

## **ALTERACIONS MOLECULARS EN EL CARCINOMA HEPATOCEL·LULAR**

ROSA MIQUEL<sup>1</sup>, LORETO BOIX<sup>2</sup> I JORDI BRUIX<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Departament d'Anatomia Patològica i* <sup>2</sup>*Servei d'Hepatologia. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Jordi Bruix. Servei d'Hepatologia. Hospital Clínic i Provincial. C/Villarroel, 170. 08036 Barcelona.

### **RESUM**

Els mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament de l'hepatocarcinoma no estan encara ben definits. Alguns autors creuen que l'inici podria estar associat a un augment de mutacions en el DNA generades per l'acció de molècules relacionades amb la resposta inflamatòria-regenerativa secundària a l'efecte lesiu hepatocel·lular de virus o a la ingesta alcohòlica. Quan aquestes mutacions impliquin gens relacionats a la reparació del DNA o a gens responsables del control dels processos de proliferació cel·lular i/o dels mecanismes que protegeixen la cèl·lula de la transformació neoplàstica, es permetrà el desenvolupament de la lesió tumoral, en un context adequat. Mutacions de *p53* o la inactivació de la funció de la proteïna que codifica són troballes constants en la major part de tumors associats etiològicament a la ingesta d'aflatoxines i a la infecció pel virus de l'hepatitis B, i s'han relacionat a un avantatge de creixement de les cèl·lules amb aquesta alteració. L'adquisició de noves alteracions genètiques permetrà posteriorment la progressió i disseminació tumoral. En els darrers anys s'han descrit nombroses alteracions genètiques en aquests tumors, l'estudi de les quals és indispensable per a un millor coneixement de la carcinogènesi hepàtica, si bé cal precisar quin és el seu significat epidemiològic, clínic i histopatològic.

### **SUMMARY**

The molecular mechanisms associated with hepatocellular carcinoma are not well defined. Some authors have related the initial steps of cancer development to the generation of DNA mutations by molecules associated to the inflammatory-regenerative response due to

the hepatocellular injury caused by viruses or ethanol intake. When these mutations affect genes responsible for DNA repair or genes implicated in the cellular proliferation control and/or protective mechanisms against neoplastic transformation, the development of the tumoral lesion will be allowed. *p53* mutations or protein function inactivation are constant findings in most of the tumors related to aflatoxins and hepatitis B virus, and this has been shown to provide a growth advantage. The sequential acquisition of new genetic abnormalities by these cells will permit tumor progression and dissemination. The study of the high number of chromosomal changes that have been described in the last few years in hepatocellular carcinomas will help to understand the hepatic oncogenic process and in the future, the epidemiological, clinical and biological consequences of these abnormalities will be depicted.

*Keywords: Hepatocellular carcinoma – genetic abnormalities – carcinogenesis*

## INTRODUCCIÓ

El carcinoma hepatocel·lular (CHC) és la neoplàsia primària més freqüent del fetge: constitueix més del 90 % dels tumors malignes primaris d'aquest òrgan. Assenta més freqüentment sobre la cirrosi hepàtica i té una alta taxa de mortalitat (Calvet *et al.*, 1989). S'associa epidemiològicament al consum prolongat d'aliments contaminats amb aflatoxines, a la infecció crònica pels virus de l'hepatitis B (VHB) i C (VHC) i al consum prolongat d'etanol, condicions que tenen la capacitat d'induir lesions inflammatòries cròniques sobre els hepatòcits, fet que esdevé un factor de risc per al CHC. Actualment, gràcies a l'avanç de l'ecografia, aquests tumors es poden detectar en estadis inicials de desenvolupament, fet que ha permès observar que hi ha una marcada heterogeneïtat en l'evolució clínica d'aquesta neoplàsia (Ebara *et al.*, 1986; Barbara *et al.*, 1992). En aquest sentit, el CHC s'ha de considerar com un bon model per a l'estudi de les diferents passes que caracteritzen la transformació maligna i l'evolució tumoral. L'estudi de les bases moleculars d'aquests processos es fonamenta en dos punts bàsics: la identificació de les alteracions de la proliferació cel·lular i la determinació de les altera-

cions genètiques associades a la capacitat invasiva i a la disseminació metastàtica. Aquestes alteracions es caracteritzen per l'adquisició de múltiples canvis en el genoma de les cèl·lules tumorals, alguns dels quals seran d'aparició precoç mentre que d'altres apareixeran tardanament en l'evolució del tumor. En el CHC no es coneixen encara els mecanismes exactes de carcinogènesi, si bé les nombroses alteracions genètiques descrites en els darrers anys han permès aprofundir una mica més en el coneixement d'aquesta neoplàsia.

Aquesta revisió resumeix les troballes dels darrers anys sobre la patogènesi dels hepatocarcinomes, especialment des del punt de vista de l'anàlisi molecular de les alteracions dels mecanismes de control del cicle cel·lular i de les anomalies cromosòmiques lligades a la progressió tumoral, com també el seu lligam amb la lesió morfològica hepàtica.

## MECANISMES D'ALTERACIÓ GENÈTICA ASSOCIATS AL CHC

La base morfològica sobre la qual assenten la majoria de CHC és la cirrosi hepàtica, a partir d'una malaltia crònica de llarg

temps d'evolució. Les diferents etiologies associades a aquesta afecció tenen en comú l'efecte lesiu crònic sobre els hepatòcits, que desencadena una resposta inflamatòria persistent amb un constant procés de destrucció-regeneració cel·lular (Okuda *et al.*, 1992; Behrns, 1997). Probablement sota aquesta base inflamatòria-regenerativa la fallada d'alguns dels mecanismes encarregats del control de la proliferació cel·lular i/o dels mecanismes que protegeixen la cèl·lula de la transformació neoplàstica permetrà el desenvolupament de la lesió tumoral.

Els tumors humans mostren gran nombre d'alteracions cromosòmiques i mutacions, per la qual cosa alguns autors han proposat la hipòtesi que el càncer es manifestaria perquè té un fenotip mutador que li conferiria inestabilitat genètica i que resultaria en una cascada de mutacions, algunes de les quals permetrien a la cèl·lula escapar dels mecanismes de regulació a què està normalment sotmesa (Loeb, 1994; Leach, 1993). Estudis recents que demostren inestabilitat dels microsatèl·lits donen suport a aquesta hipòtesi (Ionov *et al.*, 1993). La implicació de mutacions en gens relacionats a la reparació d'errors en el DNA durant la replicació podria ser el punt inicial en el procés carcinogènic. La generació de radicals lliures d'oxigen pel procés inflamatori associat a la infecció crònica pels VHB i VHC és un dels mecanismes proposats com a origen de la lesió del DNA cel·lular i per tant un probable origen de mutacions (Loeb, 1997). Probablement l'inici tumoral parteix d'una cèl·lula que guanya avantatge de creixement sobre les cèl·lules normals i gradualment forma clons més grans. Cèl·lules individuals d'aquests clons poden patir al seu torn més canvis mutacionals i seleccionar-se'n de noves amb major potencial agressiu. Posteriorment, l'activació de protooncogens (per mutació o amplificació) i la seva sobreexpressió, afegit

da a alteracions de gens supressors tumorals (mutació i deleció) comportarien la progressió neoplàstica.

En els darrers anys, mitjançant tècniques de citogenètica i de biologia molecular s'han pogut establir algunes de les alteracions cromosòmiques que caracteritzen el CHC, moltes de les quals impliquen un determinat gen diana (Zhang *et al.*, 1990; Boige *et al.*, 1997; Marchio *et al.*, 1997). Alguns d'aquests gens formen part del procés de control de la proliferació cel·lular i d'altres intervenen en funcions cel·lulars diverses, entre elles els mecanismes de defensa contra cèl·lules tumorals. Els mecanismes de defensa de l'hoste tenen un paper fonamental en el desenvolupament de la neoplàsia. Aquests mecanismes inclouen l'acció de: gens supressors tumorals, en especial *p53*; els factors supressors del creixement tals com el factor transformant del creixement  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ); la resposta cel·lular citotòxica duta a terme per macròfags i limfòcits T citotòxics CD8+; la resposta humoral sèrica, i també l'inici de resposta antitrombòtica als trombes tumorals (Tabor, 1997). El possible paper dels gens diana en l'oncogènesi es resumeix en els següents apartats.

### 1. Alteracions dels mecanismes de control de la proliferació

El creixement cel·lular és el resultat del balanç entre proliferació i mort cel·lular, processos que estan íntimament relacionats entre si en condicions normals i que es desregulen en el càncer. Els estudis que han avaluat l'activitat proliferativa en el CHC mitjançant tècniques immunohistoquímiques que determinen l'antigen de proliferació nuclear (PCNA), els AgNOR i el Ki-67, o amb el càlcul de la fracció proliferativa de la població cel·lular tumoral mitjançant citometria de flux, han mostrat un augment de

la proliferació cel·lular que acompanya el creixement tumoral i la desdiferenciació de les cèl·lules neoplàstiques. Alguns autors han correlacionat la intensitat de la proliferació i el pronòstic dels malalts (Soini *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 1994).

La proliferació cel·lular està regulada per factors de creixement que mitjançant la unió als seus receptors específics inicien o activen el procés en cascada de senyals que en darrer terme activaran la maquinària del cicle cel·lular (CC). S'ha descrit la sobreexpressió del factor de creixement  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) (Collier *et al.*, 1993; Jaskiewicz *et al.*, 1995; Morimitsu *et al.*, 1995), el factor de creixement epidèrmic (EGF) (Motoo *et al.*, 1991), el factor de creixement fibroblàstic (Ogasawara *et al.*, 1996), el factor de creixement insulínic (Nardone *et al.*, 1996) i c-met (el receptor de creixement hepatocitari) (Boix *et al.*, 1994) i alguns autors han trobat correlació significativa entre aquesta sobreexpressió i la proliferació hepatocitària.

Les hormones esteroides tenen un paper en la promoció del creixement hepatocitari. El seu mecanisme d'acció, però, estaria en relació a la unió a un receptor, el qual està absent o en baixes concentracions en gran part de tumors, o pot estar mutat (Boix *et al.*, 1993; Villa *et al.*, 1995; Boix *et al.*, 1995). Aquest fet explicaria la manca d'utilitat terapèutica observada amb antiandrògens o antiestrògens, que en un principi es va pensar que podrien ser útils als pacients amb CHC (Bruix *et al.*, 1997).

El TGF- $\beta$  té acció inhibidora del creixement tumoral; forma part d'un dels mecanismes de defensa de l'hoste (Tabor, 1997). Nivells elevats d'aquest marcador, proporcionals al grau de fibrosi, s'han detectat en pacients amb processos inflamatoris hepàtics. En malalts amb CHC els nivells també estan incrementats (Bedossa *et al.*, 1995). La seva funció biològica encara no és ben coneguda, però un dels mecanismes pels quals

actuaria seria a través de l'acció sobre p53.

L'activació del CC seguint els senyals apropiats a través de factors de creixement requereix l'activació de determinats gens, alguns en les fases inicials del procés i d'altres en les fases més tardanes. El mecanisme principal de control recau en els complexos formats per les ciclins i les cinases dependents de ciclins (cdk). L'acció d'aquests elements depèn de la seva síntesi i degradació durant les diferents fases del CC i de l'activitat de cada complex ciclina-cdk. Aquests complexos estan a la vegada regulats per inhibidors específics de les cdk com són p27, p21, p15, p16 (Hartwell *et al.*, 1994; Okayama *et al.*, 1996). Punts de control o *checkpoints* situats en diferents moments del procés en controlen la qualitat, de manera que si les condicions requerides per a la proliferació no són les adequades el procés es pot avortar en l'espera d'aconseguir els requeriments necessaris. Si aquests no apareixen, la cèl·lula és desviada cap al procés de mort cel·lular programada o apoptosi, que està regulat pel gen supressor tumoral p53. Aquest sistema és un dels punts de defensa contra la proliferació de cèl·lules anormals i aporta la base biològica per a l'efecte d'alguns tractaments antineoplàstics amb l'intent de produir dany cel·lular genètic i mort (Harris, 1996). Els elements de control que participen en la regulació de la transició G<sub>1</sub>/S semblen els principals candidats a tenir un paper en l'oncogènesi, atès que alteracions en el sistema de regulació en aquest punt permetran a la cèl·lula neoplàstica proliferar independentment dels senyals externs abans esmentats. D'altres importants reguladors del CC són Rb i ciclina-D1. Estudis recents demostren que l'alteració d'algun o de diversos d'aquests elements està clarament associada a progressió tumoral i a un pitjor pronòstic en determinats tumors com ara limfomes i carcinomes de laringe i del tracte digestiu (Caldas *et al.*, 1994; Pinyol

*et al.*, 1997). L'alteració d'aquests factors també sembla implicada en l'hepatocarcinogènesi.

*p53(17q13)* és el gen més freqüentment alterat en el càncer. En àrees geogràfiques endèmiques per CHC, on l'aflatoxina és un important agent etiològic del CHC, les mutacions de *p53* es troben en el 50 % dels tumors. En aquest subgrup de malalts la mutació de *p53*, concretament la transversió G(p)T en el codó 249, és freqüent en estadis inicials del desenvolupament tumoral, fet que implica aquesta molècula com a possible iniciadora del procés de transformació maligne (Hsu *et al.*, 1991, Bressac *et al.*, 1991; Scorsone *et al.*, 1992). La freqüència de mutacions de *p53* en la població occidental és molt baixa, la qual cosa suggereix que el mecanisme d'inactivació de *p53* depèn d'altres factors com ara la unió a proteïnes virals. A diferència del que passa en altres tumors on la sobreexpressió de *p53* es correspon a la presència d'alteracions en el gen, en el CHC, malgrat que la sobreexpressió de *p53* es detecta fins en un 60 % dels casos, només la meitat d'aquests mostren mutació del gen (Goldblum *et al.*, 1993; Bourdon *et al.*, 1995).

La integració del VHB en el genoma de les cèl·lules de l'hepatocarcinoma en pacients portadors del VHB és una troballa freqüent que es considera essencial en l'hepatocarcinogènesi en aquest grup de malalts. S'acompanya de microdelecions del DNA o d'altres alteracions cromosòmiques com translocacions, inversions i duplicacions (Henderson *et al.*, 1988; Takada *et al.*, 1990). S'ha trobat en gairebé tots els cromosomes, per la qual cosa sembla realitzar-se a l'atzar, encara que en alguns casos aquests llocs d'integració estan en relació a gens coneguts associats a factors de creixement, o a cinases com la ciclina A, que actua de regulador del CC en les transicions G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M (Wang *et al.*, 1990). El VHB sembla que actua en el desenvolupament del CHC mitjançant

l'expressió de la proteïna X del VHB (HBx), que entre altres funcions intervé en la transcripció i transactivació gènica, en l'activació de determinades vies de senyals intracel·lulars i en la inducció i transformació neoplàstica *in vitro*, i interfereix en els mecanismes d'acció de *p53* tant en la reparació del DNA com en l'acció apoptòtica, així com en la desregulació de punts control del cicle cel·lular. L'acció de HBx sobre *p53* és per tant un altre mecanisme pel qual *p53* no pot realitzar la seva funció biològica sense que existeixin alteracions en el seu gen (Wang *et al.*, 1997). Estudis recents suggereixen que les alteracions en *p53* confereixen un avantatge de creixement en els hepatòcits però no actuen directament en la transformació maligne (Dumenco *et al.*, 1995). Aquestes dades recolzen la idea que es requereix la presència d'alteracions de diferents factors en la transformació neoplàstica i que no és suficient l'alteració només d'un o de pocs.

S'han detectat pèrdues de material genètic en 17p en aproximadament el 50 % dels CHC estudiats. El *locus* del gen *p53* és un dels llocs afectats i sol associar-se a la presència de mutacions en l'al·lel restant. La presència de pèrdues genètiques d'aquest gen s'observen en fases tardanes del desenvolupament del tumor, la qual cosa suggereix que estan associades a la progressió més que no a l'inici; es troben més freqüentment en tumors pobrament diferenciats i de mida gran, amb un fenotip més agressiu que es correlacionarà a un pitjor pronòstic. Aquest fet fa difícil de diferenciar si el pitjor pronòstic és per l'alteració de *p53* o perquè el tumor és en un estadi avançat on les mutacions són més freqüentment observades. En aquest sentit, estudis de clonalitat han mostrat heterogeneïtat genètica en clons cel·lulars d'un mateix nòdul hepàtic, que reflecteixen probablement diferents fases de la progressió tumoral (Murakami *et al.*, 1991; Oda *et al.*, 1994).

A diferència del VHB, el VHC, associat també a un major risc de patir un CHC, no disposa de transcriptasa inversa per integrar-se en el DNA cel·lular i per tant la seva acció lesiva genètica ha de ser diferent. El mecanisme oncogènic d'aquest és ara per ara desconegut.

*p21/Waf1* és un gen implicat en els mecanismes de reparació del DNA, en la diferenciació cel·lular i en l'envelliment (El Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Misser *et al.*, 1995). Està induït per la proteïna p53 normal però no la mutada. D'acord amb estudis experimentals li ha estat proposat un rol oncogènic sobre la base del seu control per p53, on la sobreexpressió pot suprimir el creixement tumoral. La disminució de la seva funció, reportada en el CHC, s'ha vist però lligada a la funció de p53, i estaria associada a una p53 anormal i no a una acció intrínseca de p21 (Hui *et al.*, 1997).

El gen inhibidor del cicle cel·lular *Rb* (13q14) és un dels més estudiats en el CHC. La inactivació de *Rb* és menys freqüent que la de p53, però sembla tenir un paper en l'hepatocarcinogènesi. Pèrdua de l'heterozigosi de *Rb*, amb pèrdues en la regió 13q, s'ha detectat en més del 50 % dels CHC; s'associa a pèrdua de l'expressió de la seva proteïna (pRb) (Wang *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1994). L'acció de *Rb* és inhibida en condicions normals per fosforilació mitjançant el complex cdk/ciclina D1. Junt amb la pèrdua de la funció del gen per mutació o deleció, la sobreexpressió de ciclina D1 que actuaria directament sobre la pRb seria un altre mecanisme pel qual *Rb* no podria efectuar la seva regulació del CC i permetria la proliferació incontrolada. Amplificació i sobreexpressió del gen de la ciclina-D1 (11q13) s'ha detectat en aproximadament el 10 % dels CHC (Zhang *et al.*, 1993; Nishida *et al.*, 1994; Jares *et al.*, 1994; Jares *et al.*, 1996).

Un altre dels gens supressors tumorals implicats en el control del CC és *p16*. Muta-

cions de *p16* són poc freqüents en CHC; se n'han descrit en casos familiars amb alteracions genètiques hereditàries (Kita *et al.*, 1996; Hui *et al.*, 1996).

## 2. Apoptosi

En tumors i també en el CHC es troba un increment en el nivell d'apoptosi acompanyant l'augment del nivell de proliferació i el balanç entre proliferació i apoptosi, cosa que suggereix que té un paper pronòstic en CHC (Hino *et al.*, 1996; Soini *et al.*, 1996; Grasl-Kraupp *et al.*, 1997). Aquest increment de l'apoptosi pot ser una mesura protectora enfront de l'augment del creixement cel·lular o de l'existència d'alteracions en el genoma, o bé pot també formar part del mateix procés oncogènic. El gen p53 dirigeix l'apoptosi de cèl·lules que contenen alteracions genètiques. Addicionalment també actua modulant l'expressió del gen de la resistència a múltiples fàrmacs, per la qual cosa la seva inactivació pot ser la responsable de la manca d'eficàcia del tractament quimioteràpic en pacients amb aquesta neoplàsia. Per altra banda l'apoptosi pot ser també promoguda per altres estímuls tant externs com interns. En aquest sentit, els mecanismes que controlen la inflamació, la proliferació cel·lular i l'apoptosi estan fortament interrelacionats i estaran lligats a una sèrie de fets que actuen simultàniament en la cèl·lula (Liu *et al.*, 1996). Altres factors com el receptor del factor de creixement insulínic (IGF) poden blocar l'apoptosi induïda per altres elements com el TGF- $\beta$  (Tanaka *et al.*, 1996). En el CHC són freqüents les pèrdues al·lèliques del cromosoma 6q i també mutacions de l'al·lel restant en el gen *M6P/IGF2R* (manosa 6-fosfat/ receptor del factor II del creixement *insulin-like*), per la qual cosa es creu que pot ser un gen supressor tumoral en

l'hepatocarcinoma. La pèrdua de material en el *locus* d'aquest gen podria ser una alteració precoç en la carcinogènesi hepàtica (De Souza *et al.*, 1995a; De Souza *et al.*, 1995b). La proteïna que codifica intervé en fenòmens de transport intracel·lular, en l'activació del TGF- $\beta$  i en la degradació del factor de creixement 2 insulínic que és un mitogen amb expressió elevada en determinades neoplàsies.

L'apoptosi es modula pels gens de la família *Bcl* (Reed, 1994; Vaux *et al.*, 1996). En els hepatòcits i el CHC, però, aquest grup no sembla relacionat de manera rellevant a l'apoptosi, i els grups de *Bclx* i *Bax* serien els responsables d'aquest procés (Terada *et al.*, 1996; Higaki *et al.*, 1996).

### 3. Invasió i metàstasi

El creixement neoplàstic, a més de per l'augment de la proliferació, es caracteritza per la capacitat d'infiltració del teixit circundant i de disseminació a distància pel sistema vascular. Actualment s'accepta el model d'invasió i metàstasi en diverses fases, entre les quals hi ha la separació de les cèl·lules de la massa tumoral, la capacitat d'invasió local del teixit normal amb la conseqüent degradació de la matriu extracel·lular (MEC) i finalment la migració cel·lular a distància, prèvia penetració del sistema vascular (Bernstein *et al.*, 1994). Addicionalment es requereix un procés de neoangiogènesi per aportar al tumor els nutrients necessaris. En totes aquestes fases participen molècules, moltes d'elles enzims, com metaloproteïnases, catèpsines, cadherines, etc. Els estudis sobre la seva participació en el CHC són limitats. La més estudiada es la E-cadherina. Estudis recents mostren que la manca d'expressió de la E-cadherina, proteïna implicada en els processos d'adhesió cel·lular, és una dada íntimament associada a tumors

avançats i disseminació i que confereix capacitat de disseminació al tumor. Aquesta proteïna està codificada per un gen situat en el braç curt del cromosoma 16. En un 54 % dels CHC es troben pèrdues de la regió 16p21-24 i en un 64 % hemizigosi d'aquest gen, que es correlaciona amb una disminució de l'expressió de la proteïna (Tsuda *et al.*, 1990; Slagle *et al.*, 1993). La inactivació del gen i la no expressió de la proteïna es pensa que poden intervenir en la carcinogènesi hepàtica, ja que és un possible gen supressor de tumors associat a la disseminació en diferents tumors humans (Umbas *et al.*, 1992; Pignatelli *et al.*, 1993; Lipponen *et al.*, 1993; Bringuier *et al.*, 1993).

Per a l'existència de metàstasi cal que les cèl·lules neoplàstiques que es deslliguen de la massa tumoral sobrevisquin en la circulació, es puguin adherir als elements vasculars i d'aquí passar al teixit receptor i envair-lo. En aquest darrer punt tindrà un paper important l'eficàcia de la defensa del teixit hoste. La presència de cèl·lules circulants es reflecteix en el CHC per la detecció en sang perifèrica de mRNA específic per a les cèl·lules neoplàstiques (mRNA de  $\alpha$ -fetoproteïna (AFP)) (Matsumura *et al.*, 1994). La detecció de mRNA d'AFP es correlaciona a l'estadi tumoral i s'ha descrit que els tractaments invasius aplicats a malalts amb CHC provoquen una alliberació transitòria de cèl·lules malignes (Boix *et al.*, 1996). Malgrat aquestes troballes, aquesta alliberació cel·lular iatrogènica no sembla associar-se a un increment de l'extensió extrahepàtica, fet que implica que la disseminació tumoral no és només un procés purament mecànic d'alliberament de cèl·lules sinó que requereix la modulació de gens estretament relacionats al procés metastàtic com l'*nm23*. Aquest és un gen supressor de metàstasi amb un mecanisme d'acció no ben conegut. S'ha vist que la seva sobreexpressió en diversos tumors, entre ells el CHC, es correlaciona a un

baix potencial metastàtic i per tant a un pronòstic més favorable després del tractament (Boix *et al.*, 1994; Iizuka *et al.*, 1995).

## LESIONS NODULARS HEPÀTIQUES I CLONALITAT

De manera similar a la que s'ha establert en altres carcinomes, s'ha intentat identificar una seqüència carcinogènica morfològica des del teixit hepàtic normal al neoplàstic. L'exemple més ben estudiat és el del carcinoma colorectal, on els canvis genètics associats a la transformació neoplàstica estan associats a uns canvis fenotípics clarament reconeguts histològicament (Fearon *et al.*, 1990; Campo, 1996). En el fetge, aquesta seqüència està representada morfològicament per l'existència de lesions benignes associades al CHC. Els nòduls regeneratius de la cirrosi i els nòduls displàstics són les lesions hepàtiques més importants proposades com a precursoras. La hipòtesi de la seva natura preneoplàstica està recolzada clínicament, histològicament i molecularment. El seguiment clínic de lesions nodulars hepàtiques catalogades d'hiperplàsia adenomatosa ha mostrat l'evolució a neoplàsia maligna al llarg del temps (Takayama *et al.*, 1990). La troballa microscòpica d'aquestes lesions en la perifèria de l'hepatocarcinoma és un fet comú en l'estudi morfològic d'aquest tumor, així com el reconeixement de clonalitat en cèl·lules que morfològicament encara no mostren un fenotip maligne. Estudis recents han demostrat poblacions cel·lulars monoclonals en més del 70 % dels nòduls displàstics i també en nòduls cirròtics, fet que suggereix que aquestes lesions han acumulat ja un conjunt d'alteracions genètiques comparable als carcinomes, sense mostrar encara el fenotip maligne (Aihara *et al.*, 1994; Aihara *et al.*, 1996; Paradis *et al.*, 1998). S'especula que

una sola cèl·lula en una població monoclonal podria incorporar canvis genètics addicionals que l'abocarien a un canvi fenotípic que seria clínicament o morfològicament detectable com ho són els nòduls displàstics i finalment el carcinoma. Segons aquestes troballes s'ha de plantejar el procés cirròtic com una lesió realment preneoplàstica en el sentit de clonalitat demostrada.

## CONCLUSIONS

Per estudis de ploïdia del DNA, citogenètica i d'hibridació genètica comparativa s'han pogut determinar un gran nombre d'alteracions genètiques en el CHC, alteracions que mostren sobretot pèrdua d'heterozigosi i delecions cromosòmiques i amb menys freqüència amplifícacions gèniques. La caracterització d'aquestes alteracions associades al CHC és una etapa indispensable per a una millor comprensió de la carcinogènesi hepàtica. La recerca sistemàtica en tumors en diferents estadis i en les lesions preneoplàstiques permetrà establir l'ordre cronològic dels esdeveniments genètics en el curs de la progressió tumoral i ajudar a diferenciar subgrups de pacients i, per tant, establir indicacions terapèutiques més concretes i orientades en cada cas i potser diferents entre diferents malalts.

## BIBLIOGRAFIA

- AIHARA, T. [*et al.*] (1994). «Clonal analysis of regenerative nodules in hepatitis C virus-induced liver cirrhosis». *Gastroenterol*, núm. 107, pàg. 1805-1811.
- AIHARA, T. [*et al.*] (1996). «Clonal analysis of precancerous lesion of hepatocellular carcinoma». *Gastroenterol*, núm. 111, pàg. 455-461.
- BARBARA, L.; L. BENZI; S. GAIANI [*et al.*] (1992). «Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival». *Hepatology*, núm. 16, pàg. 132-137.

- BEDOSSA, P.; E. PELTIER; B. TERRIS [et al.] (1995). «Transforming growth factor-beta 1 (TGF- beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic and neoplastic human livers». *Hepatology*, núm. 21, pàg. 760-766.
- BEHRNS, K. E.; A. BRENNER (1997). «Biochemical and molecular basis of hepatic regeneration». A: Arroyo, V.; Bosch, J.; Bruguera, M.; Rodés, J. *Therapy in liver diseases*. Barcelona. Masson, pàg. 197-209.
- BERNSTEIN, L. R.; L. LIOTTA (1994). «Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis». *Curr Op in Oncol*, núm. 6, pàg. 106-113.
- BOIGE, V.; LAURENT-PUIG (1997). «Altérations génétiques associées au carcinome hépatocellulaire». *Gastroenterol Clin Biol*, núm. 21, pàg. 34-44.
- BOIX, L.; J. BRUIX; A. CASTELLS [et al.] (1993). «Sex hormone receptors in hepatocellular carcinoma». *J Hepatol*, núm. 17, pàg. 187-191.
- BOIX, L.; J. L. ROSA; F. VENTURA [et al.] (1994). «C-met mRNA overexpression in human hepatocellular carcinoma». *Hepatology*, núm. 19, pàg. 88-91.
- BOIX, L.; J. BRUIX; E. CAMPO [et al.] (1994). «nm23-H1 expression and disease recurrence after surgical resection of small hepatocellular carcinoma». *Gastroenterol*, núm. 107, pàg. 486-491.
- BOIX, L.; A. CASTELLS; J. BRUIX [et al.] (1995). «Androgen receptors in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: relationship with tumor size and recurrence rate after surgical resection». *J Hepatol*, núm. 22, pàg. 616-622.
- BOIX, L.; J. BRUIX; A. CASTELLS [et al.] (1996). «Circulating mRNA for alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. Evidence of tumor dissemination after transarterial embolization». *Hepatol*, núm. 24, pàg. 349 (abstr.)
- BOURDON, J. C.; A. D'ERRICO; P. PATERLINI [et al.] (1995). «P53 protein accumulation in European hepatocellular carcinoma is not always dependent on p53 gene mutation». *Gastroenterol*, núm. 108, pàg. 1176-1182.
- BRESSAC, B.; M. KEW; J. WANDS [et al.] (1991). «Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa». *Nature*, núm. 350, pàg. 429-431.
- BRINGUIER, P. P.; R. UMBAS; H. E. SCHAAFSMA [et al.] (1993). «Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors». *Cancer Res*, núm. 53, pàg. 3241-3245.
- BRUIX, J. (1997). «Treatment of hepatocellular carcinoma». *Hepatology*, núm. 2, pàg. 259-262.
- CALDAS, C.; S. A. HAHN; L. T. DA COSTA [et al.] (1994). «Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16(MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma». *Nat Genet*; núm. 8, pàg. 27-32.
- CALVET, X.; J. BRUIX; P. GINÈS [et al.] (1990). «Prognostic factors of hepatocellular carcinoma in the West: a multivariate analysis in 206 patients». *Hepatol*, núm. 12, pàg. 753-760.
- CAMPO, E. (1996). «Mecanismos moleculares de la transformación y progresión del carcinoma colorrectal». *Med Clin (Barc)*, núm. 107, pàg. 669-676.
- COLLIER, J. D.; K. GUO; W. J. GULLIK [et al.] (1993). «Expression of transforming growth factor alpha in human hepatocellular carcinoma». *Liver*, núm. 13, pàg. 151-155.
- DE SOUZA, A.; G. HANKINS; M. WASHINGTON [et al.] (1995a). «Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors». *Oncogene*, núm. 10, pàg. 1725-1729.
- DE SOUZA, A.; G. HANKINS; M. WASHINGTON [et al.] (1995b). «M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity». *Nat Genet*, núm. 11, pàg. 447-449.
- DUMENCO, L.; D. OQUEY; J. WU [et al.] (1995). «Introduction of a murine p53 mutation corresponding to human codon 249 into a murine hepatocyte cell line results in growth advantage, but not in transformation». *Hepatology*, núm. 22, pàg. 1279-1288.
- EBARA, M.; M. OHTO; T. SHINAGAWA [et al.] (1986). «Natural history of hepatocellular carcinoma smaller than three centimeters complicating cirrhosis. A study in 22 patients». *Gastroenterol*, núm. 90, pàg. 289-298.
- EL DEIRY, W.; T. TOKINO; V. E. VELCULESCU [et al.] (1993). «Waf-1, a potential mediator of p53 tumor suppression». *Cell*; núm. 75, pàg. 817-825.
- FEARON, E. R.; B. VOGELSTEIN (1990). «A genetic model for colorectal carcinogenesis». *Cell*, núm. 61, pàg. 759-767.
- GOLDBLUM, J. R.; R. E. BARTOS; K. A. CARR [et al.] (1993). «Hepatitis B and alteration of the p53 tumor suppressor gene in hepatocarcinomas». *Am J Surg Pathol*, núm. 17, pàg. 1244-1251.
- GRASL-KRAUPP, B.; B. RUTTKAY; L. MÜLLAUER [et al.] (1997). «Inherent increase of apoptosis in liver tumors: implications for carcinogenesis and tumor regression». *Hepatol*, núm. 25, pàg. 906-912.
- HARPER, J. W.; G. R. ADAMI; N. WEI [et al.] (1993). «The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases». *Cell*, núm. 75, pàg. 805-816.
- HARRIS, C. C. (1996). «Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies». *J Natl Cancer Inst*, núm. 88, pàg. 1442-1455.
- HARTWELL, L. H.; M. B. KASTAN (1994). «Cell cycle control and cancer». *Science*, núm. 266, pàg. 1821-1828.
- HENDERSON, A. S. [et al.] (1988). «Identification of a chromosomal aberration associated with hepatitis B DNA integration site in human cells». *Cancer Genet Cytogenet*, núm. 30, pàg. 269-275.

- HIGAKI, K.; H. YANO; M. KOJIRO (1996). «Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissue». *Am J Pathol*, núm. 149, pàg. 429-437.
- HINO, N.; T. HIGASHI; K. NOUSO [et al.] (1996). «Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma». *Liver*, núm. 16, pàg. 123-129.
- HSU, I. C.; R. A. METCALF; T. SUN [et al.] (1991). «Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas». *Nature*, núm. 350, pàg. 427-428.
- HUL, A. M.; M. SAKAMOTO; Y. KANAI [et al.] (1996). «Inactivation of p16<sup>INK4</sup> in hepatocellular carcinoma». *Hepatology*, núm. 2, pàg. 575-579.
- HUL, A.; Y. KANAI; M. SAKAMOTO [et al.] (1997). «Reduced p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression and p53 mutation in hepatocellular carcinomas». *Hepatology*, núm. 25, pàg. 575-579.
- IIZUKA, N.; M. OKA; T. NOMA [et al.] (1995). «nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA abundance in human hepatocellular carcinoma». *Cancer Res*, núm. 55, pàg. 652-657.
- IONOV, Y.; M. A. PEINADO; S. MALKHOSYAN [et al.] (1993). «Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for clonic carcinogenesis». *Nature*, núm. 363, pàg. 558-561.
- JARES, P.; P. L. FERNÁNDEZ; E. CAMPO [et al.] (1994). «PRAD1/Cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas». *Cancer Res*, núm. 54, pàg. 4813-1817.
- JARES, P.; E. CAMPO; M. PINYOL [et al.] (1996). «Expression of the retinoblastoma gene product (pRb) in mantle cell lymphomas. Correlation with Cyclin D1 (PRAD1/CCND1) mRNA levels and proliferative activity». *Am J Pathol*, núm. 148, pàg. 1591-1600.
- JASKIEWICZ, K.; M. R. CHASEN (1995). «Differential expression of transforming growth factor alpha, adhesion molecules and integrins in primary, metastatic liver tumors and in liver cirrhosis». *Anticancer Res*, núm. 15, pàg. 559-562.
- KITA, R.; N. NISHIDA; Y. FUKUDA [et al.] (1996). «Infrequent alterations of the p16<sup>INK4</sup> gene in liver cancer». *Int J Cancer*, núm. 67, pàg. 176-180.
- LEACH, F. S.; N. C. NICOLAIDES; N. PAPADOPOULOS [et al.] (1993). «Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer». *Cell*, núm. 75, pàg. 1215-1225.
- LIPPONEN, P.; E. SAARELAINEN; H. JI [et al.] (1994). «Expression of E-cadherin (E-CD) as related to other prognostic factors and survival in breast cancer». *J Pathol*, núm. 174, pàg. 101-109.
- LIU, Z. G.; H. HSU; D. V. GOEDEL [et al.] (1996). «Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NK-kB activation prevents cell death». *Cell*, núm. 87, pàg. 565-576.
- LOEB, L. A. (1994). «Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer». *Cancer Research*, núm. 54, pàg. 5059-5063.
- LOEB, L. A.; T. NEWCOMB; B. KIM; J. BRUIX (1997). «New developments on the molecular mechanisms of tumorigenesis: genomic instability and oxidative DNA damage» A: Arroyo, V.; Bosch, J.; Bruguera, M.; Rodés, J. *Therapy in liver diseases*. Barcelona. Masson, pàg. 479-483.
- MARCHIO, A.; M. MEDDEB; P. PINEAU [et al.] (1997). «Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization.» *Genes Chromosom Cancer*, núm. 18, pàg. 59-65.
- MATSUMURA, M.; Y. NIWA; N. KATO [et al.] (1994). «Detection of alpha-fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma». *Hepatology*, núm. 20, pàg. 1418-1425.
- MISSERO, C.; E. CALAUTTI; R. ECKNER [et al.] (1995). «Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/Waf1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 92, pàg. 5451-5455.
- MORIMITSU, Y.; C. C. HSIA; M. KOJIRO [et al.] (1995). «Nodules of less differentiated tumor within or adjacent to hepatocellular carcinoma: relative expression of transforming growth factor alpha and its receptor in the different areas of the tumor». *Hum Pathol*, núm. 26, pàg. 1126-1132.
- MOTOO, Y.; N. SAWABU; Y. NAKANUMA (1991). «Expression of epidermal growth factor and fibroblast growth factor in human hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study». *Liver*, núm. 11, pàg. 272-277.
- MURAKAMI, Y.; K. HAYASHI; S. HIROHASHI [et al.] (1991). «Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinoma». *Cancer Res*, núm. 51, pàg. 5520-5525.
- NARDONE, G.; M. ROMANO; A. CALABRO [et al.] (1996). «Activation of fetal promoters of insulin-like growth factor II gene in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma». *Hepatology*, núm. 23, pàg. 1304-1312.
- NG, I. O.; E. C. LAI; S. T. FAN [et al.] (1994). «Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma». *Cancer*, núm. 73, pàg. 2268-2274.
- NISHIDA, N.; Y. FUKUDA; T. KOMEDA [et al.] (1994). «Amplification and overexpression of Cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma». *Cancer Res*, núm. 54, pàg. 3107-3110.
- ODA, T.; H. TSUDA; M. SAKAMOTO [et al.] (1994). «Different mutations of the p53 gene in nodule-in- nodule hepatocellular carcinoma as a evidence for multistage progression». *Cancer Lett*, núm. 83, pàg. 197-200.

- OGASAWARA, S.; H. YANO; A. IEMURA [et al.] (1996). «Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors and their relationship to proliferation of human hepatocellular carcinoma cell lines». *Hepatology*, núm. 24, pàg. 198-205.
- OKAYAMA, H.; A. NAGATA; S. JINNO [et al.] (1996). «Cell cycle control in fission yeast and mammals: identification of new regulatory mechanisms». *Adv Cancer Res*, núm. 69, pàg. 17-61.
- OKUDA, K. (1992). «Hepatocellular carcinoma: recent progress». *Hepatology*, núm. 15, pàg. 948-963.
- PARADIS, V. [et al.] (1998). «Clonal aneuploidy of macronuclei in liver cirrhosis using the X-chromosome inactivation pattern of human androgen receptor gene (HUMARA)». *Modern Pathol*, núm. 11, pàg. 156A..
- PIGNATELLI, M., T. W. ANSARI; P. GUNTER [et al.] (1994). «Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage». *J Pathol*, núm. 174, pàg. 243-248.
- PINYOL, M.; L. HERNÁNDEZ; M. CAZORLA [et al.] (1997). «Deletions and loss of expression of p16<sup>MTSI/CDK4</sup> and p21<sup>Waf1</sup> genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas». *Blood*, núm. 89, pàg. 272-280.
- REED, (1994). «Bcl-2 and the regulation of programmed cell death». *J Cell Biol*, núm. 124, pàg. 1-6.
- SCORSONE, K. A.; Y. Z. AHOUE; J. S. BUTEL [et al.] (1992). «P53 mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China». *Cancer Res*, núm. 52, pàg. 1635-1638.
- SLAGLE, B. L.; Y. ZHOU; W. BIRCHMEIER [et al.] (1993). «Deletion of the E-cadherin gene in hepatitis B virus-positive chinese hepatocellular carcinomas». *Hepatology*, núm. 18, pàg. 757-762.
- SOINI, Y.; N. VIRKJÄRVI; V-P. LETHO; P. PÄÄKKÖ (1996). «Hepatocellular carcinomas with a high proliferation index and a low degree of apoptosis and necrosis are associated with a shortened survival». *Br J Cancer*, núm. 73, pàg. 1025-1030.
- TSUDA, H.; W. ZHANG; Y. SHIMOSATO [et al.] (1990). «Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 87, pàg. 6791-6794.
- TABOR, E. (1997). «Liver tumors and host defense». *Semin Liver Dis*, núm. 17, pàg. 351-355.
- TAKADA, S.; Y. GOTOH; S. HAYASHI [et al.] (1990). «Structural rearrangement of integrated hepatitis B virus DNA as well as cellular flanking DNA is present in chronically infected hepatic tissues». *J Virol*, núm. 64, pàg. 822-828.
- TAKAYAMA, T. [et al.] (1990). «Malignant transformation of adenomatous hyperplasia to hepatocellular carcinoma». *Lancet*, núm. 336, pàg. 1150-1153.
- TANAKA, S.; J. R. WANDS (1996). «Insulin receptor substrate 1 overexpression in human hepatocellular carcinoma cells prevents transforming growth factor beta 1- induced apoptosis». *Cancer Res*, núm. 56, pàg. 3391-3394.
- TERADA, T.; Y. NAKANUMA (1996). «Expression of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen and apoptosis-related antigens (bcl-2, c-myc, Fas, Lewis and p53) in human cholangiocarcinomas and hepatocellular carcinomas». *Pathol Int*, núm. 46, pàg. 764-770.
- UMBAS, R.; J. A. SCHALKEN; T. W. AALDERS [et al.] (1992). «Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high grade prostate cancer». *Cancer Res*, núm. 52, pàg. 5104-5109.
- VAUX, D. L.; A. STRASSER (1996). «The molecular biology of apoptosis». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 93, pàg. 2239-2244.
- VILLA, E.; L. CAMELLINI; A. DUGANI [et al.] (1995). «Variant estrogen receptor messenger RNA species detected in human primary hepatocellular carcinoma». *Cancer Res*, núm. 55, pàg. 498-500.
- WALKER, G. J.; N. K. HAYWARD; S. FALVEY [et al.] (1991). «Loss of somatic heterozygosity in hepatocellular carcinomas». *Cancer Res*, núm. 51, pàg. 4367-4370.
- WANG, H. P.; C. E. ROGLER (1988). «Deletion in human chromosome arms 11p and 13q in primary hepatocellular carcinomas». *Cytogenet Cell Genet*, núm. 48, pàg. 772-778.
- WANG, J.; X. CHENIVESSE; B. HENGLEIN [et al.] (1990). «Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in hepatocellular carcinoma». *Nature*, núm. 343, pàg. 555-557.
- WANG, X. Y. [et al.] (1997). «Interactive effects of p53 tumor suppressor gene and hepatitis B virus in hepatocellular carcinogenesis». A: Arroyo, V.; Bosch, J.; Bruguera, M.; Rodés, J. *Therapy in liver diseases*. Barcelona. Masson, pàg. 471-478.
- ZHANG, W.; S. HIRIHASHI; H. TSUDA [et al.] (1990). «Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 16 and 4 in human hepatocellular carcinoma». *Jpn J Cancer Res*, núm. 81, pàg. 108-111.
- ZHANG, Y.; W. JIANG; C. J. CHEN [et al.] (1993). «Amplification and overexpression of Cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma». *Biochem Biophys Res Com*, núm. 196, pàg. 1010-1016.
- ZHANG, X.; H. XU; Y. MURAKAMI [et al.] (1994). «Deletions of chromosome 13q, mutations in retinoblastoma 1, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma». *Cancer res*, núm. 54, pàg. 4177-4182.