER CC, CARDIFF RD, DEGREGORI J. Impaired DNA replication within progenitor cell pools promotes leukemogenesis. *PLoS Biol*, 2005; 3: e401.
- 128- SATYANARAYANA A, WIEMANN SU, BUER J, et al. Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *EMBO J*, 2003; 22: 4003-4013.
- 129- CHOUDHURY AR, JU Z, DOJOSUBROTO MW, et al. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet*, 2007; 39: 99-105.
- 130- WAGAYAMA H, SHIRAKI K, YAMANAKA T, et al. p21WAF1/CTP1 expression and hepatitis virus type. *Dig Dis Sci*, 2001; 46: 2074-2079.
- 131- IAKOVA P, AWAD SS, TIMCHENKO NA. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell*, 2003; 113: 495-506.
- 132- POYNARD T, MATHURIN P, LAI CL, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol*, 2003; 38: 257-265.

- 133- PASCIU D, MONTISCI S, GRECO M, et al. Aging is associated with increased clonogenic potential in rat liver in vivo. *Aging Cell*, 2006; 5: 373-377.
- 134- WANG GL, IAKOVA P, WILDE M, AWAD S, TIMCHENKO NA. Liver tumors escape negative control of proliferation via PI3K/Akt-mediated block of C/EBP alpha growth inhibitory activity. *Genes Dev*, 2004; 18: 912-925.
- 135- STANGER BZ, TANAKA AJ, MELTON DA. Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature*, 2007; 445: 886-891.
- 136- BATALLER R, BRENNER DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 2005; 115: 209-218.
- 137- GIANELLI G, BERGAMINI C, FRANSVEA E, SGARRA C, ANTONACI S. Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2005; 129: 1375-1383.
- 138- OGATA H, KOBAYASHI T, CHINEN T, et al. Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 2006; 131: 179-193.
- 139- BUDHU A, FORGUES M, YE QH, et al. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell*, 2006; 10: 99-111.
- 140- SAKURAI T, MAEDA S, CHANG L, KARIN M. Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 10544-10551.
- 141- LUEDDE T, BERAZA N, KOTSIKORIS V, et al. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 2007; 11: 119-132.
- 142- PIKARSKY E, PORAT RM, STEIN I, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 2004; 431: 461-466.
- 143- PARRINELLO S, COPPE JP, KRTOLICA A, CAMPISI J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci*, 2005; 118 (Pt 3): 485-496.
- 144- SCHNABL B, PURBECK CA, CHOI YH, HAGEDORN CH, BRENNER D. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology*, 2003; 37: 653-664.
- 145- DI MR, FUMAGALLI M, CICALESSE A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 2006; 444: 638-642.

- 146- TANNAPFEL A, BUSSE C, WEINANS L, et al. INK4a-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogen*, 2001; 20: 7014-7019.
- 147- JABLKOWSKI M, BOCIAN A, BIALKOWSKA J, BARTKOWIAK J. A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 2005; 24: 117-125.
- 148- LLOVET JM, CHEN Y, WURMBACH E, et al. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology*, 2006; 131: 1758-1767.
- 149- HIGASHITSUJI H, ITOH K, NAGAO T, et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med*, 2000; 6: 96-99.
- 150- HIGASHITSUJI H, HIGASHITSUJI H, ITOH K, et al. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. *Cancer Cell*, 2005; 8: 75-87.
- 151- LECHER A, SATYANARAYANA A, JU Z, et al. The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. *EMBO Rep*, 2005; 6: 275-281.
- 152- KALINICHENKO VV, MAJOR ML, WANG X, PETROVIC V, KUECHLE J, YODER HM, DENNEWITZ MB, SHIN B, DATTA A, RAYCHAUDHURI P, COSTA RH. Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinoma and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev*, 2004; 18: 830-850.
- 153- ITO Y, MATSUURA N, SAKON M, MIYOSHI E, NODA K, TAKEDA T, UMESHITA K, NAGANO H, NAKAMORI S, DONO K, TSUJIMOTO M, NAKAHARA M, NAKAO K, TANIGUCHI N, MONDEN M. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predicts the recurrence. *Hepatology*, 1999; 30: 90-99.
- 154- AZECHI H, NISHIDA N, FUKUDA Y, et al. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology*, 2001; 60: 346-354.
- 155- MATSUDA Y, YAMAGIWA S, TAKAMURA M, et al. Overexpressed Id-1 is associated with a high risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis without transcriptional repression of p16. *Cancer*, 2005; 104: 1037-1044.
- 156- YAMADA T, DE SOUZA AT, FINKELSTEIN S, JIRTLE RL. Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 10351-10355.

- 157- DENNIS PA, RIFKIN DB. Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 580-584.
- 158- BREUHAHN K, VREDEN S, HADDAD R, et al. Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression. *Cancer Res*, 2004; 64: 6058-6064.
- 159- ACQUATI F, MALGARETTI N, HAUPTSCHIEIN R, RAO P, GAIDANO G, TARAMELLI R. A 2-Mb YAC contig linking the plasminogen-apoprotein(a) gene family to the insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R) gene on the telomeric region of chromosome 6 (6q26-q27). *Genomics*, 1994; 22: 664-666.
- 160- HIGASHITSUJI H, HIGASHITSUJI H, NAGAO T, et al. A novel protein overexpressed in hepatoma accelerates export of NF-kappa B from the nucleus and inhibits p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, 2002; 2: 335-346.
- 161- LECHER, A, HOSTEGE H, BEGUS Y, SCHIENKE A, KAMINO K, LEHMANN U, KUBICKA S, SCHIRMACHER P, JONKERS J, RUDOLPH KL. Telomerase deletion limits progression of p53-mutant hepatocellular carcinoma with short telomeres in chronic liver disease. *Gastroenterology*, 2007; 132: 1465-1475.
- 162- MARTIN J, MAGNINO F, SCHMIDT K, et al. Hint2, a mitochondrial apoptotic sensitizer down-regulated in hepatocellular carcinoma with short telomeres in chronic liver disease. *Gastroenterology*, 2007; 132: 1465-1475.
- 163- YANG YA, ZHANG GM, FEIGENBAUM L, ZHANG YE. Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis through downregulation of Bcl-2. *Cancer Cell*, 2006; 9: 445-457.
- 164- CHEN RH, SU YH, CHUANG RL, CHANG TY. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene*, 1998; 17: 1959-1968.
- 165- MICSENYI A, TAN X, SNEDDON T, LUO JH, MICHALOPOULOS GK, MONGA SP. Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology*, 2004; 126: 1134-1146.
- 166- DE LA CA, ROMAGNOLO B, BILLUART P, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 8847-8851.
- 167- CHAN DW, CHAN CY, YAM JW, CHING YP, NG IO. Prickle-1 negatively regulates Wnt/beta-catenin pathway by promoting Dishevelled ubiquitination/degradation in liver cancer. *Gastroenterology*, 2006; 131: 1218-1227.
- 168- COLNOT S, DECAENS T, NIWA-KAWAKITA M, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signalling and leads to hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 17216-17221.

- 169- SICKLICK JK, LI YX, JAYARAMAN A, et al. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2006; 27: 748-757.
- 170- KAPOSI-NOVAK P, LEE JS, GOMEZ-QUIROZ L, COULOUARN C, FACTOR VM, THORGEIRSSON SS. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest*, 2006; 116: 1582-1595.
- 171- YIN S, LI J, HU C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*, 2007; 120: 1444-1450.
- 172- CHIBA T, KITA K, ZHENG YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology*, 2006; 44: 240-251.
- 173- LEE JS, HEO J, LIBBRECHT L, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med*, 2006; 12: 410-416.
- 174- HU TH, HUANG CC, LIN PR, et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2003; 97: 1929-1940.
- 175- HE XC, YIN T, GRINDLEY JC, et al. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet*, 2007; 39: 189-198.
- 176- SHACHAF CM, KOPELMAN AM, ARVANITIS C, et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature*, 2004; 431: 1112-1117.
- 177- WANG Y, WU MC, SHAM JS, ZHANG W, WU WQ, GUAN XY. Prognostic significance of c-myc and A/B1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray. *Cancer*, 2002; 95: 2346-2352.
- 178- WILKENS L, FLEMMING P, GEBEL M, et al. Induction of aneuploidy by increasing chromosomal instability during dedifferentiation of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 1309-1314.
- 179- ZENDER L, SPECTOR MS, XUE W, FLEMMING P, CORDON-CARDO C, SILKE J, FAN ST, LUK JM, WIGLER M, HANNON GJ, MU D, LUCITO R, POWERS S, LOWE SW. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell*, 2006; 125: 1253-1267.
- 180- ANDERSSON SG, et al. The Genome sequence of *Rickettsia prowazeki* and the origin of mitochondria. *Nature*, 1998; 396: 133-140.
- 181- BROCKS JJ, et al. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science*, 1999; 285: 1033-1036.

- 182- ADAMS MD, et al. The genome sequence of drosophila melanogaster. *Science*, 2000; 287: 2185-2195.
- 183- VENTER JC, et al. The sequence of the human genome. *Science*, 2001; 291: 1304-1351.
- 184- TEITELBAUM DH, TUTTLE S, CAREY LC, et al. Fibrolamellar carcinoma of the liver. Review of three cases and the presentation of a characteristic set of tumor markers defining this tumor. *Ann Surg*, 1985; 202: 36-41.
- 185- PAYNE CM, NAGLE RB, PAPLANUS SH, et al. Fibrolamellar carcinoma of liver: a primary malignant oncocytic carcinoid? *Ultrastruc Pathol*, 1986; 10: 539-552.
- 186- SUBRAMONY C, HERRERA GA, LOCKARD V. Neuroendocrine differentiation in hepatic neoplasms: report of four cases. *Surg Pathol*, 1993; 5: 17-33.
- 187- SCHEUER PJ, LEFKOWITH JH. *Liver biopsy interpretation*. Elsevier-Saunders. Seventh Edition, 2005.
- 188- LEBRUN DP, SILVER MM, FREEDMAN MH, et al. Fibrolamellar carcinoma of the liver in a patient with Fanconi anemia. *Hum Pathol*, 1991; 22: 393-398.
- 189- GORES GJ. Cholangiocarcinoma. Current concept and insights. *Hepatology*, 2003; 37: 961-969.
- 190- KLATSKIN G. Adenocarcinoma of the hepatic duct at its bifurcation within the porta hepatis. An unusual tumor with distinctive clinical and pathological features. *Am J Med*, 1965; 38: 241-256.
- 191- SCHLINKERT RT, NAGORNEY DM, HEERDEN JA VAN, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: clinical aspects, pathology and treatment. *HPB Surg*, 1992; 5: 95-102.
- 192- Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 29-1987. *N Engl J Med*, 1987; 317: 153-160.
- 193- BLOUSTEIN PA. Association of carcinoma with congenital cystic conditions of the liver and bile ducts. *Am J Gastroenterol*, 1977; 67: 40-46.
- 194- BURNS CD, KUHNS JG, WIEMAN J. Cholangiocarcinoma in association with multiple biliary microhamartomas. *Arch Pathol Lab Med*, 1990; 114: 1287-1289.
- 195- YAMATO T, SASAKI M, HOSO M, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma arising in congenital hepatic fibrosis: report of an autopsy case. *J Hepatol*, 1998; 28: 717-722.
- 196- HASEBE T, SAKAMOTO M, MUKAI K, et al. Cholangiocarcinoma arising in bile duct adenoma with focal area of bile duct hamartoma. *Virchows Arch*, 1995; 426: 209-213.

- 197- KOBAYASHI M, IKEDA K, SAITOH S, et al. Incidence of primary cholangiocellular carcinoma of the liver in Japanese patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Cancer*, 2000; 88: 2471-2477.
- 198- LAU GKK, DAVIS GL, WU SPC, et al. Hepatic expression of hepatitis C virus RNA in chronic hepatitis C: a study by in situ reverse-transcription polymerase chain reaction. *Hepatology*, 1996; 23: 1318-1323.
- 199- CHOW LTC, AHUJA AT, KWONG KH, et al. Mucinous cholangiocarcinoma: an unusual complication of hepatolithiasis and recurrent pyogenic cholangitis. *Histopathology*, 1997; 30: 491-494.
- 200- TIHAN T, BLUMGART L, KILMSTRA DS. Clear cell papillary carcinoma of the liver: an unusual variant of peripheral cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*, 1998; 29: 196-200.
- 201- NAKAJIMA T, KNODO Y, MIYAZAKI M, et al. A histopathologic study of 102 cases of intrahepatic cholangiocarcinoma: histologic classification and modes of spreading. *Hum Pathol*, 1988; 19: 1228-1234.
- 202- WEINBREN K, MUTUM SS. Pathological aspects of cholangiocarcinoma. *J Pathol*, 1983; 139: 217-238.
- 203- BONETTI F, CHILOSI M, PISA R, et al. Epithelial membrane antigen expression in cholangiocarcinoma. An useful immunohistochemical tool for differential diagnosis with hepatocarcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1983; 401: 307-313.
- 204- PASTELERO GC, WAKABAYASHI T, OKA T, et al. Tissue polypeptide antigen-a marker antigen differentiating cholangiolar tumors from other hepatic tumors. *Am J Clin Pathol*, 1987; 87: 168-173.
- 205- JOVANOVIC R, JAGIRDAR J, THUNG SN, et al. Blood-group-related antigen Lewis-X and Lewis-Y in the differential diagnosis of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Arch Patol Lab Med*, 1989; 113: 139-142.
- 206- TERADA T, NAKANUMA Y. An immunohistochemical survey of amylase isoenzymes in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 1993; 117: 160-162.
- 207- MAEDA T, ADACHI E, KAJIYAMA K, et al. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: proposed criteria according to cytokeratin expression and analysis of clinicopathologic features. *Hum Pathol*, 1995; 26: 956-964.
- 208- HARATAKE J, HASHIMOTO H. An immunohistochemical analysis of 13 cases with combined hepatocellular and cholangiocellular carcinoma. *Liver*, 1995; 15: 9-15.
- 209- PAPOTTI M, SAMBATARO D, MARCHESA P, et al. A combined hepatocellular/cholangiocellular carcinoma with sarcomatoid features. *Liver*, 1997; 17: 47-52.

- 210- GOODMAN ZD, ISHAK KG, LANGLOSS JM, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. A histologic and immunohistochemical study. *Cancer*, 1985; 55: 124-135.
- 211- AZIZAH N, PARADINAS FJ. Cholangiocarcinoma coexisting with developmental liver cysts: a distinct entity different from liver cystadenocarcinoma. *Histopathology*, 1980; 4: 391-400.
- 212- THEISE ND, MILLER F, WORMAN HJ, et al. Biliary cystadenocarcinoma arising in a liver with fibropolycystic disease. *Arch Pathol Lab Med*, 1993; 117: 163-165.
- 213- LANDER JJ, STANLEY RJ, SUMNER HW, et al. Angiosarcoma of the liver associated with Fowler's solution (potassium arsenite). *Gastroenterology*, 1975; 68: 1582-1586.
- 214- HORTA JS. Late effects of thorotrast on the liver and spleen and their efferent lymph nodes. *Ann NY Acad Sci*, 1967; 145: 676-699.
- 215- VISFELDT J, POULSEN H. On the histopathology of liver and liver tumours in thorium-dioxide patients. *Acta Pathol Microbiol Scand A*, 1972; 80: 97-108.
- 216- WINBERG CD, RANCHOD M. Thorotrast induced hepatic cholangiocarcinoma and angiosarcoma. *Hum Pathol*, 1979; 10: 108-112.
- 217- Thomas LB, Popper H, Berk PD, et al. Vinyl-chloride-induced liver disease. From idiopathic portal hypertension (Banti's syndrome) to angiosarcomas. *N Engl J Med*, 1975; 292: 17-22.
- 218- PIMENTEL JC, MENEZES AP. Liver disease in vineyard sprayers. *Gastroenterology*, 1977; 72: 275-283.
- 219- HOCH-LIGETI C. Angiosarcoma of the liver associated with diethylstilbestrol. *JAMA*, 1978; 240: 1510-1511.
- 220- FALK H, THOMAS LB, POPPER H, et al. Hepatic angiosarcoma associated with androgenic-anabolic steroids. *Lancet*, 1979; 2: 1120-1123.
- 221- MONROE PS, RIDDELL RH, SIEGLER M, et al. Hepatic angiosarcoma. Possible relationship to long-term oral contraceptive ingestion. *JAMA*, 1981; 246: 64-65.
- 222- DANESHMEND TK, SCOTT GL, BRADFIELD JW. Angiosarcoma of liver associated with phenelzine. *Br Med J*, 1979; 1: 1679-1679.
- 223- CADRANEL JF, LEGENDRE C, DESAINT B, et al. Liver disease from surreptitious administration of urethane. *J Clin Gastroenterol*, 1993; 17: 52-56.
- 224- FORTWENGLER HP JR., JONES D, ESPINOSA E, et al. Evidence for endothelial cell origin of vinyl chloride-induced hepatic angiosarcoma. *Gastroenterology*, 1981; 80: 1415-1419.
- 225- MANNING JT JR., ORDONEZ NG, BARTON JH. Endothelial cell origin of thorium oxide-induced angiosarcoma of liver. *Arch Pathol Lab Mad*, 1983; 107: 456-458.

- 226- POPPER H, THOMAS LB, TELLES NC, et al. Development of hepatic angiosarcoma in man induced by vinyl chloride, thorotrast and arsenic. Comparison with cases of unknown etiology. *Am J Pathol*, 1978; 92: 349-369.
- 227- TAMBURRO CH, MAKK L, POPPER H. Early hepatic histologic alterations among chemical (vinyl monomer) workers. *Hepatology*, 1984; 4: 413-418.
- 228- ISHAK KG, SESTERHENN IA, GOODMAN ZD, et al. Epithelioid hemangioendothelioma of the liver: a clinicopathologic and follow-up study of 32 cases. *Hum Pathol*, 1984; 15: 839-852.
- 229- ISHAK KG. Malignant mesenchymal tumors of the liver. In: Okuda K, Ishak KG, eds. *Neoplasms of the Liver*, 1st edn. Tokyo: Springer-Verlag, 1987;159.
- 230- MAKHLOUF HR, ISHAK KG, GOODMAN ZD. Epithelioid hemangioendothelioma of the liver. A clinicopathologic study of 137 cases. *Cancer*, 1999; 85: 562-582.
- 231- EKFORIS TO, JOENSUU K, TOIVIO I, et al. Fatal epithelioid haemangioendothelioma presenting in the lung and liver. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1986; 410: 9-16.
- 232- DEAN PJ, HAGGITT RC, O'HARA CJ. Malignant epithelioid hemangioendothelioma of the liver in young women. Relationship to oral contraceptive use. *Am J Surg Pathol*, 1985; 9: 695-704.
- 233- DEMETRIS AJ, MINERVINI M, RAIKOW RB, et al. Hepatic epithelioid hemangioendothelioma. Biological questions bases on pattern of recurrence in an allograft and tumor immunophenotype. *Am J Surg Pathol*, 1997; 21: 263-270.
- 234- SCOAZEC J-Y, DEGOTT C, REYNES M, et al. Epithelioid hemangioendothelioma of the liver: an ultrastructural study. *Hum Pathol*, 1989; 20: 673-681.
- 235- Utz DC, Warren MM, Gregg JA, et al. Reversible hepatic dysfunction associated with hypernephroma. *Mayo Clin Proc*, 1970; 45: 161-169.
- 236- STRICKLAND RC, SCHENKER S. The nephrogenic hepatic dysfunction syndrome: a review. [Review]. *Am J Dig Dis*, 1977; 22: 49-55.
- 237- TAL LC, DONAT EE, HO CS, et al. Percutaneous fine-needle aspiration biopsy of the liver. Cytodiagnosis of hepatic cancer. *Acta Cytol*, 1979; 23: 287-291.
- 238- AXE SR, EROZAN YS, ERMATINGER SV. Fine-needle aspiration of the liver. A comparison of smear and rinse preparations in the detection of cancer. *Am J Clin Pathol*, 1986; 86: 281-285.
- 239- ATTERBURY CE, ENRIQUEZ RE, DESUTO-NAGY GI, et al. Comparison of the histologic and cytologic diagnosis of liver biopsies in hepatic cancer. *Gastroenterology*, 1979; 76: 1352-1357.
- 240- GERBER MA, THUNG SN, BODENHEIMER HC Jr., et al. Characteristic histologic triad in liver adjacent to metastatic neoplasm. *Liver*, 1986, 6: 85-88.

- 241- GLEES JP, THOMAS M, REDDING WH, et al. Liver biopsy at lymphoma laparotomy [letter]. *Lancet*, 1978; 1: 210-211.
- 242- KIM H, DORFMAN RF, ROSENBERG SA. Pathology of malignant lymphomas of the liver: application in staging. In: Popper H, Schaffner F, eds. *Progress in Liver Diseases*, Vol. V, 1st edn. New York: Grune & Stratton, 1976; 683.
- 243- LESLIE KO, COLBY TV. Hepatic parenchymal lymphoid aggregates in Hodgkin's disease. *Hum Pathol*, 1984; 15: 808-809.
- 244- ABT AB, KIRSCHNER RH, BELLIVEAU RE, et al. Hepatic pathology associated with Hodgkin's disease. *Cancer*, 1974; 33: 1564-1571.
- 245- BRUGUERA M, CABALLERO T, CARRERAS E, et al. Hepatic sinusoidal dilatation in Hodgkin's disease. *Liver*, 1987; 7: 76-80.
- 246- PERERA DR, GREENE ML, FENSTER LF. Cholestasis associated with extrabiliary Hodgkin's disease. Report of three cases and review of four others. *Gastroenterology*, 1974; 67: 680-685.
- 247- HUBSCHER SG, LUMLEY MA, ELIAS E. Vanishing bile duct syndrome: a possible mechanism for intrahepatic cholestasis in Hodgkin's lymphoma. *Hepatology*, 1993; 17: 70-77.
- 248- LEFKOWITCH JH, FALKOW S, WHITLOCK RT. Hepatic Hodgkin's disease simulating cholestatic hepatitis with liver failure. *Arch Pathol Lab Med*, 1985; 109: 424-426.
- 249- WOLF-PEETERS C De. Liver involvement in lymphomas. *Ann Diagn Pathol*, 1998; 2: 363-369.
- 250- TRUDEL M, ARAMENDI T, CAPLAN S. Large-cell lymphoma presenting with hepatic sinusoidal infiltration. *Arch Pathol Lab Med*, 1991; 115: 821-824.
- 251- DUBOIS A, DAUZAT M, PIGNODEL C, et al. Portal hypertension in lymphoproliferative and myeloproliferative disorders: hemodynamic and histological correlations. *Hepatology*, 1993; 17: 246-250.
- 252- SALÓ J, NOMDEDEU B, BRUGUERA M, et al. Acute liver failure due to non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Gastroenterol*, 1993; 88: 774-776.
- 253- VERDI CJ, GROGAN TM, PROTELL R, et al. Liver biopsy immunotyping to characterize lymphoid malignancies. *Hepatology*, 1986; 6: 6-13.
- 254- FREEMAN C, BERG JW, CUTLER SJ. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer*, 1972; 29: 252-260.
- 255- ZAFRANI ES, GAULARD P. Primary lymphoma of the liver. *Liver*, 1993; 13: 57-61.
- 256- STEMMER S, GEFFEN DB, GOLDSTEIN J, et al. Primary small noncleaved cell lymphoma of the liver. *J Clin Gastroenterol*, 1993; 16: 65-69.

- 257- MAES M, DEPARDIEU C, DARGENT J-L, et al. Primary low-grade B-cell lymphoma of MALT-type occurring in the liver: a study of two cases. *J Hepatol*, 1997; 27: 922-927.
- 258- ISAACSON PG, BANKS PM, BEST PV, et al. Primary low-grade hepatic B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type. *Am J Surg Pathol*, 1995; 19: 571-575.
- 259- SCOAZEC J-Y, DEGOTT C, BROUSSE N, et al. Non-Hodgkin's lymphoma presenting as a primary tumor of the liver: presentation, diagnosis and outcome in eight patients. *Hepatology*, 1991; 13: 870-875.
- 260- KIM JH, KIM HY, KANG I, et al. A case of primary hepatic lymphoma with hepatitis C liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol*, 2000; 95: 2377-2380.
- 261- RASUL I, SHEPHERD FA, KAMEL-REID S, et al. Detection of occult low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma in patient's with chronic hepatitis C infection and mixed cryoglobulinemia. *Hepatology*, 1999; 29: 543-547.
- 262- OHSHIMA K, HARAOKA S, HARADA N, et al. Hepatosplenic $\gamma\delta$ T-cell lymphoma: relation to Epstein-Barr virus and activated cytotoxic molecules. *Histopathology*, 2000; 36: 127-135.
- 263- SUAREZ F, WLODARSKI I, RIGAL-HUGUET F, et al. Hepatosplenic $\alpha\beta$ T-cell lymphoma. An unusual case with clinical, histologic and cytogenetic features of $\gamma\delta$ hepatosplenic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 2000; 24: 1027-1032.
- 264- THOMAS FB, CLAUSEN KP, GREENBERGER NJ. Liver disease in multiple myeloma. *Arch Intern Med*, 1973; 132: 195-202.
- 265- WEICHHOLD W, LABOUYRIE E, MERLIO JP, et al. Primary extramedullary plasmacytoma of the liver. A case report. *Am J Surg Pathol*, 1995; 19: 1197-1202.
- 266- BROOKS AP. Portal hypertension in Waldenstrom's macroglobulinaemia. *Br Med J*, 1976; 1: 689-690.
- 267- LEVY S, CAPRON D, JOLY J-P, et al. Hepatic nodules as single organ involvement in an adult with Langerhans cell granulomatosis. *J Clin Gastroenterol*, 1998; 26: 69-73.
- 268- FOSCHINI MP, MILANDRI GL, DINA RE, et al. Benign regressing histiocytosis of the liver. *Histopathology*, 1995; 26: 363-366.
- 269- KAPLAN KJ, GOODMAN ZD, ISHAK KG. Liver involvement in Langerhans' cell histiocytosis: a study of nine cases. *Mod Pathol*, 1999; 12: 370-378.
- 270- YAM LT, CHAN CH, LI CY. Hepatic involvement in systemic mast cell disease. *Am J Med*, 1986; 80: 819-826.

- 271- SCHEIMBERG IB, POLLOCK DJ, COLLINS PW, et al. Pathology of the liver in leukaemia and lymphoma. A study of 110 autopsies. *Histopathology*, 1995; 26: 311-321.
- 272- SCHWARTZ JB, SHAMSUDDIN AM. The effects of leukemic infiltrates in various organs in chronic lymphocytic leukemia. *Hum Pathol*, 1981; 12: 432-440.
- 273- ROQUET ML, ZAFRANI ES, FARCET JP, et al. Histopathological lesions of the liver in hairy cell leukaemia: a report of 14 cases. *Hepatology*, 1985; 5: 496-500.
- 274- YAM LT, JANCKILA AJ, CHAN CH, et al. Hepatic involvement in hairy cell leukaemia. *Cancer*, 1983; 51: 1497-1504.
- 275- ZAFRANI ES, DEGOS F, GUIGUI B, et al. The hepatic sinusoid in hairy cell leukemia: an ultrastructural study of 12 cases. *Hum Pathol*, 1987; 18: 801-807.
- 276- GROULS V, STIENS R. Hepatic involvement in hairy cell leukaemia: diagnosis by tartrate-resistant acid phosphatase enzyme histochemistry on formalin fixed and paraffin-embedded liver biopsy specimens. *Pathology. Res Pract*, 1984; 178: 332-334.
- 277- WHEELER DA, EDMONDSON HA, REYNOLDS TB. Spontaneous liver cell adenoma in children. *Am J Clin Pathol*, 1986; 85: 6-12.
- 278- RESNICK MB, KOZAKIEWICH HPW, PEREZ-ATAYDE AR. Hepatic adenoma in the pediatric age group. Clinicopathological observations and assessment of cell proliferative activity.
- 279- JANES CH, MCGILL DB, LUDWIG J, et al. Liver cell adenoma at the age of 3 years and transplantation 19 years later after development of carcinoma: a case report. *Hepatology*, 1993; 17: 583-585.
- 280- MORAN CA, MULLICK FG, ISHAK KG. Nodular regenerative hyperplasia of the liver in children. *Am J Surg Pathol*, 1991; 15: 449-454.
- 281- SROUJI MN, CHATTEN J, SCHULMAN WM, et al. Mesenchymal hamartoma of the liver in infants. [Review]. *Cancer*, 1978; 42: 2483-2489.
- 282- STOCKER JT, ISHAK KG. Mesenchymal hamartoma of the liver: report of 30 cases and review of the literature. *Ped Pathol*, 1983; 1: 245-267.
- 283- COOK JR, PFEIFER JD, DEHNER LP. Mesenchymal hamartoma of the liver in the adult: association with distinct clinical features and histological changes. *Hum Pathol*, 2002; 33: 893-898.
- 284- LAUWERS GY, GRANT LD, DONNELLY WH, et al. Hepatic undifferentiated (embryonal) sarcoma arising in a mesenchymal hamartoma. *Am J Surg Pathol*, 1997; 21: 1248-1254.
- 285- DEHNER LP, ISHAK KG. Vascular tumors of the liver in infants and children. A study of 30 cases and review of the literature. *Arch Pathol*, 1981; 92: 101-111.

- 286- SELBY DM, STOCKER JT, WACLAWIWI MA, et al. Infantile hemangioendothelioma of the liver. *Hepatology*, 1994; 20: 39-45.
- 286a- DIMASHKIEH HH, M. JQ, WYATT-ASHMEAD J, COLLINS MH. Pediatric hepatic angiosarcoma: case report and review of the literature. *Pediatr Dev Pathol*, 2004; 7: 527-532.
- 287- DACHMAN AH, LICHTENSTEIN JE, FRIEDMAN AC, et al. Infantile hemangioendothelioma of the liver: a radiologic-pathologic-clinical correlation. *AJR*, 1983; 140: 1091-1096.
- 288- DARBARI A, SABIN KM, SHAPIRO CN, et al. Epidemiology of primary hepatic malignancies in U.S. children. *Hepatology*, 2003; 38: 560-566.
- 289- STOCKER JT, ISHAK KG. Hepatoblastoma. In: Okuda K, Ishak KG, eds. *Neoplasms of the liver*, 1st edn. Tokyo: Springer-Verlag, 1987,127.
- 290- ISHAK KG, GLUNZ PR. Hepatoblastoma and hepatocarcinoma in infancy and childhood. Report of 47 cases. *Cancer*, 1967; 20: 396-422.
- 291- LACK EE, NEAVE C. VAWTER GF. Hepatoblastoma. A clinical and pathologic study of 54 cases. *Am J Surg Pathol*, 1982; 6: 693-705.
- 292- KASAI M, WATANABE I. Histologic classification of liver cell carcinoma in infancy and childhood and its clinical evaluation. *Cancer*, 1970; 25: 551-563.
- 293- WEINBERG AG, FINEGOLD MJ. Primary hepatic tumors of childhood. [Review]. *Hum Pathol*, 1983; 14: 512-537.
- 294- RUGGE M, SONEGO F, POLLICE L, et al. Hepatoblastoma: DNA nuclear content, proliferative indices and pathology. *Liver*, 1998; 18: 128-133.
- 295- GONZALEZ-CRUSSI F, UPTON MP, MAURER HS. Hepatoblastoma. Attempt at characterization of histologic subtypes. *Am J Surg Pathol*, 1982; 6: 599-612.
- 296- ABENOZA P, MANIVEL JC, WICK MR, et al. Hepatoblastoma: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Hum Pathol*, 1987; 18: 1025-1035.
- 297- STOCKER JT, ISHAK KG. Undifferentiated (embryonal) sarcoma of the liver: report of 31 cases. *Cancer*, 1978; 42: 336-348.
- 298- KEATING S, TAYLOR GP. Undifferentiated (embryonal) sarcoma of the liver: ultrastructural and immunohistochemical similarities with malignant fibrous histiocytoma. *Hum Pathol*, 1985; 16: 693-699.
- 299- AOYAMA C, HACHITANDA Y, SATO JK, et al. Undifferentiated (embryonal) sarcoma of the liver. A tumor of uncertain histogenesis showing divergent differentiation. *Am J Surg Pathol*, 1991; 15: 615-624.

- 300- LACK EE, SCHLOO BL, AZUMI N, et al. Undifferentiated (embryonal) sarcoma of the liver. Clinical and pathologic study of 16 cases with emphasis on immunohistochemical features. *Am J Surg Pathol*, 1991; 15: 1-16.
- 300a- HEEREMA-MCKENNEY A, LEUSCHNER I, SMITH N, et al. Nested stromal epithelial tumor of the liver. Six cases of a distinctive pediatric neoplasm with frequent calcifications and association with Cushing syndrome. *Am J Surg Pathol*, 2005; 29: 10-20.
- 300b- HILL DA, SWANSON PE, ANDERSON K et al. Desmoplastic nested spindle cell tumor of liver. Report of four cases of a proposed new entity. *Am J Surg Pathol*, 2005; 29: 1-9.
- 301- MILLS AE. Undifferentiated primary hepatic non-Hodgkin's lymphoma in childhood. *Am J Surg Pathol*, 1988; 12: 721-726.
- 302- CATURELLI E, SOMI L, ANTI M, et al. Ultrasound guided fine needle biopsy of early hepatocellular carcinoma complicating liver cirrhosis: a multicentre study. *Gut*, 2004; 53: 1356-1362.
- 303- BOTTLES K, COHEN MB. An approach to fine-needle aspiration biopsy diagnosis of hepatic masses. *Diagn Cytopathol*, 1991; 7: 204-210.
- 304- FRIAS-HIDVEGI D. *Guides to Clinical Aspiration Biopsy. Liver and Pancreas*. New York & Tokio: Igaku-Shoin, 1988: 27-42.
- 305- SUEN KC. Diagnosis of primary hepatic neoplasms by fine needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*, 1986; 2: 99-109.
- 306- PERRY MD, JOHNSON WW. Needle biopsy of the liver for the diagnosis of nonneoplastic liver disease. *Acta Cytol*, 1985; 29: 385-390.
- 307- TAO L-C. Are oral contraceptive-associated liver cell adenomas premalignant? *Acta Cytol*, 1992; 36: 338-344.
- 308- RUSCHENBERG I, DROESE M. Fine needle aspiration cytology of local nodular hyperplasia of the liver. *Acta Cytol*, 1989; 33: 857-860.
- 309- TAAVITSAINEN M, AIRAKSININ T, KREULA J, et al. Fine-needle aspiration biopsy of liver hemangioma. *Acta Radiol*, 1990; 31: 69-71.
- 310- YANG GCH, YANG G-Y, TAL L-C. Distinguishing well-differentiated hepatocellular carcinoma from benign liver by the physical features of fine-needle aspirates. *Mod Pathol*, 2004; 17: 798-802.
- 311- PEDIO G, LANDOLT U, ZOBELI L, et al. Fine needle aspiration of the liver. Significance of hepatocytic naked nuclei in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Acta Cytol*, 1988; 32: 437-442.

- 312- COHEN MB, HABER MM, HOLLY EA, et al. Cytologic criteria to distinguish hepatocellular carcinoma from non-neoplastic liver. *Am J Clin Pathol*, 1990; 93: 444.
- 313- WEE A, NILSSON B, CHAN-WILDE C, et al. Fine needle aspiration biopsy of hepatocellular carcinoma: some unusual features. *Acta Cytol*, 1991; 35: 661-670.
- 314- DONAT EE, ANDERSON V, TAL L-C. Cytodiagnosis of clear cell hepatocellular carcinoma. A case report. *Acta Cytol*, 1991; 35: 671-675.
- 315- NGUYEN G-K. Fine-needle aspiration biopsy cytology of hepatic tumors in adults. *Pathol Annu*, 1986; 21: 321-349.
- 316- DAVENPORT RD. Cytologic diagnosis of fibrolamellar carcinoma of the liver by fine-needle aspiration. *Diagn Cytopathol*, 1990; 6: 275-279.
- 317- WAKELY PEJ, SILVERMAN JF, GEISINGER KR, et al. Fine needle aspiration cytology of hepatoblastoma. *Mod Pathol*, 1990; 3: 688-693.
- 318- DEKMEZIAN R, SNEIGI N, PAPOK S, et al. Fine needle aspiration cytology of pediatric patients with primary hepatic tumors. *Diagn Cytopathol*, 1988; 4: 162-168.
- 319- SALEH HA, TAO LC. Hepatic angiosarcoma: aspiration biopsy cytology and immunocytochemical contribution. *Diagn Cytopathol*, 1988; 18: 208-211.
- 320- SIDDIQUI MT, REDDY VB, CASTELLI MJ, et al. Role of fine-needle aspiration in clinical management of transplant patients. *Diagn Cytopathol*, 1997; 17: 429-435.
- 321- FLANDERS E, KORNSTEIN M, WAKELY P, et al. Lymphoglandular bodies in fine-needle aspiration cytology smears. *Am J Clin Pathol*, 1993; 99: 566-569.
- 322- KU N-O, GISH R, WRIGHT TL, et al. Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease. *N Engl J Med*, 2001; 344: 1580-1587.
- 323- KAKAR S, BATTS KP, POTERUCHA JJ, et al. Histologic changes mimicking biliary disease in liver biopsies with venous outflow impairment. *Mod Pathol*, 2004; 17: 874-878.
- 324- BURT AD, MACSWEEN RN. Hepatic vein lesions in alcoholic liver disease: retrospective biopsy and necropsy study. *J Clin Pathol*, 1986; 39: 63-67.
- 325- NAKANUMA Y, OHTA G, DOISHITA K. Quantitation and serial section observations of focal venoocclusive lesions of hepatic veins in liver cirrhosis. *Virchows Arch (A)*, 1985; 405: 429-438.
- 326- WANLESS IR, WONG F, BLENDIS LM, et al. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology*, 1995; 21: 1238-1247.

- 327- CHOO Q-L, KUO G, WEINER AM, JONES DB, et al. Isolation of Ac DNA clone derived from A blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989; 244: 359-362.
- 328- DEUGNIER Y, TURLIN B, LE QUILLEUC D, et al. A reappraisal of hepatic siderosis in patients with end-stage cirrhosis: practical implications for the diagnosis of hemochromatosis. *Am J Surg Pathol*, 1997; 21: 669-675.
- 329- MCGUINNESS PH, BISHOP GA, PAINTER DM, et al. Intrahepatic hepatitis C RNA levels do not correlate with degree of liver injury in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1996; 23: 676-687.
- 330- MEHROTRA R, PANDEY RK, NATH P. Hepatic copper in Indian childhood cirrhosis. *Histopathology*, 1981; 5: 659-665.
- 331- MÜLLER T, LANGNER C, FUCHSBICHLER A, et al. Immunohistochemical analysis of Mallory bodies in Wilsonian and non-Wilsonian hepatic copper toxicosis. *Hepatology*, 2004; 39: 963-969.
- 332- SCIOT R, STAESSEN D, DAMME B VAN, et al. Incomplete septal cirrhosis: histopathologic aspects. *Histopathology*, 1988; 13: 593-603.
- 333- LOPEZ JI. Does incomplete septal cirrhosis link non-cirrhotic nodulations with cirrhosis? *Histopathology*, 1989; 15: 318-320.
- 334- BERNARD P-H, LE BAIL B, CRANSAC M, et al. Progression from idiopathic portal hypertension to incomplete septal cirrhosis with liver failure requiring liver transplantation. *J Hepatol*, 2004; 22: 495-499.
- 335- NAKANUMA Y, HOSO M, SASAKI M, et al. Histopathology of the liver in non-cirrhotic portal hypertension of unknown etiology. *Histopathology*, 1996; 28: 195-204.
- 336- NEVENS F, STAESSEN D, SCIOT R, et al. Clinical aspects of incomplete septal cirrhosis in comparison with macronodular cirrhosis. *Gastroenterology*, 1994; 106: 459-463.
- 337- ISHAK K, BAPTISTA A, BIANCHI L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*, 1995; 22: 696-699.
- 338- FRIEDMAN SL. Liver fibrosis from bench to bedside. *J Hepatol*, 2003; 38: S38-S53.
- 339- International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology*, 1995; 22: 983-993.
- 340- RYDER SD. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut*, 2004; 53: 451-455.

- 341- FONTAINE H, NALPAS B, POULET B, et al. Hepatitis activity index is a key factor in determining the natural history of chronic hepatitis C. *Hum Pathol*, 2001; 32: 904-909.
- 342- GIANNINI E, CEPPA P, BOTTA F, et al. Previous hepatitis B virus infection is associated with worse disease stage and occult hepatitis B virus infection has low prevalence and pathogenicity in hepatitis C virus-positive patients. *Liver Int*, 2003; 23: 12-18.
- 343- POYNARD T, MATHURIN P, LAI CL, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol*, 2003; 38: 257-265.
- 344- WEBSTER G, BARNES E, BROWN D, et al. HCV genotypes-role in pathogenesis of disease and response to therapy. *Best pr Res Clin Gastroenterol*, 2000; 14: 229-240.
- 345- ROFFI L, REDAELLI A, COLLOREDO G, et al. Outcome of liver disease in a large cohort of histologically proven chronic hepatitis C: influence of HCV genotype. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001; 13: 501-506.
- 346- IMBERT-BISMUT F, RATZIU V, PIERONI L, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*, 2001; 357: 1069-1075.
- 347- AFDHAL NH. Diagnosing fibrosis in hepatitis C: is the pendulum swinging from biopsy to blood tests? *Histopathology*, 2003; 37: 972-974.
- 348- PERSICO M, PERSICO E, SUOZZO R, et al. natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology*, 2000; 118: 760-764.
- 349- NUTT AK, HASSAN HA, LINDSEY J, et al. Liver biopsy in the evaluation of patients with chronic hepatitis C who have repeatedly normal or near-normal serum alanine aminotransferase levels. *Am J Med*, 2000; 109: 62-64.
- 350- KYRLAGKITSIS I, PORMANN B, SMITH H, et al. Liver histology and progression of fibrosis in individuals with chronic hepatitis C and persistently normal ALT. *Am J Gastroenterol*, 2003; 98: 1588-1593.
- 351- DIENSTAG JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2002; 36: S152-S160.
- 352- QUEREDA C, MORENO S, MORENO L, et al. The role of liver biopsy in the management of chronic hepatitis C in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Hum Pathol*, 2004; 35: 1083-1087.
- 353- BACH N, THUNG SN, SCHAFFNER F. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology*, 1992; 15: 572-577.

- 354- KAJI K, NAKANUMA Y, SASAKI M, et al. Hepatitic bile duct injuries in chronic hepatitis C: histopathologic and immunohistochemical studies. *Mod Pathol*, 1994; 7: 937-945.
- 355- HARUNA Y, KANDA T, HONDA M, et al. Detection of hepatitis C virus in the bile and bile duct epithelial cells of hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology*, 2001; 33: 977-980.
- 356- DELLADETSIMA JK, MAKRIS F, PSICHOGIOU M, et al. Cholestatic syndrome with bile duct damage and loss in renal transplant recipients with HCV infection. *Liver*, 2001; 21: 81-88.
- 357- KUMAR KS, SABOORIAN MH, LEE WM. Cholestatic presentation of chronic hepatitis C: a clinical and histological study with a review of the literature. *Dig Dis Sci*, 2001; 46: 2066-2073.
- 358- GAYA DR, THORBURN D, OIEN KA, et al. Hepatic granulomas: a 10 year single centre experience. *J Clin Pathol*, 2003; 56: 850-853.
- 359- OZARAS R, TAHAN V, MERT A, et al. The prevalence of hepatic granulomas in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol*, 2004; 38: 449-452.
- 360- LEFKOWITCH JH, SCHIFF ER, DAVIS GL, et al. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 1993; 104: 595-603.
- 361- SHERMAN KE, LEWEY SM, GOODMAN ZD. Talc in the liver of patients with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol*, 1995; 90: 2164-2166.
- 362- BONKOVSKY HL, TROY N, MCNEAL K, et al. Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol*, 2002; 37: 848-854.
- 363- MARTINELLI AL, RAMALHO LN, ZUCOLOTO S. Hepatic stellate cells in hepatitis C patients: relationship with liver iron deposits and severity of liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004; 19: 91-98.
- 364- PIRISI M, SCOTT CA, AVELLINI C, et al. Iron deposition and progression of disease in chronic hepatitis C. Role of interface hepatitis, portal inflammation, and HFE missense mutations. *Am J Clin Pathol*, 2000; 113: 546-554.
- 365- METWALLY MA, ZEIN CO, ZEIN NN. Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol*, 2004; 99: 286-291.
- 366- WYATT J, BAKER H, PRASAD P, et al. Steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pathol*, 2004; 57: 402-406.

- 367- FARTOUX L, CHAZOULLIERES O, WENDUM D, POUPON R, SERFATY L. Impact of steatosis on progression of fibrosis in patients with mild hepatitis C. *Hepatology*, 2005; 41: 82-87.
- 368- ADINOLFI LE, GAMBARDELLA M, ANDREANA A, et al. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology*, 2001; 33: 1358-1364.
- 369- MONTO A, ALONZO J, WATSON JJ, et al. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology*, 2002; 36: 729-736.
- 370- SANYAL AJ, CONTOS MJ, STERLING RK, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with hepatitis C is associated with features of the metabolic syndrome. *Am J Gastroenterol*, 2003; 98: 2064-2071.
- 371- HU KQ, KYULO NL, ESRAILIAN E, et al. Overweight and obesity, hepatic steatosis, and progression of chronic hepatitis C: a retrospective study on a large cohort of patients in the United States. *J Hepatol*, 2004; 40: 147-154.
- 372- RUBBIA-BRANDT L, QUADRI R, ABID K, et al. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol*, 2000; 33: 106-115.
- 373- SERFATY L, ANDREANI T, GIRAL P, et al. Hepatitis C virus induced lipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol*, 2001; 34: 428-434.
- 374- COLLOREDO G, SONZOGNI A, RUBBIA-BRANDT L, et al. Hepatitis C virus genotype 1 associated with massive steatosis of the liver and hypo- β -lipoproteinemia. *J Hepatol*, 2004; 40: 562-563.
- 375- HOFER H, BANKL HC, WRBA F, et al. Hepatocellular fat accumulation and low serum cholesterol in patients infected with HCV-3a. *Am J Gastroenterol*, 2002; 97: 2880-2885.
- 376- KUMAR D, FARRELL GC, FUNG C, et al. Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: Reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. *Hepatology*, 2002; 36: 1266-1272.
- 377- LONARDO A, ADINOLFI LE, LORIA P, et al. Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology*, 2004; 126: 586-597.
- 378- CLOUSTON AD, JONSSON JR, PURDIE DM, et al. Steatosis and chronic hepatitis C: analysis of fibrosis and stellate cell activation. *J Hepatol*, 2001; 34: 314-320.
- 379- VERSLYPE C, NEVENS F, SINELLI N, et al. Hepatic immunohistochemical staining with a monoclonal antibody against HCV-E2 to evaluate antiviral therapy and reinfection of liver grafts in hepatitis C viral infection. *J Hepatol*, 2003; 38: 208-214.

- 380- HOOFRING A, BOITNOTT J, TORBENSON M. Three-dimensional reconstruction of hepatic bridging fibrosis in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol*, 2003; 39: 738-741.
- 381- VALENTI L, PULIXI EA, et al. Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and hepatitis C virus (HCV) in the pathogenesis of altered iron regulation in HCV chronic hepatitis. *Haematologica /The Hematology Journal*, 2007; 92: 1037-1042.
- 382- LU LING, LI C, et al. Complete genomes of hepatitis C virus (HCV) subtypes 6c, 6l, 6o, 6p and 6q: completion of a full panel of genomes for HCV genotype 6. *Jornal of General Virology*, 2007; 88: 1519-1525.
- 383- KISHIMOTO T, YANO T, et al. A case of α -fetoprotein-producing pulmonary carcinoma with restricted expression of hepatocyte nuclear factor-4 α in hepatoid foci: a case report with studies of previous cases. *Human Pathology*, 2008; 39: 1115-1120.
- 384- ARTANDI SE. Telomeres, telomerase, and Human Disease. N. England. *JMED* 355:1195-1197. Sept. 21, 2006. Number 12.
- 385- BLASCO MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, AV6 2005; 6(8): 611-622.
- 386- MARGULIS L, SAGAN D. Una teoría sobre el origen de las especies. Editorial Kairós, S.A. España. 2003. Primera Edición.
- 387- BLASCO MA, et al. *Genes and development*, 1999; 13: 2353-2359.
- 388- ROJAS W. *Inmunología. Corporación para investigaciones biológicas. Colombia. Decimocuarta edición. 2007.*
- 389- XI-XIAN Y, LEI Y, ZHONG-CHENG S. The expression of h TERT m RNA and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. *World J Gastroenterol*, 2002; 8(4): 586-590.
- 390- EL-SERAG HB. Hepatocellular carcinoma. The new epidemic in: Keeffe, Emmet B, Solís-Herruzo, José A. *EDS 10 th Post-Graduate Course Advances in gastroenterology and hepatology. Libro de resúmenes. Editores Médicos S.A. Edinsa S.A. Madrid, 2003: 101-112.*
- 391- ROTH AB, et al. Telomere Loss, Senescence, and Genetic instability in CD4+, Tlymphocytes overexpressing h TERT. *Blood*, Jul 1 2005; 106(1): 43-50.
- 392- JAKUPCIAK JP. Real-time telomerase activity measurements for detection of cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, Sep 2005; 5(5): 745-753.
- 393- PINZON-CHARRY A, MAXWELL T, LÓPEZ JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: A mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol*, Oct 2005; 83(5): 451-461.

- 394- WALLACE DL, BERARD M, SOARES MV, OLDHAM J, COOK JE, AKBAR AN, TOUGH DF, BEVERLEY PC. Prolonged exposure of naïve CD8 TS cells to interleukin-7 or interleukin-15 stimulates proliferation without differentiation or loss of telomere length. *Immunology*, Oct 2006; 119(2): 243-253.
- 395- MENZEL O, MIGLIACCIO M, GOLDSTEIN DR, DAHOUN S, DELORENZI M, RUFER N. Mechanisms regulating the proliferative potential of human CD8+ T lymphocytes overexpressing telomerase. *J Immunol*, 2006 Sep 15; 177(6): 3657-3668.
- 396- MIZUKOSHI E, NAKAMOTO Y, MARAKAWA Y, ARAI K, YAMASHITA T, TSUJI H, KUZUSHIMA K, TAKIGUCHI M, KANEKO S. Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2006 Jun; 43(6): 1284-1294.
- 397- LIN X, ZHOU C, WANG S, WANG D, MA W, LIANG X, LIN C, WANG Z, LI J, GUO S, ZHANG Y, ZHANG S. Enhanced antitumor effect against human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by vaccination with chemotactic-hTERT gene-modified tumor cell and the combination with anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Int J Cancer*, 2006 Oct 15; 119(8): 1886-1896.
- 398- ADOTEVI O, MOLLIER K, NEUVEUT C, CARDINAUD S, BOULANGER E, MIGNEN B, FRIDMAN WH, ZANETTI M, CHARNEAU P, TARTOUR E, LEMONNIER F, LANGLADE-DEMOYEN P. Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res*, 2006 May 15; 12(10): 3158-3167.
- 399- BARSOV EV, ANDERSEN H, COALTER VJ, CARRINGTON M, LIFSON JD, OTT DE. Capture of antigen-specific T lymphocytes from human blood by selective immortalization to establish long-term T-cell lines maintaining primary cell characteristics. *Immunol Lett*, 2006 May 15; 105(1): 26-37. Epub 2005 Dec 21.
- 400- CORNET S, MENEZ-JAMET J, LEMONNIER F, KOSMATOPOULOS K, MICONNET I. CpG oligodeoxynucleotides activate dendritic cells in vivo and induce a functional and protective vaccine immunity against a TERT derived modified cryptic MHC class I-restricted epitope. *Vaccine*, 2006 Mar 10; 24(11): 1880-1888. Epub 2005 Oct 28.
- 401- FILACI G, FRAVEGA M, SETTI M, TRAVERSO P, MILLO E, FENOGLIO D, NEGRINI S, FERRERA F, ROMAGNOLI A, BASSO M, CONTINI P, RIZZI M, GHIO M, BENATTI U, DAMONTE G, RAVETTI JL, CARMIGNAMI G, ZANETTI M, INDIVERI F. Frequency of telomerase-specific CD8+ T lymphocytes in patients with cancer. *Blood*, 2006 Feb 15; 107(4): 1505-12. Epub 2005 Oct 25.
- 402- SCHREURS MW, HERMSEN MA, GELTINK RI, SCHOLTEN KB, BRINK AA, KUETER EW, TIJSSEN M, MEIJER CJ, YLSTRA B, MEIJER GA, HOOIJBERG E. Genomic stability and functional activity may be lost in telomerase-transduced human CD8+ T lymphocytes. *Blood*, 2005 Oct 15; 106(8): 2663-2670. Epub 2005 Jul 5.

- 403- MA, STEPHANIE, CHAN KWOK-WAH, HULIANG, LEE TERENCE KIN-WAH, WO JANA YIM-HUNG, NG. IRENE OI-LIN, ZHENG BO-JIAN and GUAN XIN-YUAN. Identification and characterization of Tumorigenic Liver Cancer Stem / Progenitor Cells. *Gastroenterology*. 2007; 132: 2542-2556.
- 404- CLEMENTE RICOTE, Gerardo; RODÉS TEIXIDOR, Juan; CASADO GÓMEZ, Miguel A. *Hepatología en España, presente y futuro. Importancia de la gestión clínica como herramienta para su desarrollo*. Golead Sciences S.L. Primera Edición: mayo 2007.
- 405- TAHARA Hidetoshi, NAKANISHI Toshio, et al. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Research*, 1995; 55: 2734-2736.
- 406- Oh BONG-KYEONG, Kim HAERYOUNG, et al. High telomerase activity and long telomeres in advanced hepatocellular carcinomas with poor prognosis. *Laboratory Investigation*, 2008; 88: 144-152.
- 407- SHIPITSIN Michail, POLYAK Kornelia. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Laboratory Investigation*, 2008; 88: 459-463.
- 408- FURUKAWA H, et al. Living- Donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2006; 13: 393.
- 409- GOIN JE, et al. Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with intrahepatic yttrium 90 microspheres. *Juasc Interv Radiol*, 2005; 16: 161.
- 410- PARIKH S, HYMAN D. Hepatocellular cancer: a guide for the internist. *Am J Med*, 2007; 120: 194.
- 411- STEEL JL, et al. Clinically meaningful changes in health-related quality of-life in patients with hepatobiliary cancer. *Ann Oncol*, 2006; 17: 304.
- 412- THORGEIRSSON, S; et al. Molecular prognostication of liver cancer: end of the beginning. *J Hepatol*, 2006; 44: 798.
- 413- FAUCI, Anthony S; BRAUNWALD, Eugene, et al. *Harrison. Principios de Medicina Interna*. McGraw Hill, 17ª Edición. 2008.
- 414- PAZ BOUZA, José Ignacio. Aspectos histopatológicos de diferentes órganos del ratón inoculados con virus herpes simples de tipo I y II. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. España. 1978.
- 415- LLOVET, et al. Presentación oral, 2007. Annual Meeting, 4 junio 2007. Chicago, IL, USA.
- 416- ROSENTHAL, Nadia. Prometheus's Vulture and stem-cell promise. Number 3. *New England Journal of Medicine*, 2003 July 17; 349: 267-274.

- 417- POTENZA, Leonardo; LUPPI, Mario; BAROZZI, Patrizia; et al. HHV- GA syncytial giant-cell hepatitis. Number 6. 2008 August 7; 359: 593-602.
- 418- LLOVET JM, RICCI S, MAZZARERRO V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. New England. J Med, 2008 July 24; 359: 378-390.
- 419- FRÖHLING, Stefan; DÖHNER, Hartmut. Chromosomal abnormalities in cancer. New England. J Med, 2008 August 14; 359: 722-734.
- 420- TANG, Weiliang; LAZARO, Catherine A; et al. Responses of non transformed human hepatocytes to conditional expression of full-length hepatitis C virus open reading frame. Am J Pathol, 2007; 171: 1831-1846.
- 421- HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res, 1965; 37: 614-636.
- 422- BLACKBURN, EH. Switching and signaling at the telomere. Cell, 2001; 106: 661-673.
- 423- FIBBE WILLEM, E. Telomerase mutatiois in aplastic anemia. Editorials. N Engl J Med, 2005; 352: 1481-1482
- 424- LANED P. p-53: guardian of the genome. Nature, 1992; 358: 1516.
- 425- SÁNCHEZ POSADA, Raúl. Características biológicas de la célula en el cáncer de colon con metástasis ganglionares. Tesis Doctoral. Salamanca, 2007.
- 426- MITCHELL, Peter. Acoplamiento de la fosforilación a la transferencia de electrones e hidrógeno mediante un mecanismo de tipo quimiosmótico. Nature, 1961; Volume 191: 144-148.