

La firma genética para el diagnóstico molecular del carcinoma hepatocelular

BEATRIZ MÍNGUEZ^a, AUGUSTO VILLANUEVA^a Y JOSEP M. LLOVET^{a,b}

^aMount Sinai Liver Cancer Program. Division of Liver Diseases. Mount Sinai School of Medicine. Nueva York. Estados Unidos.

^bBarcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Group, Liver Unit, IDIBAPS. Hospital Clínic. Barcelona. España.

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la causa principal de muerte entre pacientes cirróticos y se ha convertido en un problema de salud pública de primer orden¹. La incidencia de esta neoplasia está aumentando en Europa y Estados Unidos, en estrecha relación con la alta prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis C^{2,3}.

Hepatocarcinogénesis y clasificación molecular del carcinoma hepatocelular

Estudios epidemiológicos y de biología molecular han establecido que las principales causas de hepatocarcinogénesis en el mundo son la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB), la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), la exposición a aflatoxina B, y cualquier causa de cirrosis hepática⁴. La distinta distribución geográfica de la prevalencia de estos factores determina la heterogénea incidencia de la enfermedad y la diversidad clínica de la misma.

La patogénesis molecular del CHC es compleja⁵⁻⁷. Aunque en el 80% de los casos el tumor se desarrolla sobre hígado cirrótico, también se puede desarrollar sobre un hígado sano o un hígado no cirrótico con otra enfermedad subyacente. Cada una de estas situaciones implica diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas, aberraciones cromosómicas, mutaciones de genes y activación de vías de señalización moleculares específicas. La hipótesis más aceptada es la que propone un proceso escalonado en el que estímulos externos inducen alteraciones en hepatocitos maduros (o células progenitoras⁶), induciendo apoptosis, proliferación celular, displasia y neoplasia⁵. Durante la etapa preneoplásica se da una sobreexpresión de las vías de señalización mitogénicas que llevan a la selección de algunos clones de células displásicas. Estos clones, organizados en nódulos displásicos y rodeados por tejido conectivo, pueden malignizarse tras la exposición a alteraciones genómicas adicionales⁵⁻⁷. Estas alteraciones van desde mutaciones puntuales en genes concretos hasta la ganancia o pérdida de brazos en los cromosomas.

Desde el punto de vista genético, se han postulado distintos mecanismos de hepatocarcinogénesis de acuerdo a distintas etiologías. Estos mecanismos parecen relevantes en estadios preneoplásicos o en fases iniciales del proceso maligno. En principio, el VHC se ha involucrado en la hepatocarcinogénesis de forma directa (como ligando Wnt, mediante trans-

Puntos clave

- El carcinoma hepatocelular es una enfermedad causada por alteraciones en el genoma que implican genes involucrados en el control de la proliferación celular, apoptosis y ciclo celular, principalmente.
- Las vías de señalización más comúnmente involucradas en la patogénesis del carcinoma hepatocelular (CHC) son la vía canónica de Wnt, las vías de señalización de Ras/ERK, Akt/mTOR, y VEGF.
- La clasificación molecular del CHC no está establecida, aunque estudios recientes sugieren 4 grupos distintos de tumores desde el punto de vista biológico.
- No hay marcadores serológicos aceptados para el diagnóstico temprano del CHC. El diagnóstico temprano del CHC es difícil mediante técnicas avanzadas de radiología o anatomía patológica convencional.
- La firma genética es un grupo de genes, resultado de la aplicación de algoritmos al estudio de genes mediante *microarrays*, que pueden identificar estadios, respuesta a tratamiento o predecir supervivencia. La firma genética compuesta por *GPC3*, *LYVE1* y *survivina* es capaz de distinguir los nódulos displásicos del CHC temprano con un gran poder discriminativo.

activación de RAS, inactivación de p53) y de forma indirecta mediante la inducción de cirrosis y las alteraciones que ésta conlleva (activación de vías mitogénicas como TGF-alfa, estrés oxidativo, alteraciones inmunológicas, activación de NF- κ B, etc.)⁵⁻⁷. En cambio, el VHB tiene un papel carcinogénico directo algo más establecido como consecuencia de su inserción en el genoma produciendo inestabilidad genómica y aberraciones genéticas, inserciones en el promotor de genes tumores supresores, como p16, y producción de oncoproteínas como HBx. En fases donde el fenotipo maligno es más manifestamente avanzado, se observan alteraciones comunes de vías de señalización que inducen proliferación celular, inhibición de apoptosis y neoangiogénesis.

Las vías de señalización más consistentemente alteradas en CHC son la vía canónica de Wnt (como resultado de mutaciones en B-catenina o axin 1/2, silenciamiento epigenético de E-cadherina, o alteraciones en la expresión de receptores, como Frizzles 7)^{6,7}. Esta vía se ha descrito alterada en el 30% de los CHC y en cerca del 70% de los hepatoblastomas. La vía de Akt/mTOR está implicada en la hepatocarcinogénesis tanto mediante el aumento de proliferación tumoral (a través de la señal de mTOR) como a través de la inhibición de la apoptosis (mediante alteraciones de la señal de Bcl-2). Esta vía de señalización está alterada en el 30-50% de los cánceres hepáticos, como consecuencia de activaciones en la vía de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (por mutaciones del receptor IGF-2 o aumentos autocrinos/paracrinos de los ligandos, como IGF-2) o a través de mutaciones somáticas de PI3K o PTEN que inactivarían estas proteínas. La vía de Raf/Ras/Erk también está activada casi universalmente en estadios avanzados como resultado de incrementos en la señalización inducida por factores de crecimiento (EGFR, HGF, etc.) y de la inactivación de tumores supresores (RAFSS1A)⁸. Otras alteraciones que se consideran indispensables para la proliferación y diseminación de los tumores son la neoangiogénesis como resultado de la activación de vías proangiogénicas tanto en el tumor como en el endotelio (VEGFR, PDGFR, angiopoietina-2), así como la activación de las telomerasas para permitir la inmortalidad celular. Finalmente, alteraciones involucrando genes que controlan el ciclo celular son manifiestas en estadios avanzados del CHC, como la inactivación de p53, o la activación de ciclina D1.

En la actualidad no hay una clasificación molecular del CHC, aunque ya han aparecido estudios que sugieren distintos subgrupos biológicos. La aproximación más habitual para la caracterización de subgrupos moleculares pronósticos es mediante el análisis del transcriptoma utilizando *microarrays* y su asociación con supervivencia. Alternativamente, se han propuesto clasificaciones biológicas que reconocen subgrupos moleculares de CHC mediante el análisis integrado del transcriptoma, mutaciones, aberraciones cromosómicas, inestabilidad genética y alteraciones epigenéticas. Estos estudios también identifican subgrupos que son más homogéneos biológicamente (y por tanto identificables para dianas terapéuticas específicas), pero sin implicaciones pronósticas establecidas. En principio, los 2 estudios principales publicados^{9,10} sugieren que hay 4 grandes grupos de CHC según sus alteraciones moleculares: *a*) uno con alteraciones de la vía canónica de Wnt; *b*) otro con alteraciones de las vías de factores de crecimiento (IGF, EGF y sus efectores intracelulares

Ras/Erk y Akt/mTOR, incluyendo un subgrupo de tumores con activación de genes que sugieren un origen tumoral de *stem cells*); *c*) un tercer grupo con alteraciones predominantes del ciclo celular (p53, ciclina D1), y *d*) otro subgrupo aún no caracterizado.

Diagnóstico temprano del carcinoma hepatocelular

El conocimiento de los genes alterados en las lesiones preneoplásicas y en estadios iniciales del tumor será útil para establecer el diagnóstico molecular de esta neoplasia. En la actualidad, el diagnóstico temprano del cáncer se puede establecer en el contexto de programas de vigilancia mediante la rápida detección por técnicas de imagen o mediante marcadores serológicos. Las guías de manejo actual del CHC aconsejan la realización de una ultrasonografía abdominal cada 6 meses en pacientes cirróticos y en subgrupos especiales de pacientes con infección por el VHB^{11,12}. Sin embargo, actualmente no hay ningún marcador serológico que haya mostrado eficacia diagnóstica o cuya utilidad de forma aislada o en combinación sea considerada coste-efectiva¹¹⁻¹³. Los marcadores serológicos más ampliamente evaluados, como AFP, des-gamma-carboxiprotrombina (DGCP) y la fracción AFP-L3 no son fiables para el diagnóstico temprano del CHC¹³, ya que sólo están alterados en menos de la mitad de los pacientes con tumores iniciales. En estudios de cohortes realizados en la última década, la mayoría de tumores son identificados mediante técnicas de imagen, y sólo un porcentaje marginal se diagnostica como resultado de las alteraciones de estos marcadores¹⁴. En cambio, todos ellos se han propuesto como marcadores pronósticos en estadios avanzados de la enfermedad.

Como resultado de los programas de vigilancia en Occidente y Japón, la detección temprana del CHC es actualmente posible en el 30-60% de los casos¹. Estos pacientes son tributarios, en principio, de tratamientos con intención radical, como resección hepática, trasplante o ablación percutánea^{1,11,12}. De hecho, en las décadas de 1980-1990 menos del 5% de los tumores diagnosticados presentaban un tamaño inferior a 2 cm, mientras que en la actualidad en Occidente este grupo representa alrededor del 10% del total y en Japón el 30%. Los nódulos de pequeño tamaño (< 2 cm) detectados en el contexto de programas de vigilancia representan un reto diagnóstico, puesto que son difíciles de caracterizar tanto desde el punto de vista radiológico como anatomopatológico^{15,16}. De acuerdo con la guías de la American Association for the Study of Liver Diseases, el CHC se diagnostica en el contexto de un paciente cirrótico cuando una técnica de imagen (tomografía computarizada o resonancia magnética, o ecografía con contraste de segunda generación) muestra hipercaptación en la fase arterial y *wash-out* en la fase venosa portal o tardía¹¹. Para nódulos entre 1 y 2 cm se requieren 2 técnicas de imagen coincidentes en establecer criterios radiológicos característicos. Una validación prospectiva reciente de estos criterios demuestra que el diagnóstico radiológico certero de esos nódulos es posible en el 30% de los casos¹⁷.

El diagnóstico anatomopatológico de los nódulos hepáticos de menos de 2 cm detectados mediante vigilancia es heterogéneo. Expertos hepatopatólogos frecuentemente discrepan del diagnóstico final de tumores iniciales, que son mal clasificados como nódulos displásicos¹⁶. La tinción con CD34 o alfafetoproteína tiene notables limitaciones diagnósticas. En cualquier caso, el estudio anatomopatológico se considera el criterio de referencia, y diagnostica adecuadamente el 30-50% de los nódulos de pequeño tamaño.

Hay una necesidad evidente de incorporar técnicas moleculares para el diagnóstico del CHC inicial, lo cual tendrá implicaciones clínicas notables. En principio las guías europeas y americanas del tratamiento del CHC^{11,12} recomiendan que los nódulos displásicos deben ser objeto de seguimiento en el contexto de programas de vigilancia, ya que menos de un tercio de los mismos adquirirán el fenotipo maligno^{18,19}. Por otro lado, los CHC iniciales son los candidatos ideales para tratamientos curativos, puesto que proporcionan medianas de supervivencia que exceden los 60 meses¹. Por lo tanto, hay una urgente necesidad de caracterizar los tumores de pequeño tamaño y de identificar biomarcadores para los mismos.

Diagnóstico molecular del carcinoma hepatocelular

La ausencia de marcadores serológicos de CHC inicial ha estimulado el estudio de marcadores tisulares, puesto que éste es el primer paso recomendado por la Early Detection Research Network of the National Cancer Institute¹³ para el descubrimiento de nuevos marcadores tumorales. Además, la

realidad clínica está imponiendo la necesidad de incorporar técnicas moleculares más precisas que las técnicas radiológicas de última generación, o los estudios anatomopatológicos convencionales.

Una variedad de estudios genómicos han evaluado posibles marcadores tisulares de CHC, como *heat shock protein 70*²⁰, *Glypican-3*²¹, *telomerase reverse transcriptase*, *serine/threonine kinase 15* y *phospholipase A2*²². El diagnóstico molecular de CHC se propuso inicialmente utilizando el “índice molecular” que combinaba la expresión de un grupo de 13 genes entre los que destacaban *TERT*, *TOP2A* y *PDGFRA*²³. Más recientemente, y mediante técnicas de análisis de todo el transcriptoma utilizando *microarrays* se ha identificado una firma genética compuesta por 120 genes que discrimina entre los nódulos displásicos y el CHC en pacientes con infección por VHB²⁴. Los estudios proteómicos en tejido aún no han identificado marcadores informativos. La limitación fundamental de la mayoría de estos estudios es que se compara la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) o de la proteína en el tumor y en la cirrosis, y no en la lesión preneoplásica.

En un estudio reciente²⁵ hemos analizado la expresión de 55 potenciales marcadores tisulares de CHC inicial, identificando un grupo de 3 genes (*Glypican-3*, *survivina* y *LYVE1*) con una eficacia diagnóstica del 94%, y que fueron validados en una serie independiente de muestras, mostrando una eficacia del 85% para discriminar nódulos displásicos de CHC inicial < 2 cm (tabla 1). Los genes seleccionados fueron asimismo testados en tumores avanzados confirmándose la misma tendencia que en tumores iniciales²⁵ (fig. 1). Finalmente, de entre los 2 genes sobreexpresados en CHC, *Glypican-3* mostró una gran eficacia diagnóstica en el estudio inmunohistoquímico (fig. 2), mientras que *survivina* fue incapaz de diferenciar tumores iniciales de nódulos displási-

Tabla 1. Genes con expresión significativamente alterada en carcinoma hepatocelular inicial en comparación con nódulos displásicos

Genes	Nódulos displásicos	CHC < 2 cm	AUC	p
Training set +	n = 17	n = 20		
Glypican-3: GPC3	2 (0,4-24)	36,6 (0,3-578)	0,84	0,001
Survivina: BIRC5	1,5 (0,7-6,2)	3,3 (0,8-23,5)	0,80	0,002
LYVE1: XLKD1	0,6 (0,1-1,8)	0,05 (0,01-0,3)	0,90	0,0001
Eficacia diagnóstica de la combinación de GPC3, BIRC5 y LYVE1: 94%				
Validation set ++	n = 10	n = 19		
Glypican-3: GPC3	1 (0,3-3,1)	9,29 (0,7-115)	0,77	0,022
Survivina: BIRC5	1 (0,5-1,9)	5,05 (1,4-18)	0,84	0,003
LYVE1: XLKD1	1 (0,3-2,9)	0,07 (0,01-0,4)	0,88	0,0001
Eficacia diagnóstica de la combinación de GPC3, BIRC5 y LYVE1: 85%				

+ Valores de expresión por Real time RT-PCR referidos a 1 = control sano.

++ Valores de expresión por Real time RT-PCR referidos a 1 = nódulo displásico.

AUC: área bajo al curva; CHC: carcinoma hepatocelular; LYVE1: *lymphatic vessel endothelial hyaluronan 1*; PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Adaptada de Llovet et al²⁵.

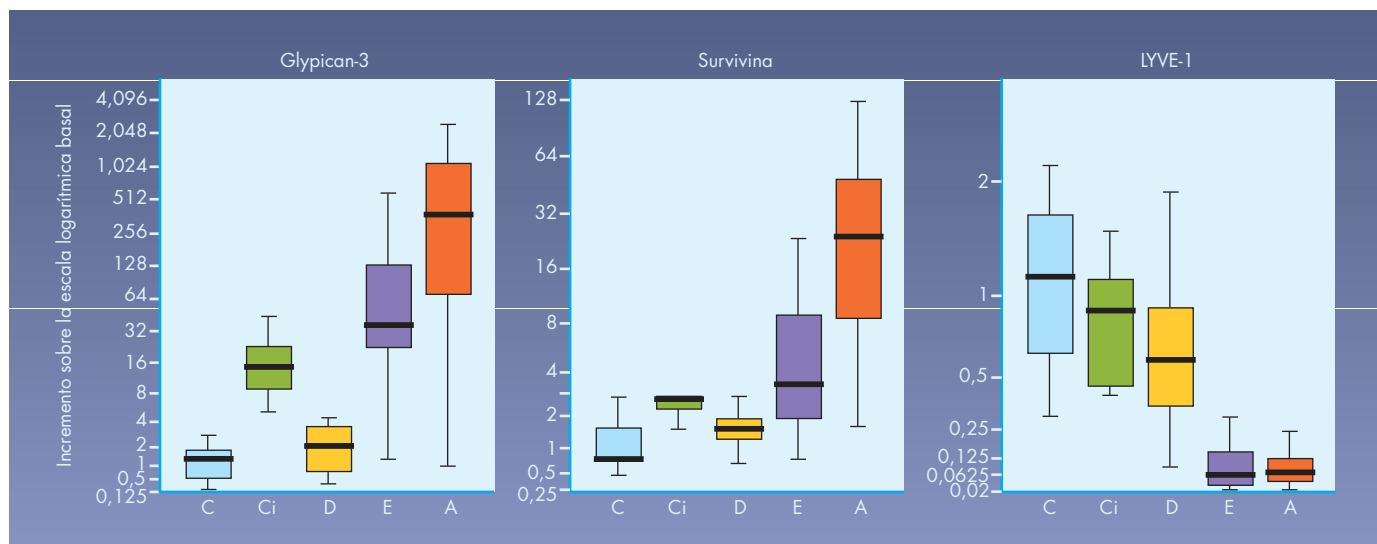


Figura 1. Perfil de expresión de genes mediante Real Time RT-PCR (TaqMan) de Glypican-3 (GPC3), survivina (BIRC5) y LYVE-1. Los resultados se expresan en números absolutos comparando muestras de tejido de controles (C, n = 10), cirrosis (Ci, n = 10), nódulos displásicos (D, n = 17), carcinoma hepatocelular inicial (CHC) < 2 cm (E, n = 20) y CHC avanzado (A, n = 20). Adaptada de Llovet et al²⁵.

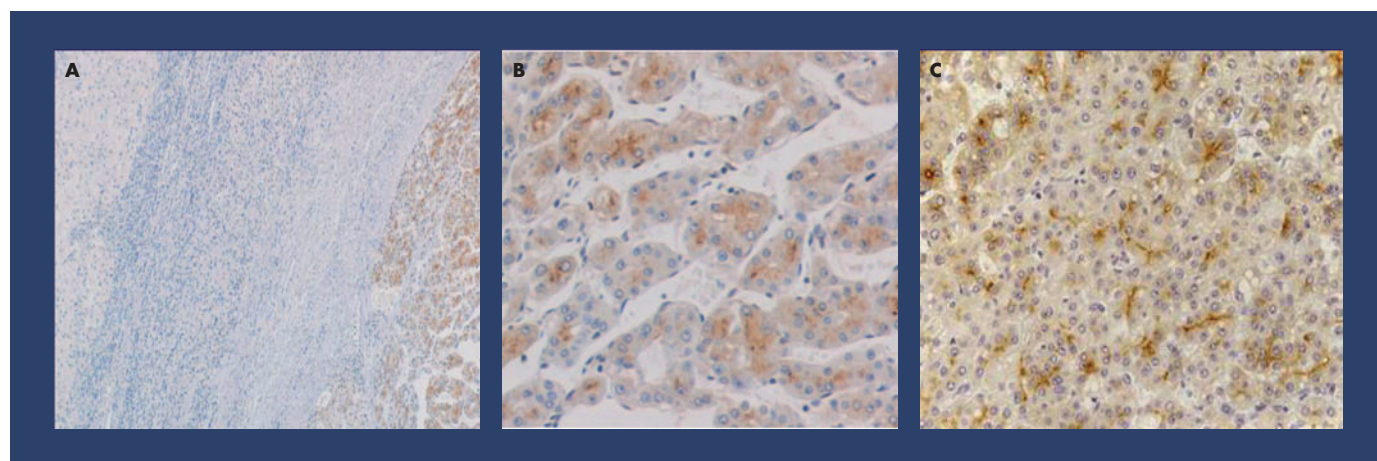


Figura 2. Inmunohistoquímica para GPC3 (X100-200). A) Nódulo cirrótico con ausencia de tinción. En la parte derecha tinción positiva por CHC inicial. B) carcinoma hepatocelular (CHC) inicial. C) CHC avanzado. Adaptada de Llovet et al²⁵.

cos, y sólo la tinción nuclear fue discriminatoria en casos de CHC avanzado. En un estudio posterior buscando nuevos marcadores tumorales utilizando análisis de *microarray* (Affymetrix 133plus 2) capaz de interrogar 46.000 genes o EST (*expressed sentence tag*) pudimos confirmar la alteración de los genes identificados, y asimismo identificar nuevos potenciales biomarcadores, como HMMR, ASPM y PRIM1, que requerirán validación a nivel proteico²⁶.

Conclusión

Las alteraciones genéticas del CHC se han estudiado extensamente en los 10 últimos años, lo que ha incrementado el conocimiento en este campo de forma exponencial, llevando a la descripción de alteraciones en diferentes vías de señalización celular. La clasificación trascritómica se relaciona estrechamente con el genotipo tumoral. La clasificación global

del carcinoma hepatocelular mediante firmas genéticas será crucial para definir subgrupos homogéneos de tumores con genotipos y vías de señalización alteradas semejantes.

El diagnóstico temprano del CHC inicial es complejo mediante técnicas de imagen sofisticadas y estudio anatomopatológico. En más de la mitad de los casos el diagnóstico final no es concluyente, y esto tiene enormes implicaciones clínicoterapéuticas. La identificación de marcadores tisulares de CHC inicial puede permitir el diagnóstico molecular de esta enfermedad. Recientemente, se ha identificado que el análisis combinado de 3 genes (*Glypican-3*, *survivina* y *LYVE1*) es capaz de discriminar satisfactoriamente los nódulos displásicos de los CHC de menos de 2 cm. Nuevos marcados tumorales serológicos son necesarios para el diagnóstico precoz del CHC en el contexto de programas de vigilancia. Los estudios de firmas genéticas y de proteómica pueden facilitar la identificación de dichos marcadores.

Bibliografía



- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003;362:1907-17.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:74-108.
- El Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*. 1999;340:745-50.
- Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127 (Supl 1):S5-S16.
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2002;31:339-46.
- Farazi P, DePinho R. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature reviews*. 2006;6:674-87.
- Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 2007;27:55-76.
- Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*. 2006;130:1117-28.
- Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med*. 2006;12:410-6.
- Boydault S, Rickman DS, De Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007;45:42-52.
- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005;42:1208-36.
- Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. Clinical management on hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *J Hepatol*. 2001;35:421-30.
- Marrero JA, Lok AS. Newer markers for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127 (5 Suppl 1):S113-9.
- Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, et al. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology*. 2004;126:1005-14.
- Bolondi L, Gaiani S, Celli N, Golfieri R, Grigioni WF, Leoni S, et al. Characterization of small nodules in cirrhosis by assessment of vascularity: the problem of hypovascular hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005;42:27-34.
- Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liv Dis*. 2005;25:133-42.
- Fomer A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Sole M, Ayuso JR, et al. Diagnosis of hepatic nodules < 20 mm in cirrhosis. Prospective validation of the AASLD guidelines for Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Hepatology*. 2007 (en prensa).
- Terasaki S, Kaneko S, Kobayashi K, Nonomura A, Nakanuma Y. Histological features predicting malignant transformation of nonmalignant hepatocellular nodules: a prospective study. *Gastroenterology*. 1998;115:1216-22.
- Borzio M, Fargion S, Borzio F, Fracanzani AL, Croce AM, Stroffolini T, et al. Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol*. 2003;39:208-14.

- Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, et al. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2003;37:198-207.
- Capurro M, Wanless IR, Sherman M. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2003;125:89-97.
- Smith M, Yue Z, Korth M, Do HA, Boix L, Fausto N, et al. Hepatitis C virus and liver disease: global transcriptional profiling and identification of potential markers. *Hepatology*. 2003;38:1458-67.
- Paradis V, Bieche I, Dargere D, Laurendeau I, Laurent C, Bioulac Sage P, et al. Molecular profiling of hepatocellular carcinomas (HCC) using a large-scale real-time RT-PCR approach: determination of a molecular diagnostic index. *Am J Pathol*. 2003;163:733-41.
- Nam SW, Park JY, Ramasamy A, Shevade S, Islam A, Long PM, et al. Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling. *Hepatology*. 2005;42:809-18.
- Llovet JM, Chen Y, Wurmback E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, et al. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology*. 2006;131:1758-67.
- Wurmback E, Chen Y, Khitrov G, Roayaie S, Fiel I, Schwartz M, et al. Genome-wide profiles of dysplasia and HCC in HCV -cirrhotic patients. *Hepatology*. 2007;45:938-47.

Bibliografía recomendada

Farazi P, DePinho R. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature reviews*. 2006;6:674-87.

La revisión más completa y actualizada de la patología del carcinoma hepatocelular.

Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med*. 2006;12:410-6.

La primera clasificación molecular del carcinoma hepatocelular, en la que se incluyen 3 grupos, uno de los cuales sugiere origen tumoral de células progenitoras.

Llovet JM, Chen Y, Wurmback E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, et al. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology*. 2006;131:1758-67.

Descripción del estudio que identifica 3 genes (Glypican-3, survivina y LYVE1) para el diagnóstico molecular del carcinoma hepatocelular.