

## INMUNOHEPATOLOGIA

### CASPASA 3 Y ALFA-FETOPROTEINA

*“Estudio inmunohistoquímico de los variables categóricas ordinales por caspasa 3 y alfa-fetoproteína de las lesiones hepáticas producidas por el virus de la hepatitis C (VHC) y su relación con el hepatocarcinoma (HCA). Captación genómica por fusión celular: una teoría de la involución de las especies en HCA. Cuarto postulado de la teoría celular”\**.

Martín Varela Vindas\*

#### SUMMARY:

**“Immunohistochemistry study of Ordinal Categorical Variables caspasa 3 and alfa-fetoprotein of hepatic lesions and the hepatitis C virus and your relation with hepatocarcinoma. Genomic capitation cellular fusion: a theory of the species involution”\***.

**Objective:** Measurement of immunohistochemistry marker of the caspasa 3 and alpha-fetoprotein in hepatic biopsies of chronic hepatitis and hepatic cirrhosis for C virus and the hepatocarcinoma.

#### RESULTS:

The caspasa 3 is positive in 3%, 7% 69% and alpha-fetoprotein is positive in 3%, 0%, 62%, and of the groups chronic hepatitis C virus, cirrhosis C virus and hepatocarcinoma respectively. P is significant only caspasa 3 group.

#### INTRODUCCIÓN:

El hígado es un órgano de origen endodérmico muy complejo. El carcinoma (1), (2), (5), (7), (8), (9), (10) 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. (11), (12), (13), (18), (20). Por tanto este estudio busca nuevos indicios etiopatogénicos de la hepatocarcinogénesis, que brinden nuevas estrategias diagnósticas y

terapéuticas para un cáncer que provoca seiscientos mil muertes al año alrededor del mundo. (21), (29), (30), (31), (32).

#### METODOLOGÍA:

— Tipo de estudio: es 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 analiza la prevalencia

\* Jefe de gastroenterología de la Clínica AMADE.

Doctorado Académico del Depto. Biología Celular y Patología Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, España.

Nota de origen:

\* Artículo derivado de la Tesis Doctoral: “Estudio inmunohistoquímico de las lesiones hepáticas producidas por el virus de la hepatitis C y su relación con el hepatocarcinoma”. Del DR. Martín Varela Vindas Ph.D. Director de la tesis: Dr. José Ignacio Paz Bouza Ph.D. Departamento de Biología Celular y Patología, Universidad de Salamanca, España. Calificación: Sobresaliente Cum Laude.

Artículo presentado en el congreso: 2do encuentro Iberoamericano de Biometría, julio 2009, Veracruz, México.

Artículo presentado en: XII Conferencia Española de Biometría, septiembre 2009, Cádiz, España.

docmartinvarela@yahoo.com

y distribución de variables categóricas ordinales, por medio de un sistema inmunohistoquímico, a través del desenmascaramiento antigénico de la peroxidasa.

- Muestreo y tamaño de la muestra: 1768 muestras para biopsia hepática del archivo computarizado de Anatomía Patológica, recolectados del 1 de diciembre de 1997 al 30 de noviembre de 2007. Todas las biopsias por cirrosis hepática

a Virus C (14 casos), 1 de cada cuatro biopsias de 125 casos de Hepatitis crónica a Virus C (31 casos) por ordenador. Además todos los casos de hepatocarcinoma (29 casos) por diversa etiología, del periodo 1997-2007, del Hospital Universitario de Salamanca, España.

### RESULTADOS:

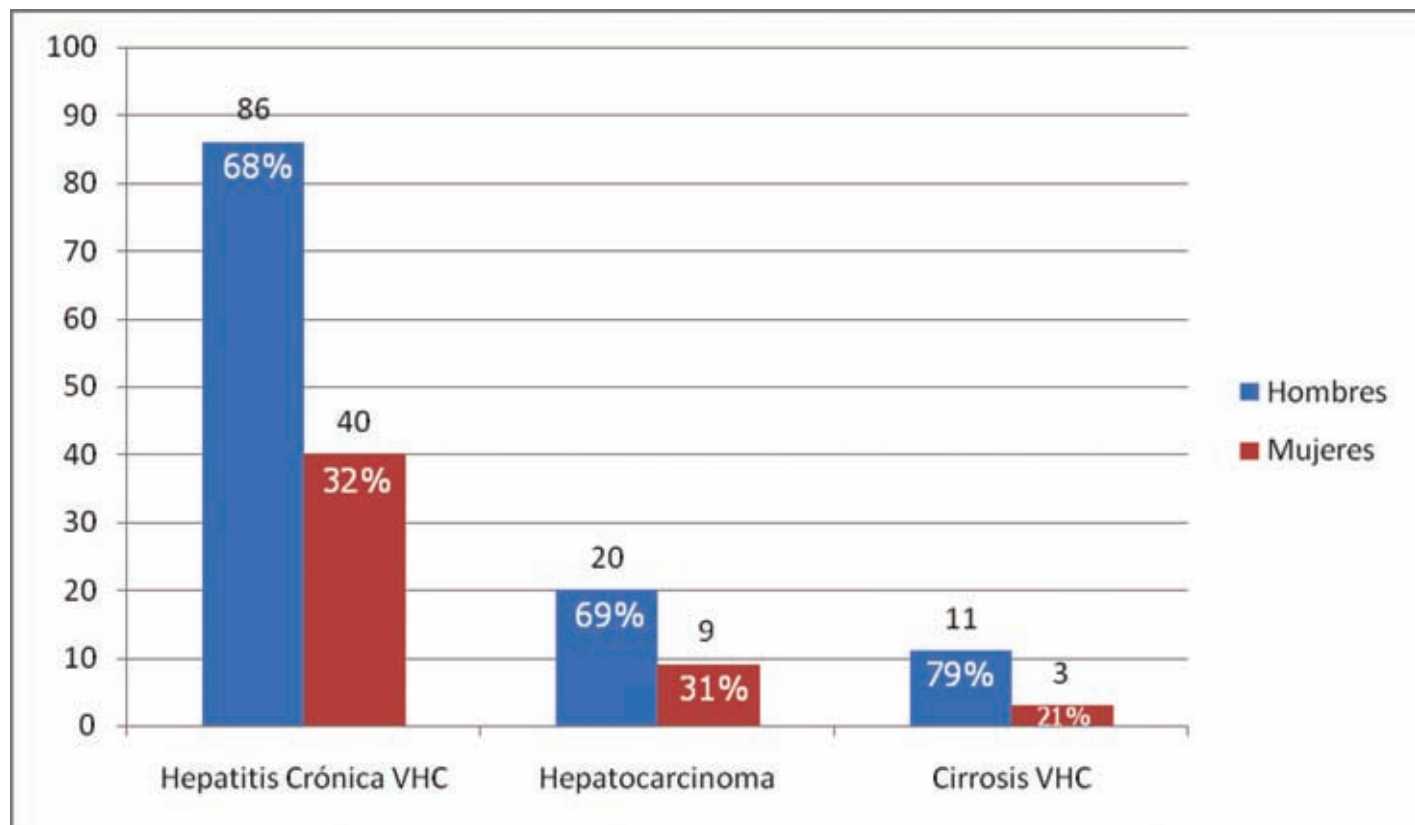
La distribución por sexo en

la Hepatitis crónica (VHC), Hepatocarcinoma (HCA), Cirrosis (VHC) es: 86 (68%), 20 (69%), 11 (79%) en hombres y 40 (32%), 9 (31%), 3 (21%) en mujeres, respectivamente.

La caspasa 3 positiva en 3%, 7% y 69% de los grupos de hepatitis crónica Virus C, cirrosis virus C y hepatocarcinoma, respectivamente.

P significativa (<0.001) sólo en el grupo caspasa 3.

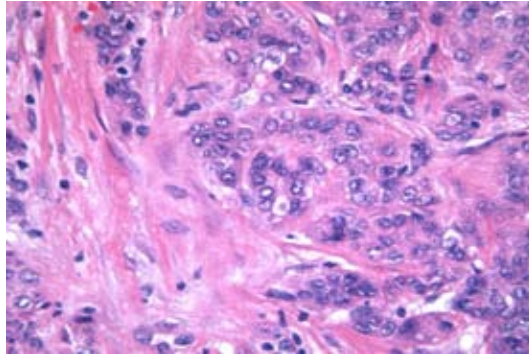
**FIG.1- DIAGRAMA DE BARRAS DE FRECUENCIA DE GÉNERO SEGÚN GRUPOS**



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

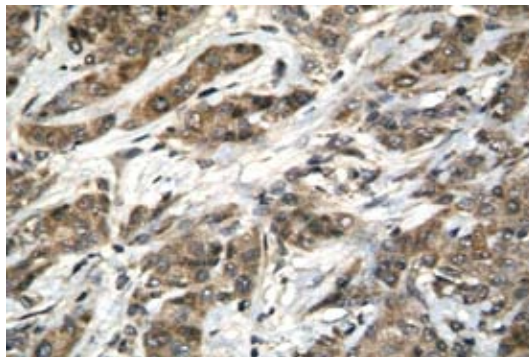
## FOTOS DE BIOPSIAS HEPÁTICAS EN HEPATOCARCINOMA (HCA)

### 1. Hematoxilina eosina HCA:



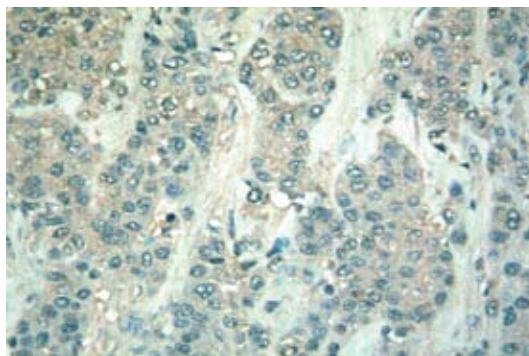
Hematoxilina eosina  
Hepatocarcinoma 40x  
HCA: Hepatocarcinoma

### 2. $\alpha$ -fetoproteína HCA.



$\alpha$ -fetoproteína 40x  
HCA: Hepatocarcinoma

### 3. Caspasa3 HCA.



Caspasa3 40x  
HCA: Hepatocarcinoma

## TABLAS DE CONTINGENCIA

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Frecuencia y distribución absoluta y porcentual de PIH *Tabla.1*

Actividad de  $\alpha$  fetoproteína y caspasa3, en biopsias con diagnósticos de Hepatocarcinoma y cirrosis VHC.

43 Biopsias	29 HCA				ATC					14 Cirrosis-VHC		
PIH	+	++	-	% positivos	P	S	E	VPP	VPN	+	-	% positivos
$\alpha$ fetoproteína	16	2	11	62%	ns	62%	100%	100%	56%	0	14	0
Caspasa 3	18	2	9	69%	< 0.001	69%	92%	92%	59%	1	13	7%

Frecuencia y distribución absoluta y porcentual de PIH *Tabla.1'*

Actividad de  $\alpha$  fetoproteína y caspasa3, en biopsias con diagnósticos de Hepatocarcinoma y Hepatitis VHC.

60 Biopsias	29 HCA				ATC					31 Hepatitis-VHC		
PIH	+	++	-	% positivos	P	S	E	VPP	VPN	+	-	% positivos
$\alpha$ fetoproteína	16	2	11	62%	ns	62%	96%	94%	73%	1	30	3%
Caspasa 3	18	2	9	69%	< 0.001	69%	96%	95%	76%	1	30	3%

PIH = Pruebas Inmunohistoquímicas; Actividad: Leve = +; Moderada = ++; Inactiva = -; HCA = Hepatocarcinoma; VHC = virus hepatitis C; ATC = Análisis de Tablas de Contingencia; P = Probabilidad ( $\chi^2$  Pearson); I = Incalculable; S = Sensibilidad; E = Especificidad; VPP = Valor Predictivo Positivo; VPN = Valor Predictivo Negativo.

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

Frecuencia y distribución relacionada de resultados de pruebas inmunohistoquímicas en HCA *Tabla 2*

29 Hepatocarcinomas c 3	4 HCA	12 HCA	8 HCA	5 HCA	Positividad
$\alpha$ fetoproteína +	3	5	6	4	20 / 69 %
$\alpha$ fetoproteína -	1	7	2	1	18 / 62 %
Total	4	12	8	5	11 / 38 %

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:

El hepatocito se infecta con el virus de la hepatitis C y posteriormente se produce una nueva célula hepatocitaria al fusionarse la célula hepática senescente (24) con la célula madre hepática o con la célula precursora hepática (oval). (4), (23). La denominaremos: célula simbiooncomutagénica hepática, la cual luego de reproducirse aceleradamente por el influjo viral (22) y en un contexto anatomopatológico de fibrosis inflamatoria, que puede corresponder a hepatitis crónica o a cirrosis, la misma presenta escape apoptótico 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. (16), (26), (28). 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. (3), (33).

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. (14). ¿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 (25) con posterior evolución a hepatocarcinoma. (15), (27). La caspasa 3 presente en el 69% de los casos de hepatocarcinoma nos demuestra la captación genómica por fusión celular ( $p < 0.001$ ) asociada a vías de señalización (incluyendo mutación de vías de supresión tumoral y activación de vías oncogénicas) y la presencia del VHC, con posterior escape caótico apoptótico (17) de la célula simbiooncomutagénica hepática por fusión celular derivados a través del segundo túnel neoplásico al fracasar la inmunovigilancia de un sistema ordenado (19), es lo que llamaremos el EFECTO GALAPAGOS (túnel caótico de un sistema ordenado) en contraposición del efecto mariposa (sistema caótico y aparición de ventana ordenada).

## CONCLUSIONES:

1. Predominio de pacientes del sexo masculino en los tres grupos.
2. La caspasa 3 se encuentra

activa en un 69% de los casos del grupo Hepatocarcinoma, versus 7% y 3% de los grupos cirrosis y hepatitis crónica a VHC respectivamente. Esta gran diferencia ( $p < 0.001$ ) nos demuestra que el parénquima hepático tumoral del Hepatocarcinoma está produciendo la caspasa 3 por captación genómica heredada por fusión celular en el proceso de simbiooncomutagénesis de la teoría de la fusión celular, de células hepáticas senescentes con células madre hepáticas y ovals, bajo múltiples vías de señalización y estrés oxidativo por inducción del virus de la hepatitis C, esto lo denominamos el EFECTO GALÁPAGOS.

3. Se recomienda ampliar el estudio con antígenos de superficie de la célula hepatocitaria tumoral para aclarar su origen jerárquico Bi ó multipartito por reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R), según la teoría de la fusión celular en la simbiooncomutagénesis del Hepatocarcinoma y VHC.
4. Se plantea el cuarto postulado de la TEORÍA CELULAR: "En circunstancias especiales una nueva célula se origina por fusión celular de dos o más células preexistentes".

## RESUMEN:

Medición de la actividad de los marcadores inmunohistoquímicos caspasa 3 y alfa-fetoproteína en biopsias hepáticas con los diagnósticos de hepatitis crónica y



cirrosis hepática por el virus de la hepatitis C (6) y el hepatocarcinoma en general. (1).

## BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Allende Daniela S and Yerian Lisa. Immunohistochemical Markers in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. Pathology Case Reviews 2009; 14: 40-46.
- 2) 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.
- 3) BLACKBURN, EH. Switching and signaling at the telomere. Cell, 2001; 106: 661-673.
- 4) Bosch Barrera J, Lopez – Picazo Gonzalez J.M., Garcia – Foncillas López J, Prósper Cardoso F. Células Madre y Cáncer: dilucidando el origen de la célula madre tumoral. Rev Med Univ Navarra/ Vol 51, N°2, 2007, 14 – 17.
- 5) CAPOCACCIA RICCARDO, Sant Milena, Berrino Franco, Simonetti Arianna, Santi Valentina, Trevisani Franco and the Eurocare Working Group. Hepatocellular carcinoma: trends of incidence and survival in Europe and the United States at the end of the 20<sup>th</sup> century. AM.J. Gastroenterol, 2007; 102: 1661-1670.
- 6) CHOO Q-L, KUO G, WEINER AM, JONES DB. Isolation of Ac DNA clone derived from A blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science, 1989; 244: 359-362.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) EL-SERAG HB, MASON AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. N Engl J Med, 1999; 340:745-750.
- 10) 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.
- 11) EL-SERAG HB, RUDOLPH KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. Gastroenterology, 2007; 132: 2557-2576.
- 12) EL-SERAG HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. Gastroenterology, 2004; 127 (5 suppl 1): S27-S34.
- 13) FAUCI, Anthony S; BRAUNWALD, Eugene. Harrison. Principios de Medicina Interna. McGraw Hill, 17<sup>a</sup> Edición. 2008.
- 14) FIBBE WILLEM, E. Telomerase mutatis in aplastic anemia. Editorials. N Engl J Med, 2005; 352: 1481-1482
- 15) FRÖHLING, Stefan; DÖHNER, Hartmut. Chromosomal abnormalities in cancer. New England. J Med, 2008 August 14; 359: 722-734.
- 16) HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res, 1965; 37: 614-636.
- 17) LANED P. p53: guardian of the genome. Nature, 1992; 358: 1516.
- 18) LLOVET. Presentación oral, 2007. Annual Meeting, 4 junio 2007. Chicago, IL, USA.
- 19) 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.
- 20) NEAL KEITH, R. On Behalf of the Trent Hepatitis C Study Group. GUT 2007; 56: 1098-1104.
- 21) PARKIN DM, BRAY F, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer 2001; 94:153-156.
- 22) 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.
- 23) POTENZA, Leonardo; LUPPI, Mario; BAROZZI, Patrizia. HHV- GA syncytial giant-cell hepatitis. New England. J Med, Number 6. 2008 August 7; 359: 593-602.
- 24) ROSENTHAL, Nadia. Prometheus's Vulture and stem-cell promise. Number 3. New England. Journal of Medicine, 2003 July 17; 349: 267-274.
- 25) 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.
- 26) SÁNCHEZ POSADA, Raúl. Características biológicas de la célula en el cáncer de colon con metástasis ganglionares. Tesis Doctoral. Salamanca, 2007.
- 27) SUN WEI, XING BAOCAL. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis. Molecular and Cellular proteomics, 2007; 6: 1798-1808.
- 28) TANG, Weiliang; LAZARO, Catherine A. 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) YU MW, CHEN CJ. Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma. Cancer Res, 1993; 53: 790-794.
- 32) YU MW, YANG YC, YANG SY. 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.
- 33) ZEN YOH, FUJII TAKAHIKO. 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.