Virus de la hepatitis y carcinoma hepatocelular

Solís-Herruzo JA, Solís-Muñoz P. Virus de la hepatitis y carcinoma hepatocelular. *An Med Interna (Madrid)* 2005; 22: 157-161.

El carcinoma hepatocelular (HCC), el tipo más común de cáncer primitivo del hígado, es el quinto tumor más frecuente en el mundo, representa aproximadamente el 5,4% de todos los tumores malignos y la tercera causa de muerte (1). Se estima que cada año se diagnostican unos 564.000 casos nuevos en el mundo y que una cantidad similar fallecen por esa causa (2). Sin embargo, su distribución en el mundo es muy irregular, pues si en los países del Norte de Europa y de América su frecuencia es relativamente baja (1-4/100.000 habitantes/año), en el África subsahariana y en el sureste asiático se eleva a 100-150/100.000 habitantes/año (3). En el presente número de Anales de Medicina Interna, Rodríguez-Vidrigal et al. (4) publican un estudio retrospectivo realizado en una comarca rural de Extremadura en el que refieren encontrar una incidencia de 5,45 nuevos casos de HCC/100.000 habitantes/año. En la ciudad de Valencia, García-Torres et al. (5), que analizaron la práctica totalidad de casos de HCC diagnosticados en toda la provincia, hallaron que esa incidencia en el año 2000 fue algo superior, de 8,24/100.000 habitantes.

Estudios epidemiológicos han mostrado que la cirrosis hepática, las infecciones por los virus de la hepatitis B (VHB) y de la hepatitis C (VHC), la exposición a la aflatoxina B1 y el alcohol son los principales factores etiológicos implicados en el desarrollo de este tipo de tumor (6). El 70-85% de todos los HCC están relacionados etiológicamente con la infección crónica por el VHB y VHC (7). En el 96% de los casos hallados por Rodríguez-Vidrigal et al. (4), el tumor se desarrolló en pacientes con cirrosis hepática, lo cual es prácticamente coincidente con lo que refieren García-Torres et al. (5) en su estudio (98%). En los países de nuestro entorno, la causa principal de cirrosis complicada con HCC suele ser la infección crónica por el virus de la VHC. Por ejemplo, en el estudio de Valencia, esta infección estaba presente en el 75% de los casos y en el estudio de Crespo et al., realizado en Cantabria, en el 60,6% de los enfermos (8). En el estudio de Extremadura, esta causa queda en un segundo lugar, tras el abuso alcohólico. Esta diferencia pudiera deberse al ambiente rural en el que se realizó el estudio y, eventualmente, a su carácter retrospectivo. Un hallazgo llamativo en este estudio es el carácter sintomático y avanzado de los tumores incluidos en esta serie. Sólo el 25%

de esos enfermos estaban asintomáticos, el 6% presentaba nódulos de pequeño tamaño, pudieron beneficiarse de un tratamiento curativo y el 60% sobrevivió al diagnóstico menos de un año. Como señalan los autores, son datos más desfavorables que los que se refieren en otras regiones y que pueden ser atribuidos a la carencia en su ambiente rural de medios para someter a los enfermos cirróticos a un programa de detección de nódulos hepáticos cada seis meses. Aunque no disponemos de estudios aleatorios, controlados, que demuestren la eficacia de estos programas, contamos con varios estudios que sugieren que estos permiten detectar la presencia de tumores en fases que aún se pueden beneficiar de tratamientos curativos (9,10). Otro resultado original del estudio de Rodríguez-Vidrigal et al. (4) es el relativamente mejor pronóstico de los pacientes con HCC infectados por virus de la hepatitis. Hasta el momento en ningún otro estudio se había hallado que los factores etiológicos del HCC tuvieran significación pronóstica. En la Conferencia de la *European Association for the Study of the Liver* de Barcelona, en el 2000, se concluyó que los factores pronósticos de este tumor son: a) estadio del tumor, agresividad y su tasa de crecimiento; b) grado de alteración de la función hepática; c) estado del enfermo; y d) tratamiento específico (11). Estas diferencias serán debidas, probablemente, al escaso número de pacientes incluidos en el estudio y al carácter retrospectivo del mismo.

Los mecanismos por los que los virus de la hepatitis inducen la carcinogénesis hepática no son bien conocidos. La casi constante presencia de una cirrosis hepática ha hecho pensar que la secuencia lesión-necrosis-inflamación-regeneración pudiera estar implicada en la hepatocarcinogénesis. Se sabe que en el curso de las mitosis se producen defectos en el ADN genómico. Estos defectos suelen ser intrascendentes, ya que las células normales disponen de medios para repararlos. La proteína p53 juega un papel esencial en esa reparación, puesto que se une al ADN y detecta la presencia de tales defectos. Cuando esto ocurre, p53 detiene la mitosis en la fase G1 hasta que el defecto es reparado. Si el daño es grave e irreparable, p53 activa otras vías que llevan a la célula a su muerte por apoptosis. Si este mecanismo de control es defectuoso o la división celular es muy rápida, los defectos en el ADN no son

reparados, las células anormales no mueren y se dividen a pesar de sus defectos. De esta forma, las alteraciones en el ADN se transmiten de unas generaciones celulares a otras y a ellas se van añadiendo defectos nuevos que finalmente determinarán la aparición del tumor (12).

Además de la cirrosis, la infección por el VHB multiplica por 20 el riesgo de desarrollar un HCC (13). El VHB es un virus hepatotrofo de doble cadena, que en la actualidad infecta a más de 400 millones de personas en el mundo, la mayoría en África, Asia y en el Pacífico occidental (14). Se admite que la integración del genoma viral en el genoma de las células hepáticas infectadas y la proteína HBx viral son factores primordiales en la hepatocarcinogénesis por este virus.

La integración viral se encuentra en el 80-90% de los HCC (15), se produce de forma arbitraria (16,17), es frecuentemente múltiple y en ella no se mantiene la integridad del genoma viral. La integración viral se comporta como un agente mutagénico, pues al intercalarse en algunos genes, obliga al reordenamiento cromosómico y provoca inestabilidad genómica (18,19). Entre los cambios cromosómicos que se producen figuran deleciones de genes supresores y amplificaciones, duplicaciones o sobreexpresiones de genes de factores que influyen en el control del ciclo celular (17,20). Wang Y et al. (16) y otros (21,22) hallaron que en los extremos del genoma viral integrado existen elementos de cromosomas diferentes, sugiriendo que tras la integración, el cromosoma se parte a ese nivel y luego se fusiona a otro diferente.

La proteína HBx del VHB (revisado en 23), una pequeña proteína necesaria para la replicación viral (24), ha sido también implicada en la carcinogénesis hepática, aunque no se sabe bien los mecanismos por los que actúa. Es posible que influya en la expresión de genes celulares implicados en la proliferación, viabilidad y transformación de los hepatocitos (revisado en 25,26). Algunos han referido que se comporta como un transactivador de genes celulares implicados en la proliferación celular, en especial de *c-jun*, *c-fos* y *c-myc*, pero se carece de pruebas de que esta actividad transactivadora sea la responsable de la carcinogénesis. Inicialmente se comprobó que la HBx se une al p53 y bloquea los efectos apoptóticos de esta proteína (27,28). Sin embargo, hay estudios que indican todo lo contrario, es decir, que la proteína HBx favorece la apoptosis (29,30). Este efecto proapoptótico puede ser neutralizado por Bcl-2 (31) y por la activación de la vía de la PI3K (*phosphoinositide-3 kinase*)/Akt (32). Algunos estudios en ratones transgénicos han mostrado que la HBx es carcinogénica (33), pero este efecto no ha sido comprobado por otros. Es más, algunos encuentran que HBx se comporta como un factor supresor de tumores inducidos por diversos oncogenes (31). En el HCC asociado al VHB, las secuencias del extremo 5' del gen HBx son las que más frecuentemente se encuentran integradas en el genoma celular (34), habitualmente sin incluir su extremo 3' (35). La actividad funcional de las proteínas HBx normal y truncada es diferente. Esto es importante en el hombre, donde la población viral es mixta, compuesta por virus normales y virus mutados en el gen HBx. Esta misma combinación se puede encontrar en el tejido tumoral, donde el gen HBx integrado se encuentra siempre mutado. El HBx truncado en su extremo carboxílico carece de la función transactivadora, proapoptótica y antiproliferativa que posee el HBx normal (36,37).

Los efectos proapoptóticos de p53 los ejerce a través de la proteína p21^{WAF1/CIP1} (p21). Ésta se une a la CdK (*cyclin depen-*

dent kinase), la inhibe, frena el ciclo celular en G1 (38,39) y eventualmente dirige a la célula hacia su muerte por apoptosis. Si p21 falta o es anormal no se detiene el ciclo celular, no hay apoptosis de las células anormales, las células proliferan aunque estén alteradas y puede desarrollarse el tumor. El gen p21 está controlado por p53 (38, 40), por lo que las alteraciones de éste pueden repercutir sobre p21 y su función (41). La infección por el VHB puede reducir la actividad de p21 a través de la neutralización de p53. En efecto, la HBx se une al extremo carboxílico de p53 (42,43) y le anula funcionalmente impidiendo su unión al gen del p21 (42-44). En el tejido HCC, se ha encontrado un descenso del ARN mensajero del p21 (45) que puede ser secundario a esta unión de HBx con p53. Además, el extremo carboxílico de HBx tiene efectos inhibidores sobre la proliferación y transformación celular, por lo que su ausencia determina que los efectos proliferativos y transformadores de *ras* y *myc* sean más marcados (46).

En algunos HCC relacionados con el VHB se han hallado mutaciones en el gen de la β -catenina, concretamente en la región correspondiente a la zona de ubiquitinación y de fosforilación. La β -catenina es una proteína citoplásmica que forma un complejo con la E-cadherina y participa en la adhesión intercelular (47). Su ausencia favorece la invasión tumoral (48). Además, la β -catenina forma parte de la vía Wnt que interviene en la embriogénesis (49) pero que si es activada de forma inapropiada puede conducir a la carcinogénesis (50). La fosforilación y ubiquitinación es necesaria para que la β -catenina sea degradada en los proteosomas (51). Las mutaciones halladas en el gen β -catenina impiden la fosforilación, ubiquitinación y su degradación proteosómica, por lo que se acumula en el citoplasma de las células y activa la vía de la Wnt (52) o se trasloca al núcleo donde se une al factor de transcripción Tcf/LEF (*T-cell factor/Lymphoid Enhancing Factor*) y activa la expresión de determinados genes (53).

El estudio de expresión de genes mediante la técnica de "DNA-microarray" en HCC por VHB ha mostrado que se encuentra reducida la expresión de genes de la fase II de la transformación de xenobióticos (UGT1A1, UGT2B10, GPX2), lo que hace esperar que se acumulen metabolitos tóxicos reactivos formados durante la fase I de la biotransformación de xenobióticos (54,55). Estos efectos del VHB sobre la expresión de esos genes puede explicar el sinergismo existente entre el VHB y determinados tóxicos (Aflatoxina B1) en la patogénesis del HCC. Aunque el etanol no es carcinógeno, el abuso alcohólico se encuentra muy frecuentemente en los enfermos con HCC. En la serie que comentamos, ello se encontró en el 66% de los casos y en el 27% este abuso se asociaba a infección por VHB o VHC (4). Esta asociación de infección viral y consumo abusivo de etanol puede favorecer la hepatocarcinogénesis por el camino indicado.

La infección crónica por el VHC es otra causa importante y creciente de HCC en Europa, Estados Unidos y Japón (56,57). En Los Ángeles, la frecuencia de anti-VHC en los pacientes con HCC ha aumentado del 29% en 1984-89 a 51%, en 1997-2001. En el estudio de Rodríguez-Vidigal et al. (4) la infección viral C estaba presente en el 42,8% de los casos. La infección por VHC como factor de riesgo de HCC aumenta cuando coincide con la infección por el VHB. Ambas infecciones actúan sinérgicamente, pues si el riesgo de HCC en los infectados por el VHC y VHB es de 24 y 20, respectivamente, en los infectados por los dos virus aumenta a 135 (12).

Los mecanismos por los que la infección crónica por el VHC conduce al HCC son difíciles de estudiar debido a la carencia de un modelo de pequeños animales donde realizar las investigaciones o de una línea celular susceptible de ser infectada. La inflamación crónica, las necrosis hepatocelulares y la regeneración celular que tienen lugar en la cirrosis por el VHC pueden ser los responsables de la carcinogénesis hepática (58). En cualquier caso, los mecanismos de carcinogénesis en el HCC por VHC parecen ser diferentes de los que intervienen en la infección por VHB. El VHC posee un genoma ARN, carece de actividad transcriptasa reversa y no se integra en el genoma celular. El estudio de la expresión genética en los tumores relacionados con el VHC mostró que en ellos estaba muy aumentada la expresión de los genes relacionados con las enzimas de la fase I de la biotransformación de xenobióticos. Este patrón es diferente al que estos mismos autores encontraron en los HCC relacionados con el VHB (54). Estas enzimas están capacitadas para transformar procarcinógenos en carcinógenos. Por ello, la infección por el VHC puede sensibilizar al hígado al efecto de procarcinógenos y carcinógenos, por ejemplo al etanol o a las aflatoxinas. También la frecuencia de las mutaciones en el gen de la β -catenina es mayor en los HCC por el VHC que los relacionados con el VHB (59). Además las mutaciones que se encuentran en uno y otro caso son diferentes (60). En la infección por el VHC se localizan en los codones 32 y 37, que son esenciales para la fosforilación ubiquitinación y degradación de la β -catenina (61). Por ello, parece que el VHC juega un papel muy importante en la activación de la vía Wnt a través de las mutaciones de la β -catenina.

En el tejido no tumoral de pacientes con HCC por VHC, la expresión de p21 está aumentada, mientras que en el tejido tumoral está disminuida (45). La proteína "c" del VHC reprime al promotor de p53 y la actividad de p21 (62). El aumento del ARN mensajero del p21 que se encuentra en el tejido no tumoral es atribuible a la actividad inflamatoria y tendría como significación el control del ciclo celular, deteniéndolo en G1, y dando tiempo a la reparación de las alteraciones del ADN o determinado la apoptosis de las células. La prolongación de la infección viral y las sucesivas muertes y regeneraciones celulares favorecerían la aparición de daños en el ADN para cuya reparación la actividad del p21 es insuficiente. En estas condiciones puede iniciarse la degeneración maligna. En este tejido tumoral, la reducción de p21 contribuye a acelerar el proceso. Algunos autores han referido que proteínas del VHC pueden unirse directamente al p53 (63,64.) y contribuir al desarrollo del cáncer de hígado posiblemente por interferir la vía p53/p21/Waf1 (65). El gen del p53 presenta numerosas variantes polimórficas, algunas de ellas se han relacionado con el desarrollo tumoral (66) incluido el HCC. En estos se ha hallado una mutación por la que una arginina es sustituida por una prolina en el codon 72 del exón 4 (67,68). Esta variante del p53 es menos competente para suprimir la transformación celular e inhibir la apoptosis. Sin embargo, otros autores no han confirmado que estas mutaciones estén aumentadas en el HCC relacionado con el VHC (69).

Una de las proteínas del VHC que puede unirse a las proteínas celulares es la NS5A. Se trata de una proteína no estructural del VHC que se encuentra en el citoplasma y región perinuclear de las células (70), puede interferir con

la transmisión de señal y puede intervenir en la carcinogénesis hepática. Esta proteína interacciona con el dominio SH3 (*Src* homology 3) de la subunidad p85 de la PI3K (71,72), lo cual activa a su subunidad catalítica, p110. De esta forma, NS5A determina que p110 fosforile al fosfatidilinositol de las membranas celulares, dado lugar a la formación de PI(3,4,5)P3 (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*) y a que éste active la Akt (73). La activación de esta última quinasa tiene muchas consecuencias, entre otras la de inhibir la apoptosis. Este efecto, probablemente, lo ejerce por diversos mecanismos, uno de ellos es fosforilando y desactivando Bad. En células HeLa, se ha comprobado que NS5A aumenta la fosforilación de p85, Akt y Bad (71), lo que hace verosímil que por este camino aumente la supervivencia de las células aún cuando éstas sean anormales (74). Por este camino, la estimulación mantenida de PI3K puede conducir a la cancerogénesis.

La relación etiológica existente entre el desarrollo del HCC y la infección viral crónica permite suponer que el control de la infección viral se traducirá en una reducción de la frecuencia del HCC. Considerando que tanto el VHB como el VHC tienen como reservorio exclusivo al hombre, se puede predecir que las campañas profilácticas contra estas infecciones llevarán en el futuro a la casi desaparición de este tumor en el hombre. Sin duda, tendremos que esperar aún varias décadas para que ello ocurra, ya que estas infecciones están extraordinariamente extendidas en países con nivel económico muy bajo, donde en la actualidad no se pueden permitir tales campañas. Disponemos ya de indicios de que esto que sugerimos será realidad en el futuro. Por ejemplo, en los años 1970 se inició en el Japón una campaña de vacunación y de administración de gammaglobulina anti-VHB a todos los recién nacidos de madres portadoras del VHB con la que se logró que la tasa de portadores del VHB descendiera del 2,3% al 0,9% a finales de los 1990s. Probablemente, se tendrá que esperar otros 25 años antes de que ello se traduzca en un descenso de la frecuencia del HCC (75). Otra campaña de vacunación universal realizada en Taiwan se tradujo en la práctica desaparición del HCC infantil (76). De la misma forma, la exclusión de la sangre contaminada por el VHC, que se inició a comienzos de los 1990, probablemente determinará la disminución de los HCC por este virus a partir del 2010-2015. También es de esperar que el control de la replicación viral en los enfermos ya infectados contribuya a lo mismo. En efecto, se ha observado que el tratamiento mantenido de pacientes cirróticos por el VHB con lamivudina reduce el riesgo de HCC (77) y se ha mencionado que lo mismo ocurre en los pacientes infectados con el VHC si son tratados con interferón (78). Sin embargo, esto último está pendiente de ser aceptado universalmente (11). Esperamos, no obstante, que la introducción en un futuro próximo de nuevos tratamientos antivirales, más eficaces, mejor tolerados y más baratos contribuya a erradicar la infección viral en los actuales enfermos y a prevenir en ellos el desarrollo tumoral.

J. A. SOLÍS-HERRUZO Y P. SOLÍS-MUÑOZ

Servicio de Gastroenterología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Universidad Complutense. Madrid

Bibliografía

1. Anthony PP. Hepatocellular carcinoma: an overview. *Histopathology* 2001; 39: 109-118.
2. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37: S4-S66.
3. Bosch J, Ribes J, Borrás J. Epidemiology of Primary Liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 271-285.
4. Rodríguez-Vidigal FF, Baz MJ, Romero J, Del Puerto M. Epidemiología del carcinoma hepatocelular en un área rural. Papel de los virus hepatotropos en la supervivencia. *An Med Interna (Madrid)* 2005; 22: 162-166.
5. García-Torres ML, Zaragoza A, Giner R, Primo J, Olmo JA. Incidencia y factores epidemiológicos del carcinoma hepatocelular en Valencia durante el año 2000. *Rev Esp Enferm Digest* 2003; 95: 381-384.
6. Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000; 32: 225-237.
7. Anthony PP. Hepatocellular carcinoma: an overview. *Histopathology* 2001; 39: 109-118.
8. Crespo J, Dueñas C, Sánchez-Antolín G, Fábrega E, Carte B, Pons-Romero F. Infección por el virus de la hepatitis B y C en pacientes con carcinoma hepatocelular. *Med Clin (Barc)* 1996; 106: 241-245.
9. Nguyen MH, Keefe EB. Screening for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35 (5 Supl. 2): S86-S91.
10. Bolondi L, Sofia S, Siringo S, et al. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut* 2001; 48: 251-259.
11. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2001; 35: 421-430.
12. Solís-Herruzo JA. Hepatocellular carcinoma. Epidemiological and etiological factors. *Rev Esp Enferm Digest* 2003; 95: 377-380.
13. Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 75: 347-354.
14. Fair S, Perrillo RP. Hepatitis B and D. En: *Hepatology. A textbook of liver diseases*. 4ª edición. Zakim D, Boyer TD. Saunders. Philadelphia 2003; p. 959-1016.
15. Buendía MA. Genetics of hepatocellular Carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 185-200.
16. Wang Y, Lau SH, Sham JST, Wu MC, Wang T, Guan XY. Characterization of HBV integrants in 14 hepatocellular carcinomas: association of truncated X gene and hepatocellular carcinogenesis. *Oncogene* 2004; 23: 142-148.
17. Gozuacik D, Murakami Y, Saigo K, Chami M, Mugnier C, Lagorec D et al. Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging. *Oncogene* 2001; 20: 6233-6240.
18. Rogler CE, Chiasari FV. Cellular and molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Semin Liver Dis* 1992; 12: 265-78.
19. Urano Y, Watanabe K, Lin C, Hino O, Tamaoki T. Interstitial chromosomal deletion within 4q11-q13 in a human hepatoma cell line. *Cancer Res* 1991; 51: 1460-1464.
20. Chami M, Gozuacik D, Saigo K, Capiod T, Falson P, Lecoeur H et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 2877-2886.
21. Su TS, Hwang WL, Yauk YK. Usage of cryptic splice sites in citrullinemia fibroblasts suggests role of polyadenylation in splice-site selection during terminal exon definition. *DNA Cell Biol* 1998; 17: 415-425.
22. Brechot C, Gozuacik D, Murakami Y, Brechot PP. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 211-231.
23. Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999; 15: 373-379.
24. Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Matsubara K, Koshy R. Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 1993; 195: 305-314.
25. Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 357-368.
26. Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 189-205.
27. Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP et al. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interaction in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 14707-14712.
28. Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF κ B. *J Gen Virol* 2001; 82: 171-182.
29. Bergametti F, Prigent S, Lube B, Benoit A, Tiollais P, Sarasin A, Transy C. The proapoptotic effect of hepatitis B virus HBx protein correlates with its transactivation activity in stably transfected cell lines. *Oncogene* 1999; 18: 2860-2871.
30. Su F, Theodosis CN, Schneider RJ. Role of NF κ B and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B HBx protein. *J Virol* 2001; 75: 215-225.
31. Kim H, Le H, Yun Y. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 381-385.
32. Kim YC, Song KS, Yoon G, Nam MJ, Ryu WS. Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cell by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene* 2001; 20: 16-23.
33. Yu DY, Moon HB, Son JK, Jeong S, Yu SL, Yoon H et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J Hepatol* 1999; 31: 123-132.
34. Bergametti F, Prigent S, Lube etc, Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Brechot C. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995; 21: 313-321.
35. Chen WN, Oon CJ, Leong AL, Koh S, Teng SW. Expression of integrated hepatitis B virus variants in human hepatocellular carcinomas and its significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 885-892.
36. Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremdorf D, Brechot C. Hepatitis B virus, X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* 1999; 18: 4848-4859.
37. Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M et al. Biological impact of natural COOH-terminal deletion of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001; 61: 7803-7810.
38. Harper JW, Adami GR, Wei NM, Keyomarsi W, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-6.
39. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54: 1169-1174.
40. El-Dairy WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-825.
41. Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW et al. abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res* 1995; 55: 6012-6016.
42. Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induced liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991; 351: 317-320.
43. Ueda H, Ullrich SI, Gangemi JD, Kappel CA, Ngo L, Feitelson MA, et al. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat Genet* 1995; 9: 41-47.
44. Greenblatt MS, Feitelson MA, Zhu M, Bennett WP, Welsh JA, Jones R et al. Integrity of p53 in hepatitis Bx antigen-positive and -negative hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 426-432.
45. Kobayashi S, Matsushita K, Saigo K, Urashima T, Asano T, Hayashi H et al. p21WAF1/CIP1 messenger RNA expression in hepatitis B, C virus-infected human hepatocellular carcinomas tissues. *Cancer* 2001; 91: 2096-2103.
46. Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, et al. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001; 61: 7803-7810.
47. Provost E, Rimm DL. Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 567-572.
48. Jiang WG. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Hepatology* 1996; 83: 437-446.
49. Barker N, Morin PL, Clevers H. The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. *Adv Cancer Res* 2000; 77: 1-24.
50. Polakis P. The oncogenic activation of β -catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 15-21.
51. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997; 16: 3797-3804.

52. Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3?. *Curr Biol* 1998; 8: 573-581.
53. Behrens J, von Kries JP, Jul M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R et al. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996; 382: 638-642.
54. Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray. *Cancer Res* 2001; 61: 2129-2137.
55. Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH. Differential down-regulation of the UDP-glucuronyltransferase 1A locus is an early event in human liver and biliary cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 2979-2985.
56. 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.
57. Okuda K, Fujimoto I, Hanai A, Urano Y. Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer Res* 1998; 47: 4967-4972.
58. Di Bisceglie A. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. En: TJ Liang, JH Hoofnagle (eds.) *Hepatitis C*. Academic Press. San Diego 2000. pp 265-277.
59. Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL, Peng SY. Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 763-770.
60. Wong CM, Fan ST, Ng IOL. β -Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 136-145.
61. Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K et al. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin. *EMBO J* 1999; 18: 2401-2410.
63. Muramatsu S, Ishido S, Fijita T, Itoh M, Hotta H. Nuclear localization of the N53 protein of hepatitis C virus and factors affecting the localization. *J Virol* 1997; 71: 4954-4961.
64. Ishido S, Hotta H. Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor. *FEBS Lett* 1998; 438: 258-262.
65. Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A physically associated with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 2001; 75: 1401-1407.
66. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantvani F et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature* 1998; 393: 229-234.
67. Anzola M, Cuevas N, López-Martínez M, Saiz A, Burgos JJ, Martínez de Pancorbo M. Frequent loss of p53 codon 72 Pro variant in hepatitis C virus-positive carriers with hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2003; 193: 199-205.
68. Okada F, Shiraki T, Maekawa M, Sato S. A p53 polymorphism associated risk of hepatitis C virus infection. *Cancer Lett* 2001; 172: 137-142.
69. Leverì M, Gritti C, Rossi L, Zavaglia C, Civardi E, Mondelli MU, et al. Codon 72 polymorphism of p53 gene does not affect the risk of cirrhosis and hepatocarcinoma in HCV-infected patients. *Cancer Lett*. 2004; 208: 75-79.
70. Tanji Y, Kaneko T, Satoh S, Shimotohno K. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J Virol* 1995; 69: 3980-3986.
71. He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak PJ, Neddermann P, Vijaysri S, et al. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 2002; 76: 9207-9217.
72. Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. The hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2004; 279: 12232-12241.
73. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296: 1655-1657.
74. Djordjevic S, Driscoll PC. Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 426-432.
75. Moriwaki H. Prevention of liver cancer: basis and clinical aspects. *Exp. Mol Med* 2002; 34: 319-325.
76. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N Engl J Med* 1997; 336: 1855-1859.
77. Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1567-1570.
78. Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, Arakawa Y, Ide T, Sata M, et al. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. *Ann Intern Med* 1999; 131: 174-181.