



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA DELLE MALATTIE DEL
FEGATO**

XXII CICLO

**MARCATORI BIOMOLECOLARI NELLE MALATTIE CRONICHE
DEL FEGATO :
IMPLICAZIONI DIAGNOSTICHE E TERAPEUTICHE**

Tesi del
Dott. Antonio Mario Giacalone

Tutor
Prof. Lorenzo Marasà

Coordinatore del corso
Ch.mo Prof. Giuseppe Montalto

Anno Accademico 2010/2011

INTRODUZIONE

Il carcinoma epatocellulare (CE), tumore primitivo del fegato, occupa il quinto posto tra le neoplasie per il numero di nuovi casi all'anno, è la principale causa di morte in pazienti con cirrosi epatica, e globalmente la terza causa di decessi correlata al cancro (Llovet et al). In Italia, ogni anno la sua incidenza, nei pazienti affetti da cirrosi, varia dal 2% al 4%. Il trattamento dell'epatocarcinoma è spesso difficile da pianificare, poiché frequentemente il tumore viene diagnosticato in uno stadio avanzato, per tale motivo la prevenzione rappresenta un'importante fase per impedirne un aumento dell'incidenza , inoltre il CE , essendo una delle poche neoplasie di cui si conoscono i fattori di rischio , è indicato per proporre un buon programma di prevenzione atto a ridurre ogni possibile causa d'insorgenza. L'identificazione di nuovi biomarcatori oggi è uno dei principali obiettivi perseguiti da diversi gruppi di lavoro, in quanto , la loro identificazione potrebbe fungere da supporto alla diagnosi, evitando l'utilizzo di tecniche troppo invasive, come la biopsia epatica .Purtroppo anche la ricerca di markers tumorali, primo tra tutti l'alfa fetoproteina, non hanno dato risultati confortanti. Per cui si tende ad individuare nuove molecole che possano guidare ad una diagnosi di certezza in un tempo in cui la neoplasia possa essere ancora aggredita farmacologicamente. Lo stretto legame tra infiammazione ed oncogenesi è ben conosciuto, il CE ne rappresenta un ottimo modello . Circa il 90 % dei casi di CE insorge su una pregressa cirrosi epatica , che ne rappresenta il principale fattore di rischio (Schwartz M. et al.). L' infiammazione cronica gioca un ruolo chiave nello sviluppo del CE (Prieto J et al) , e ciò è ben comprensibile se si pensa all'eziologia della cirrosi , in cui, il danno epatico e la conseguente fibrosi , sono causate dalla produzione di collagene di tipo I e II da parte delle cellule di Ito e dalla produzione di citochine infiammatorie da parte cellule di Kupffer, stimulate dalla flogosi, causata in alta percentuale dall'infezione di virus epatotropi (*hepatitis B virus (HBV)* , *hepatitis C virus (HCV) virus*) .

In questo contesto gli epatociti ricevono un continuo stimolo rigenerativo per far fronte al danno tissutale, ciò potrebbe incrementare la probabilità che si verifichino delle mutazioni a carico di geni oncogeni o oncosoppressori capaci di condurre la cellula verso un fenotipo neoplastico (Garcea A.R et al). L'angiogenesi è un importante fattore coinvolto nella progressione neoplastica oltre che nell'infiammazione cronica. L'infiltrato flogistico porta allo sviluppo di fibrosi con il risultato di un aumentato incremento della resistenza al flusso sanguigno che causa un deficit di ossigeno e conseguente ipossia. Questa condizione stimola il rilascio di fattori pro-angiogenetici responsabili del remodelling vascolare e della formazione di nuovi vasi, utilizzati dalle cellule tumorali per metastatizzare altri distretti dell'organismo (Carmeliet P et al.) Quindi l'infiammazione cronica e l'angiogenesi caratterizzano il CE (Pugh C.W et al), in particolare molecole quali il Vascular Endothelial Growth Factor-A (*VEGF-A*), Tumor Necrosis Factor- α (*TNF- α*), Interleukin -6 (*IL-6*) e le Cyclooxygenase-2 (*COX-2*), molecole ad azione pro-angiogenetica e pro-infiammatoria, sono over-espresse nei pazienti con CE (Liu L.F et al.). E' stato dimostrato che in ogni individuo la diversa suscettibilità al danno infiammatorio, potrebbe essere dovuta a specifici polimorfismi genici presenti su geni citochinici e non i quali possono influenzare l'attività trascrizionale e post-trascrizionale e conseguenzialmente i loro livelli sierici o la loro struttura proteica (Jean-Daniel C. et al). Per definizione, un gene si dice polimorfico quando in una popolazione, siano presenti almeno due forme alleliche e l'allele raro abbia una frequenza almeno dell'1% (0,01). Polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), intesi come sostituzione di un singolo nucleotide con un altro a carico di sequenze non promoter, o più raramente nelle sequenze codificanti di geni che codificano citochine, chemochine e loro recettori, sono capaci di influenzare l'espressione delle proteine attraverso meccanismi differenti che modificano l'entità di trascrizione dell'RNA messaggero, agendo a livello di "splicing" o sulla sua stabilità (Bidwell J et al). Alcuni polimorfismi non sembrano dare effetti, altri invece influenzano l'esordio e l'andamento di varie patologie e, come intuito già fin dagli anni 50, anche la risposta a vari

farmaci. Viene stimato che ogni 300 nucleotidi si manifesti un SNP e circa l'1% di questi non sia silente, ma si traduca in variazioni fenotipiche. Diversi studi dimostrano l'associazione tra la presenza di vari polimorfismi e un aumento del rischio di sviluppare varie neoplasie, come il carcinoma prostatico della mammella del polmone e del colon-retto (Crivello A. et al). Pertanto, da ciò nasce l'idea di uno studio caso-controllo atto a valutare la frequenza di alcuni polimorfismi presenti nei geni VEGF-a, TNF- α e COX-2 e IL-6, per verificarne la loro possibile associazione con il rischio di insorgenza della malattia epatica o della sua progressione dallo stadio di cirrosi a quella di CE.

Epidemiologia ed Eziologia del CE

Il CE è la più frequente forma di tumore epatico ed è responsabile di circa il 90% dei tumori primari epatici nel paziente adulto, costituendo un importante problema sanitario soprattutto nei paesi in via di sviluppo. Il tumore del fegato è la sesta causa più frequente di cancro nel mondo e la terza causa di morte per tutti i pazienti malati di tumore. Possiamo distinguere aree ad elevata (Asia ed Africa), media (bacino del mediterraneo) e bassa incidenza (Nord Europa e Nord America), anche se ultimamente si è rilevato un incremento di mortalità per CE sia in Europa che negli Stati Uniti. Ogni anno, nel mondo, vengono diagnosticati più di 600.000 casi di tumore del fegato (più di 400.000 in Cina, Sud Corea, Giappone e Taiwan, 54.000 nell'Unione Europea e 15.000 negli Stati Uniti) e l'incidenza è in aumento. Nel 2002 ci sono state circa 600.000 morti per tumore al fegato di cui circa 370.000 in Cina, Sud Corea e Giappone, 57.000 in Unione Europea, e 13.000 negli Stati Uniti. Esistono differenze geografiche nella diffusione dell'epatite; questo comporta differenze anche nella gravità della cirrosi e nello sviluppo di CE. Nelle aree a maggiore incidenza, l'età di insorgenza va dalla terza alla quinta decade di vita, mentre nelle aree a minore incidenza si presenta viene tra la quinta e l'ottava decade di vita, con una maggiore frequenza nel sesso maschile di circa 4 volte superiore rispetto al sesso femminile (Llovet et al. 1999).

La mancanza di una sintomatologia clinica specifica rende difficile la diagnosi negli stadi iniziali e riducendo, quindi, l'aspettativa di vita. Nella maggior parte dei pazienti, il tumore è la fase evolutiva finale della cirrosi scompensata di qualsiasi eziologia. (Colombo M. et al). Il CE si presenta dopo una storia decennale di infezione cronica da HBV e HCV, nella maggioranza dei casi dopo una lunga epatopatia cronica esitata nello sviluppo di cirrosi, con conseguente intensa rigenerazione nodulare e displasia epatocellulare. Pertanto la prevenzione dell'infezione rappresenta un approccio razionale mirato a ridurre il problema nei vari ambienti epidemiologici a rischio. (Sherman M 2010). L'infezione virale cronica da virus dell'epatite B (HBV) e C (HCV) è la principale causa di tumore primitivo del fegato. Nella area Asia-Pacifico, più dell'8% della popolazione generale è infetta da HBV e tra il 2% e 4% è infetto da HCV. Negli ultimi decenni nelle aree in cui l'infezione da virus C risulta endemica, come il Giappone e l'Italia, si è osservato un aumento d'incidenza di CE.

Nelle aree ad elevata prevalenza, un'importante differenza tra il CE HBV correlato e quello HCV correlato è rappresentata dalla cronologia d'insorgenza. Infatti, l'infezione da HBV è acquisita più frequentemente alla nascita per trasmissione verticale, mentre l'HCV in età adulta, a seguito di emotrasfusioni, per cui l'insorgenza di CE avviene 10-20 anni prima nei soggetti con epatite B rispetto a quelli con epatite C. La prova conclusiva della responsabilità diretta di HBV nella carcinogenesi epatica viene dai risultati della campagna di vaccinazione anti epatite B che ha provocato una riduzione significativa nell'insorgenza di CE. L'incidenza di CE presenta variazioni geografiche in relazione all'esposizione anche ad altri fattori cancerogeni, quali l'aflatossina B, prodotto dall'*Aspergillus flavus*, un fungo ritrovato in molti cereali. Questa micotossina sembra indurre una specifica mutazione Guanina-Timina nel codone 249 del gene oncosoppressore p53, responsabile di cancerogenesi. Da studi epidemiologici si è riscontrato che alcune condizioni cliniche come la sindrome metabolica correlata all'obesità e il diabete, (condizioni la cui incidenza è in ascesa nei paesi occidentali) accanto all'insorgenza di infezioni virali e al consumo di alcool, rappresentano importanti fattori di rischio per

l'insorgenza di epatocarcinoma. Tutte queste condizioni conducono al danno epatico con un meccanismo di attivazione dello stress ossidativo (Bruix et al). Anche il tabacco è stato considerato un importante fattore eziologico, soprattutto nei paesi occidentali; sembra essere implicato nelle alterazioni del sistema di difesa dell'organismo. L'effetto del tabacco non è identico in tutti gli individui, ma dipende dall'età, dal numero di anni di esposizione al fumo, dal numero di sigarette e da predisposizione genetica ad eliminare i cancerogeni associati al fumo.

PATOGENESI MOLECOLARE

L'osservazione che solo una minoranza dei soggetti affetti da cirrosi vada incontro a trasformazione maligna suggerisce che ci sia un intervento di fattori co-oncogeni nel processo multistep della trasformazione *in vivo*. Lo sviluppo e la progressione di un tumore sono infatti considerati degli eventi in cui i sistemi di controllo della crescita cellulare e/o della morte programmata vengono progressivamente perturbati. Mutazioni a carico di geni, alterazioni della loro trascrizione e traduzione e di conseguenza dei loro prodotti proteici, potrebbero potenzialmente servire come biomarker della patologia (Wulfkuhle et al.). Pertanto una migliore conoscenza dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi del CE, ed in special modo le modifiche genetico-molecolari comuni ai diversi pathway implicati nella carcinogenesi epatica, avranno un ruolo fondamentale nella comprensione di come si sviluppa un CE e probabilmente di come lo si potrà curare (Edamoto Y. et al.). L'assenza di una predisposizione ereditaria evidente per lo sviluppo di CE, quale quella che è stata evidenziata per alcuni tumori (ad esempio carcinomi del colon-retto, della mammella e dell'ovaio), ha reso difficoltosa l'identificazione di geni chiave per lo sviluppo del CE. Il notevole progresso delle conoscenze e degli strumenti tecnologici nel campo della genetica molecolare ha portato negli ultimi anni ad un notevole aumento delle informazioni disponibili circa le alterazioni genetiche presenti nell'CE.

“Loss of Heterozygosity” (LOH) : Perdita dell’eterozigosità

Gli studi di biologia molecolare, di analisi dei “microsatelliti” (ripetizioni di piccole sequenze polimorfiche – cioè possibilmente variabili da individuo ad individuo – di 2-6 nucleotidi sparse in tutto il genoma) mediante MSA (PCR-based Microsatellite Marker Analysis) e di citogenetica molecolare CGH (Comparative Genomic Hybridization), hanno messo in evidenza un’ampia varietà di alterazioni cromosomiche, che vanno dai riarrangiamenti genomici legati all’integrazione dell’HBV-DNA, alla perdita di eterozigosi (perdita di un allele – LOH) in numerosi loci su un ampio numero di cromosomi, ad amplificazioni geniche (aumento del numero di alleli) (Buendia et al.). Le alterazioni cromosomiche nel CE comprendono perdite alleliche (LOH) a carico dei cromosomi 1p, 4q, 8p, 13q, 16q, 17p ed amplificazioni o aumenti del contenuto di DNA nelle regioni 1q, 8q e 17q. Una LOH in 1p è più frequente negli CE di piccole dimensioni e ben differenziati mentre le LOH in 16p e 17q sono più frequenti in tumori avanzati e metastatici. L’amplificazione della regione distale a 8q24 è in relazione alla sovraespressione del proto-oncogene c-myc. Numerosi geni oncosoppressori risultano inattivati da mutazioni o delezioni (p53, pRb, p16/INK4A, M6P/IGF2R, axina, E-caderina, BRCA2, PTEN/MAC) mentre è descritta l’attivazione oncogenica di β -catenina, ciclina D e ciclina A.

PATOGENESI MOLECOLARE DEL CE: INFIAMMAZIONE CRONICA

E INSORGENZA DI NEOPLASIA

Numerosi studi hanno dimostrato che tutte le neoplasie compaiono più frequentemente nei tessuti cronicamente infiammati; esempi classici includono l’infezione da *Helicobacter pylori* associata al cancro gastrico e la malattia infiammatoria cronica intestinale associata a cancro colon-rettale. Il legame tra infiammazione e insorgenza di neoplasia è stato descritto per la prima volta da Rudolph Virchow nel 1863, che dimostrò la presenza di leucociti nel tessuto neoplastico. Oggi numerosi dati confermano che l’infiammazione e l’oncogenesi sono

strettamente correlate. L'eziologia dell'infiammazione è piuttosto varia, può essere infettiva, ossia provocata da virus, batteri o parassiti, ma anche da agenti irritanti non infettivi, fisici o chimici. Ad esempio il virus di Epstein-Barr è l'agente eziologico responsabile della progressione della iniziale displasia in carcinoma naso-faringeo. I virus dell'epatite B e C sono la causa di più dell'80% di casi di CE nel mondo e l'infezione da papilloma virus umano è responsabile di cancro ano genitale. I parassiti come *clonorchis sinensis* causano infiltrati infiammatori cronici del tratto biliare e conseguente colangiocarcinoma. Per quanto riguarda gli irritanti non infettivi gli esempi possono essere numerosi: esofagite cronica e metaplasia di Barret, pancreatite e colecistite cronica; sono tutte condizioni infiammatorie che incrementano il rischio di cancro. Il meccanismo attraverso cui l'infiammazione può indurre neoplasia sono numerosi. In primo luogo l'infiammazione cronica è caratterizzata dall'infiltrazione nei tessuti danneggiati di cellule mononucleate, macrofagi, linfociti e cellule del plasma che conducono sia alla distruzione tissutale che ad un tentativo di riparazione. Il macrofago gioca un ruolo chiave nella risposta infiammatoria cronica grazie alla produzione di numerosi mediatori importanti per le difese dell'ospite. Ma l'attivazione persistente o patologica del macrofago può condurre ad un danno tissutale cronico. Le cellule neoplastiche possono attrarre differenti tipi cellulari all'interno del microambiente tumorale attraverso la secrezione di proteasi extracellulari, fattori proangiogenetici e citochine. L'interleuchina 10, citochina anti-infiammatoria può essere secreta dalle cellule tumorali per inibire le cellule T citotossiche, sfuggendo così alla risposta immune dell'ospite. Le chemochine che comprendono la più grande famiglia di citochine, sono responsabili della migrazione e attivazione di leucociti nei siti specifici. Queste includono le chemochine di tipo CC e CXC, le proteine chemiotattiche macrofagiche (MCP) che guidano i monociti macrofagi nel sito ove si trova la noxa patogena sia essa di tipo naturale (virus o batteri) che di origine neoplastica. Dunque le chemochine possono stimolare le cellule a rilasciare enzimi proteolitici favorendo la digestione della matrice extracellulare e provvedendo a un'ulteriore migrazione di cellule infiammatorie, la

crescita cellulare, favorendo inoltre anche l'insorgenza di metastasi grazie alla neo-angiogenesi infiammatoria. Pertanto un infiltrato cellulare attiva una cascata di effetti di tipo pro-tumorali, a seguito dell'alternarsi danno cellulare e attivazione dei geni del repair con ulteriore stimolo alla proliferazione cellulare è una più alta probabilità di accumulo di alterazioni genetiche e insorgenza del fenotipo tumorale (Macarthur et al). A guidare la risposta infiammatoria sono, come già detto, le citochine, esse si distinguono in due tipi: citochine prodotte dai linfociti Th1 (IFN gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-12 E IL-18) che promuovono la risposta immune cellulare – mediata e citochine prodotte dai linfociti Th2 (IL-4, IL-6 ed IL-10) che promuovono la risposta umorale. Da uno studio svolto su una popolazione di pazienti Cinesi si evince che individui con bassi livelli Th1 e più alti livelli Th2 avevano un rischio di CE di 20 volte superiore rispetto ai pazienti con combinazione genotipica più favorevole (alti livelli Th1 e bassi Th2). Lo stesso studio, svolto su un gruppo di pazienti non asiatici fece riscontrare un rischio di sole due volte superiore nei pazienti con profilo genotipico sfavorevole. Sembra dunque che anche l'appartenenza etnica funga da fattore di rischio, infatti furono trovate numerose differenze nella distribuzione dei polimorfismi nelle diverse popolazioni. Un'altra causa delle variazioni ritrovate tra soggetti non asiatici e soggetti cinesi è riscontrabile nella dieta: infatti, da numerosi studi sono state riportate associazioni inverse tra una dieta ricca di antiossidanti, in particolare retinoidi e selenio, e rischio di CE i quanto gli antiossidanti possono stimolare il sistema immune attraverso un'attività antivirale. Il consumo di antiossidanti risulta superiore nella popolazione americana rispetto a quella asiatica, mentre si è riscontrato un maggiore consumo di aflatossine, note per l'effetto immunosoppressivo e per le proprietà cancerogeniche, nei paesi orientali (Ognjanovic S. et al.). Un'ulteriore conferma alla carcinogenesi indotta dall'infiammazione è stata avanzata da studi che hanno cercato di stabilire il ruolo dell'interleuchina 6 nello sviluppo dell'epatocarcinoma. Vi è anche evidenza che citochine pro-infiammatorie e pro-angiogenetiche quali VEGF-a, TNF- α e COX-2 e IL-6, vengono over-espresse in soggetti con cirrosi e in quelli con CE. I geni che codificano per

VEGF- α , TNF- α e COX-2 e IL-6 contengono polimorfismi a singolo nucleotide o Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) , essi costituiscono la manifestazione più comune di instabilità genetica.

Interleuchina -6 (IL-6):

L'interleuchina 6 (IL-6) è una citochina multifunzionale che gioca un ruolo importante nella protezione epatica, inibisce l'apoptosi e promuove la rigenerazione del fegato. Le concentrazioni di IL-6 nel siero aumentano in seguito a: infiammazione cronica epatica, epatite alcolica ,epatite HBV e HCV correlata, steatosi epatica, tutte situazioni che possono condurre allo sviluppo di epatocarcinoma. I livelli di questa citochina sono dunque più alti nei pazienti con CE rispetto ai soggetti normali, l'IL-6 svolge anche un ruolo proliferativo per gli epatociti. Si sa da studi epidemiologici che l'epatocarcinoma ha una frequenza superiore nei maschi rispetto alle femmine. Per comprendere i meccanismi basilari delle differenze di sesso nell'insorgenza di CE, uno studio condotto da Wilscott E. Naugler et al. dimostra come la somministrazione di un cancerogeno chimico la dietilnitrosamina (DEN) nei topi (che causa CE nel 100% dei topi maschi e solo nel 10-30% delle femmine) causa un incremento delle concentrazioni sieriche di IL-6 maggiori nei maschi che nelle femmine. L'epato-cancerogenesi DEN indotta in topi maschi e femmine modificati geneticamente per non produrre IL-6 mostra una marcata riduzione di sviluppo del CE. Il danno epatico risulta ridotto dopo somministrazione di estrogeni sia nei maschi che nelle femmine e aumentato nelle femmine ovariectomizzate: questi risultati spiegano perché le femmine sono meno soggette a cancro epatico. Sia il danno epatico che la proliferazione compensatoria sono strettamente dipendenti dall'IL-6 e l'assenza di questa citochina sembra inibire quasi completamente l'epatocancerogenesi DEN indotta. Gli estrogeni, alla concentrazione presente nelle femmine sopprimono la produzione di IL-6 e inibiscono chimicamente la carcinogenesi epatica. Un meccanismo simile potrebbe essere riscontrato nel genere umano. E' stato dimostrato che SNPs presenti nel promoters del gene che codifica per IL-6 regolano i livelli circolanti . IL

polimorfismo in posizione -174 (rs1800795) del promoter dell'IL-6 è il più comunemente studiato in quanto si è dimostrato in linkage disequilibrium con altri markers studiati (rs1800797 e rs2069832). In posizione -174 si ha una sostituzione di una Guanina con una Citosina, il genotipo GG è stato associato con alti livelli di trascrizione del gene (Lin-Hung Wei et al).

Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)

Il VEGFA è una citochina che promuove l'angiogenesi sia fisiologica che patologica. (Semela D DJ.) esso è responsabile dell'invasione e della crescita delle cellule endoteliali, inoltre aumentando la permeabilità vascolare, facilita l'entrata in circolo delle cellule tumorali le quali daranno metastasi nei distretti tissutali più lontani. Il VEGF svolge un importante ruolo nelle patologie epatiche, compreso il CE, infatti la concentrazione del VEGFA circolante e sierico è stata trovata aumentata in proporzione al grading tumorale (Jinno K, et al). I livelli circolanti sono considerati markers indipendenti delle recidive e prognostiche della sopravvivenza generale dei soggetti con CE. Recentemente, sono stati valutati i benefici tratti dall'utilizzo di farmaci anti-VEGF. Il VEGFA è una glicoproteina omodimerica di 45KDa, essa con alta affinità a specifici recettori Flt-1 (VEGFR1) and Kinase insert domain receptor (KDR, VEGFR2) (Veikkola T et al). Diversi esperimenti hanno dimostrato che i recettori VEGFR1 e VEGFR2 sono espressi nel fegato cirrotico (Corpechot C et al.). Il VEGF svolge un ruolo importante anche nella risposta immunitaria, infatti un patologico livello elevato di VEGF, riscontrato nella maggior parte dei tumori è associato con una mancata risposta nei confronti delle cellule neoplastiche (Oyama T et al). Il gene che codifica per il VEGF è situato sul cromosoma 6p21 e contiene una regione codificante di 14 kb con 8 esoni e 7 introni (Vincenti V, et al). Molti polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) sono stati identificati nel gene del VEGF, alcuni di questi sono stati associati ad una differente espressione del gene del VEGF (Watson CJ et al.) Diversi autori indicano i livelli di espressione del VEGF come un fattore prognostico indipendente di molti tipi di tumori, come

ad esempio, il tumore alla prostata e al seno . (Ferrer F. et al.). In particolare nella regione 3' non trascritta del gene del VEGF in posizione +936 esiste un polimorfismo che vede la sostituzione di una Citosina (C) con una Timina (T) , i carriers dell'allele T mostravano bassi livelli di VEGF nel plasma rispetto ai non-carriers (Krippel P,et al).

Tumor necroses factor- alpha (TNF- α)

Il Tumor Necrosis Factor- alpha (TNF- α) è una citochina pro-infiammatoria pleotropica con numerose azioni immunologiche e metaboliche (Beutler B, et al). Il gene del TNF- α è localizzato sul cromosoma 6p21.3 nella regione dell' HLA (human leukocyte antigen) di classe III del complesso maggiore di istocompatibilità umano. Nella cirrosi e nel CE si riscontrano alti livelli di TNF- α . Si pensa anche che l'incremento di TNF- α nella malattia epatica avanzata sia conseguenza della fibrosi cronica , la quale è associata all'attivazione del sistema macrofagico definito anche "endotoxin-dependent macrophage stimulation" e con un decremento della clearance delle citochine (Tilg H. et al.). Diversi polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) sono stati identificati nella regione promoter del gene che codifica per il TNF- α i quali potrebbero essere i responsabili dei diversi livelli di citochina riscontrati in circolo in diversi individui. Di particolare interesse è lo SNP in posizione -308 nella regione promoter del gene, dove si ha la sostituzione di una guanina con una adenina , l'allele G induce un variabile incremento della trascrizione del gene (Wilson AG et al). Il TNF- α oltre ad avere un importante ruolo nella risposta immune è anche un indiretto mediatore dell'angiogenesi in quanto induce il rilascio di VEGF (. Fajardo LF,et al). TNF- α può indurre l'espressione di molecole di adesione come VCAM-1 e E-selectin, sulla superficie di cellule endoteliali . E' stato dimostrato recentemente che le forme solubili delle molecole VCAM-1 (sVCAM-1) e E-selectin hanno funzione di mediatori dell'angiogenesi.

Cyclooxygenase-2 (COX2)

Le cicloossigenasi (COX) sono enzimi chiave nel mediare la conversione dell'acido arachidonico libero in prostaglandine H2 , il precursore di molecole come prostaglandine ,

prostaciline e trombossani . Questi mediatori attivi sono importanti regolatori di varie funzioni biologiche come la risposta infiammatoria , la proliferazione cellulare e l'angiogenesi , tutte funzioni rilevanti per lo sviluppo e la progressione tumorale. Molto importante la forma isoenzimatica COX-2 coinvolta nella cancerogenesi di varie forme tumorali compreso il CE . Recenti studi , suggeriscono che SNPs presenti nel promoter del gene per la COX2 potrebbe alterare la funzione enzimatica attraverso una differente regolazione dell'espressione di COX2 E' stato dimostrato che la sostituzione di una Guanina (G) con una Adenina (A) in posizione -1195 della regione promoter del gene COX2 crea un sito di legame per un fattore di trascrizione ciò aumenta l'attività trascrizionale del gene (Zhang X et al). Il genotipo -1195/AA è associate ad alti livelli di espressione di Cox2

Laboratorio

INTRODUZIONE

L'esistenza di un'associazione tra SNP (single nucleotide polymorphism) e suscettibilità allo sviluppo di svariate malattie (autoimmuni, infiammatorie croniche, neoplastiche), è stata dimostrata da numerosi studi. Queste variazioni alleliche posso ricadere all'interno di regioni regolatrici e/o codificanti di geni citochinici, influenzandone l'attività trascrizionale ed i livelli proteici. Questo potrebbe spiegare le diverse risposte individuali agli stimoli infiammatori e di conseguenza anche i diversi livelli di danno tissutale derivati da una attività flogistica più prolungata. E' ben noto che citochine e linfociti T citotossici siano tra i principali meccanismi di difesa dell'ospite contro l'infezione cronica da virus epatotropi (HCV, HBV); la risposta infiammatoria che viene innescata dall'infezione cronica, induce danno ai tessuti epatici e a loro volta gli epatociti danneggiati mantengono lo stato infiammatorio grazie all'attivazione delle cellule di Kupffer. Queste cellule macrofagiche rilasciano fattori favorenti lo sviluppo di fibrosi epatica che può condurre al successivo sviluppo di cirrosi, evento questo che si

caratterizza per la riattivazione di meccanismi di rigenerazione cellulare che a loro volta espongono l'epatocita ad un' aumentata probabilità di comparsa di mutazioni genetiche che, in definitiva, contribuiscono allo sviluppo del CE. Sicuramente il mantenimento dello stato infiammatorio cronico è legato ad una alterazione dell'equilibrio citochinico verso il tipo pro-infiammatorio, dovuto probabilmente ad uno sbilanciamento nella produzione di citochine Th1 e Th2, a sua volta conseguenza della presenza di diversi SNPs. Infatti è dimostrato che nei soggetti con CE si registrano livelli elevati di IL-6 e TNF-alfa e questo viene indicato come indice di prognosi sfavorevole (Giannitrapani L et al.). Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare le frequenze dei polimorfismi genici delle citochine VEGF-a , IL-6 e TNF-alfa e COX-2 in una coorte di soggetti con CE e di paragonarle sia con una coorte di soggetti con cirrosi epatica, che con una coorte di soggetti sani, raggruppati per sesso, età e provenienza geografica, con lo scopo di verificare una eventuale associazione tra le varianti alleliche considerate ed il rischio di sviluppo del tumore.

PAZIENTI E METODI

Il DNA proveniente da 124 soggetti sani, 112 soggetti con epatocarcinoma e 90 con cirrosi tutti di origine Siciliana è stato estratto da sangue intero reso incoagulabile con EDTA3K, usato per la valutazione degli SNPs , mediante metodica RFLP (*Restriction fragment length polymorphisms*).

Valutazione dei polimorfismi genici

Per le reazioni di PCR è stata preparata una Mix contenente: 10 ng di DNA template, primer sense e anti-sense , alla concentrazione di 0.5 μ M, Buffer PCR 1x, MgCl₂ 1.5 mM, mix dNTP 0.2 mM, Taq Polimerasi 0.05 U/ μ l (Invitrogen native), per un volume finale di 20 μ L. Le condizioni di amplificazione erano: una iniziale denaturazione a 95°C per 5' poi 30 cicli con 94°C per 35", 58°C per 35", 72°C per 35" ed una elongation finale a 72°C per 1'. I prodotti di amplificazione sono stati valutati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 3%

contenente etidio bromuro (0,5 µg/ml), in tampone TBE 1x (Tris base, Acido Borico, EDTA 0,5 M ph 8) per 20' a 80V, poi visualizzati su di un transilluminatore, e fotografati con un sistema Canon Imaging.

Valutazione del polimorfismo genico in posizione -174 del gene dell'IL 6

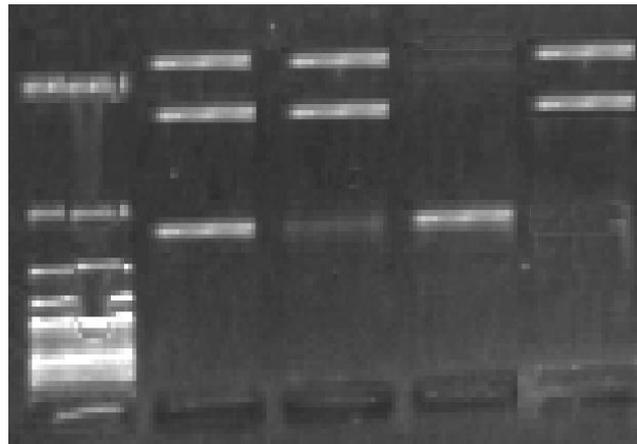
In tabella vi sono i primers utilizzati per amplificare una porzione del promotore del gene del IL 6 contenente il sito polimorfico presente in posizione -174 dal sito di inizio della trascrizione.

<i>IL6 -174 RFLP Reverse</i>	5'CCTATATTTATTGGGGGTTGAGT-3'
IL6 -174 RFLP Forward	5'TAGCCTGTAAATCTGGTCT 3'

Reazione di restrizione enzimatica:

Per la restrizione enzimatica dell'amplificato è stata preparata una miscela che comprende i seguenti reagenti: DNA amplificato , Buffer 1X, Nco I 0,1 U/µl per un volume totale di 10 µl. Su ogni campione viene dispensata una goccia di olio minerale per evitare l'evaporazione durante l'incubazione a 37°C overnight. I ristretti vengono analizzati per elettroforesi su gel d'agarosio al 3%. Come prodotto della restrizione si ottiene una banda corrispondente al frammento di 231 bp corrispondente all'allele -174 C , bande di 125bp e 106bp corrisponde all'allele -174G.

M CG CC GG



Elettroforesi su gel d'agarosio al 3% del prodotto di PRC-RFLP utilizzando come enzima NcoI marker utilizzato è pUC 18 Msp 1 DIGEST, SIGMA

Valutazione del polimorfismo genico in posizione -308 del gene dell'TNF alfa.

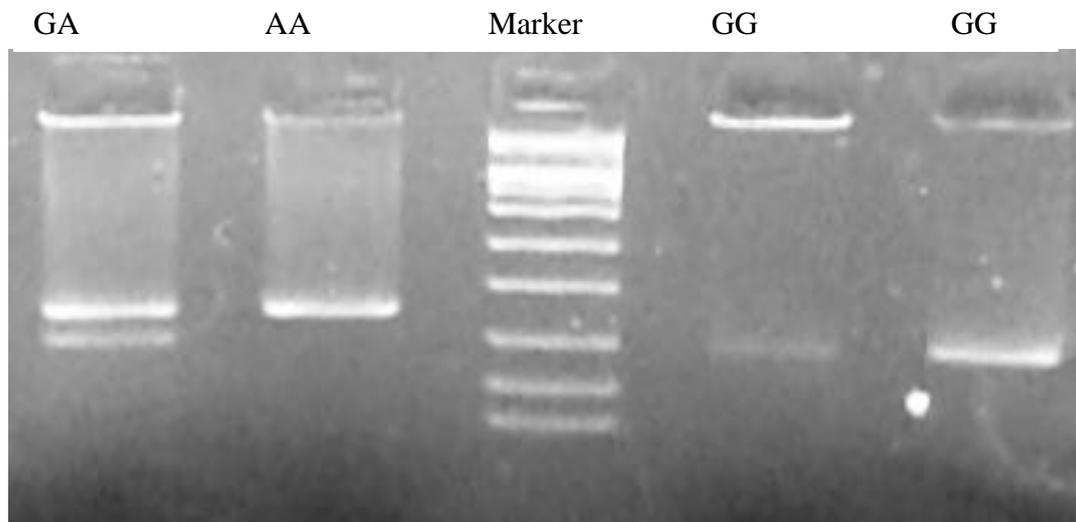
In tabella vi sono i primers utilizzati per amplificare una porzione del promotore del gene del TNF α contenente il sito polimorfico presente in posizione -308 dal sito di inizio della trascrizione.

TNF -308 RFLP Reverse	5'-GGCGGGGATTTGGAAAGTT-3'
TNF -308 RFLP Forward	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT3'

Reazione di restrizione enzimatica:

Per la restrizione enzimatica dell'amplificato è stata preparata una miscela che comprende i seguenti reagenti: DNA amplificato, Buffer 1X, Nco I 0,1 U/ μ l per un volume totale di 10 μ l. Su ogni campione viene dispensata una goccia di olio minerale per evitare l'evaporazione durante l'incubazione a 37°C overnight. I ristretti vengono analizzati per elettroforesi su gel d'agarosio al 3%. Come prodotto della restrizione si ottiene una banda corrispondente al frammento di 146bp, una di 13bp corrispondente all'allele 308G ed una banda di 159bp

corrisponde all'allele 308A. Se il soggetto è eterozigote avremo le bande di 159bp(308A), 146bp(308G) e 13bp, se è omozigote otterremo soltanto una banda.



Elettroforesi su gel d'agarosio al 3% del prodotto di PRC-RFLP utilizzando come enzima NcoI marker utilizzato è pUC 18 Msp 1 DIGEST, SIGMA

Valutazione del polimorfismo genico in posizione – 1195 G/A del gene della COX-2.

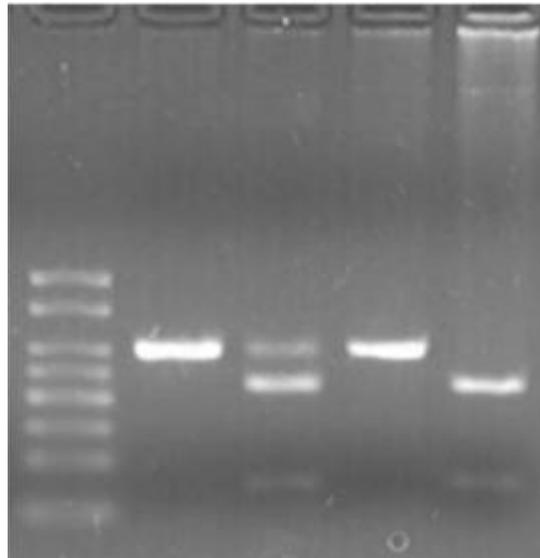
In tabella sono riportati i primers utilizzati per amplificare un segmento contenente lo SNP - 1195 del gene della COX-2,

COX-2 -1195 RFLP Reverse	5-TATATCACCTCACATCT-3'
COX-2 -1195 RFLP Forward	5'-TGGTTACTAGCCCTTCATAG 3'

Reazione di restrizione enzimatica:

Per la restrizione enzimatica dell'amplificato è stata preparata una miscela che comprende i seguenti reagenti: DNA amplificato, Buffer 1X, PUV II 0,1 U/µl per un volume totale di 10 µl. Su ogni campione viene dispensata una goccia di olio minerale per evitare l'evaporazione durante l'incubazione a 37°C overnight. I ristretti vengono analizzati per elettroforesi su gel d'agarosio al 3%. Come prodotto della restrizione si ottiene: tre bande di 304,230 274 bp rispettivamente se il soggetto è eterozigote , una banda di 304 se è omozigote A, una di 230 e una di 74 bp se è omozigote GG

Marker AA GA AA GG



Elettroforesi su gel d'agarosio al 3% del prodotto di PRC-RFLP utilizzando come enzima Pvu
. Il marker usato è pUC 18 Msp 1 DIGEST, SIGMA

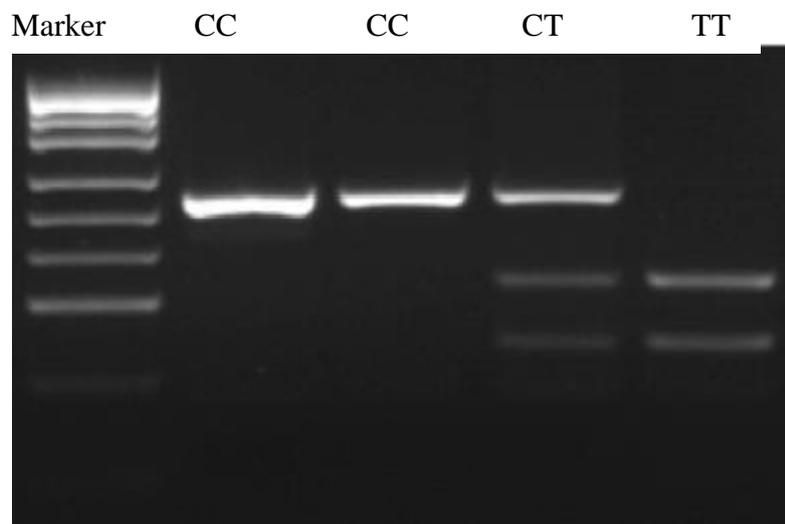
Valutazione del *polimorfismo genico in posizione + 936 C/T del gene dell VEGF-A* .

In tabella sono riportati i primers utilizzati per amplificare un segmento contenente lo SNP +
936 del gene del VEGF-A,

VEGF-A + 936 RFLP Reverse	5-AACCAAGAGGAGGAGACTCTGCGCA-3'
VEGF-A + 936 RFLP Forward	5- TAAATGTATGTATGTGGGTGGGTGTGT- 3'

Reazione di restrizione enzimatica:

Per la restrizione enzimatica dell'amplificato è stata preparata una miscela che comprende i seguenti reagenti: DNA amplificato, Buffer 1X, *Nla III* 0,1 U/ μ l per un volume totale di 10 μ l. Su ogni campione viene dispensata una goccia di olio minerale per evitare l'evaporazione durante l'incubazione a 37°C overnight. I ristretti vengono analizzati per elettroforesi su gel d'agarosio al 3%. Come prodotto della restrizione si ottiene: tre bande di 208, 122 e 86 bp bp rispettivamente se il soggetto è eterozigote CT , una banda di 208 se è omozigote C, una di 122 e una di 86 bp se è omozigote TT



Elettroforesi su gel d'agarosio al 3% del prodotto di PRC-RFLP utilizzando come enzima *Nla III* . Il marker utilizzato è pUC 18 Msp 1 DIGEST, SIGMA

Analisi Statistica:

La frequenza genotipica è stata valutata mediante la conta genica e analizzando la differente distribuzione tra pazienti e controlli sani e tra cirrotici e soggetti con CE usando l'esatto test del χ^2 con la correzione di Yates. Odd ratio (OR) con un intervallo di confidenza del 95% è stato ottenuto mediante il metodo dell'approssimazione di Woolf's. La p di values è stata moltiplicata per il numero dei possibili genotipi ottenuti con ogni singolo SNP (correzione di Bonferroni) . Una $p < 0.005$ è considerato come limite della significatività . Gli SNPs valutati nel gruppo di controllo erano in equilibrio Hardy – Weinberg .

Risultati

I dati da noi ottenuti hanno mostrato una differenza statisticamente significatività per lo SNP VEGF-A +936 C/T tra HCC e LC (Tabella 1) , come è evidente i soggetti con HCC hanno una frequenza maggiore del genotipo C/C e un maggiore frequenza dell'allele C , associato con una più alta produzione di VEGFA. Per gli SNPs del TNF α e COX2 non è stata trovata una differenza statisticamente significativa dalla combinazione dei dati ottenuti dai gruppi considerati (dati non mostrati).

Tabella 1. Percentuale di soggetti omozigoti e eterozigoti per lo SNP +936 C/T VEGF-A valutato in 96 pazienti affetti da CE , 76 cirrotici e in 162 soggetti sani

VEGFA +936	Soggetti			Controlli vs Cirrotici		Controlli vs CE		CE vs cirrotici	
	Controlli	CE	Cirrotici	OR (CI95%)	Pc	OR (CI 95%)	Pc	OR (CI 95%)	Pc
+936 C/C	120 (74)	81(84)	51 (61)	0,71 (.39 to 1.29)	ns	1.89 (.98 to 3.63)	ns	2.65 (1.28 to 5.49)	.039
+936 C/T	38 (23)	14(16)	23 (34)	1.42 (0.77 to 2.61)	ns	.56 (.28 to 1.09)	ns	.386 (.182 to .817)	ns
+936 T/T	4 (3)	1 (1)	2 (5)	1.07 (.19 to 5.96)	ns	.42 (.046 to 3.78)	ns	.389 (.035 to 4.38)	ns
ALLELE									
C	278 (86)	176 (92)	125(78)	1.3 (0.78 to 2.2)	ns	.549 (.30 to 1)	ns	2.38 (1.23 to 4.6)	.041
T	46 (14)	16 (8)	27(22)						

Discussione

L'epatocancerogenesi è un processo multistep che prevede l'infiammazione cronica dell'epatocita la sua distruzione, rigenerazione ,fibrosi e cirrosi, e una non regolata proliferazione . In questo processo si ha il rilascio di citochine e fattori angiogenetici .La flogosi e l'angiogenesi sono due processi importanti per lo sviluppo e la progressione del tumore nonché per la sua diffusione metastatica . Le COX2 ,il TNF- α e il VEGFA sono importanti mediatori sia di flogosi che di angiogenesi . Le molecole considerate si influenzano reciprocamente . Quindi , abbiamo voluto valutare SNPs capaci di influenzarne la produzione in modo da cercare una eventuale associazione tra SNPs e aumento o meno della suscettibilità allo sviluppo del CE . Con lo scopo di identificarne una loro probabile funzione come biomarkers o come target terapeutici . Già oggi sono in commercio farmaci che hanno come target il recettore del VEGF, quindi la farmaco genomica si stà muovendo in tal senso. I nostri dati suggeriscono che i carriers +936 C/C VEGFA associato con un'alta produzione di citochina siano più suscettibili allo sviluppo dell'CE. Questo risultato è in accordo con dati ottenuti da altri autori , i quali hanno dosato il VEGF-A in soggetti con cirrosi e in soggetti con CE trovando una maggiore concentrazione di fattore angiogenetico in quest'ultimi. Bisogna anche considerare l'influenza dei fattori ambientali, infatti altri autori non hanno trovato una relazione tra SNP e livelli di VEGFA ma hanno trovato un'associazione tra altri SNP del VEGFA e il CE ed infine in uno studio Caso-Controllo è necessario aumentare la casistica dei campioni utilizzati.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham L. J., French M. A. H. and Dawkins R. L. Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumor necrosis factor alpha. 1993 Clin. Immun. 92, 14-18
- Bolondi L, Gaiani S, Celli N et al. Characterization of small nodules in cirrhosis by assessment of vascularity: the problem of hypovascular hepatocellular carcinoma. 2005 J Hepatol 42 :27-34.
- Beutler B, Cerami A. Cachectin . Tumor necrosis factor: a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. Endocrine Reviews. 1988 9:57–66.
- Bidwell J. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 1 2001 Genes Immunity; 2: 61-70.
- Bruix J, Sherman M, Llovet JM et al. EASL Panel of Experts on CE. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. 2001 Hepatol. 35:421-30.
- Bruix J, Boix L, Sala M et al .Focus on Hepatocellular Carcinoma. 2004 Cancer Cell
- Bruix J, Sherman M, Llovet J et al. Clinic Management of Hepatocellular Carcinoma. Conclusion of the Barcellona – 2000 EASL Conference. 200 J. Hepatol. 35 1.
- Buendia MA. Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects. 2002 Med Pediatr Oncol. 39:530-5
- Carmeliet P., Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. 2000. Nature 407, 249-257.
- Cillo U, Vitale A, Bassanello M et al. Liver transplantation for the treatment of the moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma. 2004 Ann Surg 240: 924–925.

- Crivello A, Giacalone A et al. Regulatory cytokine gene polymorphisms and risk of colorectal carcinoma. 2006 *Ann. N Y Acad. Sci.*; 1089: 98-103.
- Colombo M. Hepatocellular Carcinoma et Risk of factor. 1992 *J. Hepatology*; 15: 225-36.
- Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. 2002 *Hepatology*;35:1010–21
- Edamoto, Y., Hara, A., Biernat, W et al.,. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. 2003 *Int. J. Cancer* 106:334–341.
- Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J et al. Dual role of tumor necrosis factor- α in angiogenesis. 1992 *Am J Pathol*; 140: 539-544
- Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL et al., Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. 2002 *Oncogene*. 21:2593-604
- Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, et al. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. 1998 *Urology*;5:161–7.
- Forner A, Villana R, Ayuso C et al Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. 2008 *Hepatology*. 47:97-104
- Garcea A.R. Role of Inflammation in Pancreatic Carcinogenesis and the Implications for Future Therapy. 2005 *Pancreatology* 5:514–529
- Giannitrapani L, Cervello M, Soresi M, et al. Circulating IL-6 and sIL-6R in patients with hepatocellular carcinoma. 2002 *Ann N Y Acad Sci*. 963:46-52
- Haieer AH and Huchinson. Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease. 2001 *Hum Immunol* 62: 1191-1199;

- Krippel P, Langsenlehner U, Renner W et al.. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. 2003 Int J Cancer; 106:468-471
- Jean-Daniel Chiche et al.Cytokine Polymorphisms and Susceptibility to Severe Infectious Diseases . 2001Sepsis 4 :209-215
- Jen-Eing Jeng, Jung-Fa Tsai, Lee-Yea chuang et al. Tumor Necrosis Factor – α 308.2 Polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma. 2007 Neoplasia, 9 :987-992
- Jinno K, Tanimizu M, Hyodo I, et al. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. 1998 J Gastroenterol ;33:376-382
- Latteri M. A, Craxì A., Sciumè C, et al. Chirurgia Oncologica e Principi di Oncologia Clinica. Università degli Studi di Palermo.
- Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. 2001 Gastroenterology. 120:1763-73
- Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, et al. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. 2000 J Cell Sci.113: 1661-70
- Lin-Hung Wei, M.D., Min-Liang Kuo, et al Interleukin-6 in Cervical Cancer: The Relationship with Vascular Endothelial Growth Factor. 2001 Gynecologic Oncology **82** :49–56
- LIU L.F., ZHANG J.L., CHEN Q. et al. Cyclooxygenase-2 gene -1195G/A genotype is associated with the risk of HBV-induced CE: A case-control study in Han Chinese people . 2010 Front Med China 4:90–95

- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. 2008 N Engl J Med. 359: 378-90
- Llovet JM, Fuster J, Bruix. Prognosis of hepatocellular carcinoma: The BCLC staging classification. 1999 Sem Liver Dis; 19: 329-38
- Macarthur, Mairi, Georgina L, et al. Gastrointestinal Liver: Inflammation and cancer . 2004 Am J Physiol 286 :515-520,.
- Marrero JA, Hussain HK, Nghiem HV, et al. Improving the prediction of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with an arterially- enhancing liver mass. Liver Transpl 2005 11:281-289
- Morsi MI, Hussein AE, Mostafa M et al. Evaluation of tumor necrosis factor – alpha, soluble p-selectin, gamma glutamyl transferase, glutathione S-transferase-pi and alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma before and during chemotherapy. Br 2006 J Biomed Sci 63: 74-78.
- Oyama T, Ran S, Ishida T, et al. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. J Immunol 1998;160:1224–32.
- Ognjanovic S, Yuan Jian-Min, Chaptman Ann K, et al. Genetic polymorphism in the cytokine genes and risk of hepatocellular carcinoma in low risk non-Asian of USA. 2009 Carcinogenesis 30 : 758-762.
- Paradis V Bièche I, Dargère D, et al., Molecular profiling of hepatocellular carcinomas (CE) using a large-scale real-time RT-PCR approach: determination of a molecular diagnostic index. 2003 Am J Pathol. 163 :733-41
- Prieto J. Inflammation, CE and sex: IL-6 in the centre of the triangle .Journal of 2008 Hepatology , , 48 : 380 – 381

- PUGH C.W., RATCLIFFE P.J . Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. 2003 Nat Med 9, 677-684
- Semela D DJ. Vascular endothelial growth factor signaling. In: Dufour JF CP, editor. Signaling pathways in liver diseases. 2005 Heidelberg: SpringerVerlag Berlin; ;91-104.
- Sheng-Yow Ho, Ying-Jan Wang, Hen-Li Chen, et al. Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the -308 tumor necrosis factor-*a* promoter gene. 2004 Cancer Causes and Control 15: 657–663,
- Sherman M: Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. 2010 Oncology;78 :7-10
- Sherman M . Alphafetoprotein: an obituary 2001 J Hepatol.; 34: 603-5
- Smith MW, Yue ZN, Geiss GK, et al. Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinom. 2003 Cancer Res. 2003 Feb 15;63(4):859-64.
- Stiewe T, Tuve S, Peter M, et al. Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. 2004 Clin Cancer Res. Jan 15;10(2):626-33.
- Schwartzm. , Roayie S .,Konstadoulakis M . Strategies for the management of hepatocellular carcinoma. 2007 Nat Clin Pract Oncol 4, 424-32
- Tilg H, Wilmar A, Vogel W, et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. 1992 Gastroenterology.;103(1):264–274
- Trevisani F, Valentina S, Gramenzi AG et al. Surveillance for early diagnosis of hepatocellular carcinoma: is it effective in intermediate/advanced cirrosi Am J 2007 Gastroenterol; 102: 2448-57
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L,et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. 2000 Cancer Res;60(2):203–12
- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. . Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. 1996 Circulation;93(8):1493–5..

- Wang YY,Lo GH, Lai KH, Cheng JS,Lin CK et al. . Increased serum concentration of tumor necrosis factor alpha are associated with disease progression and malnutrition in hepatocellular carcinoma. 2003 J Chin Med Assoc 66,593-598
- Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ et al. . Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. 2000 Cytokine;12(8):1232–5.-].
- Willscott E. Naugler, Toshiharu Sakurai, et al. Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production. 2007 Science, vol 317 no.5834, pp.121-124.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. 1997 Proc Natl Acad Sci USA;94:3195–9
- Wulfschlegel, J.D., Liotta, L.A., Petricoin, E.F.,. Proteomic applications for the early detection of cancer. 2003 Nat. Rev. Cancer. 3, 267–275.
- Wurmbach E, Chen Y, Khitrov G et al. Genome-Wide Molecular Profiles of HCV-Induced Dysplasia and Hepatocellular Carcinoma. 2007 HEPATOLOGY; 45: 938-947.
- Zhang X, Miao X, Tan W, et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. 2005 Gastroenterology, 129: 565–576