

Hugo Mendieta Zerón

Expresión de citoqueratinas y presencia de células ovales. Implicaciones para el estudio del desarrollo del carcinoma hepático

Ciencia Ergo Sum, vol. 7, núm. 3, noviembre, 2000

Universidad Autónoma del Estado de México

México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10401905>



Ciencia Ergo Sum,

ISSN (Versión impresa): 1405-0269

ciencia.ergosum@yahoo.com.mx

Universidad Autónoma del Estado de México

México

Expresión de citoqueratinas y presencia de células ovas. Implicaciones para el estudio del desarrollo del carcinoma hepático

HUGO MENDIETA ZERÓN*

Recepción: 14 de diciembre de 1999

Aceptación: 17 de mayo del 2000

Cytokeratin Expression and the Presence of Oval Cells. Implications for the Study of the Development of Hepatic Carcinoma

Abstract. *Hepatic carcinoma is one of the most frequently occurring tumors in the Western World with a high mortality rate because it is usually not detected until it is in the advanced clinical stages. The expression of cytokeratins (CK) in the liver, and the presence of oval cells, represents a new investigative field that is focused on the understanding of the development of hepatic neoplasias. The intermediate filaments of cytokeratins are the most numerous structural proteins present in the hepatocytes and in the bile ducts. The study of the oval cells and the expression of cytokeratins offers a new line of study in the development and evolution of the hepatocellular carcinoma.*

Palabras clave: *citoqueratinas, células ovas, carcinoma hepático.*

Introducción

El hígado posee una gran capacidad regenerativa al sufrir pérdida del parénquima o tras someterse a variados estímulos hiperplásicos. Cuando esta regeneración es defectuosa, las células de los conductos biliares pueden migrar y diferenciarse en hepatocitos; estas células biliares son llamadas células ovas, y su capacidad de diferenciación las coloca como un tipo de células madre pluripotenciales.

La expresión de citoqueratinas (CK) en el hígado representa un nuevo campo de investigación, enfocado al entendimiento del desarrollo de neoplasias hepáticas. La información que se ha obtenido tal vez modifique conceptos relacionados con la modulación y diferenciación celular en el acino hepático.

Debido a que el microambiente tisular influye en la distribución espacial de los filamentos intermedios de las células (Traub y Schoeman, 1994), la presencia de lesiones hepáticas condicionaría la expresión de marcadores fenotípicos distintos en los hepatocitos.

El citoesqueleto se compone de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (Yoshioka *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1996). Los filamentos intermedios de citoqueratina son las proteínas estructurales más numerosas presentes en los hepatocitos y en los conductos biliares (Franke *et al.*, 1981).

Precisamente, el estudio de las citoqueratinas ha sido particularmente útil para identificar fenotipos celulares, que no son visualizados por los estudios de rutina con tinción de hematoxilina-eosina. Moll, Franke y Schiller identificaron y catalogaron diecinueve diferentes polipéptidos de citoqueratinas, con pesos moleculares entre 40 y 70 kD (Moll *et al.*, 1982).

I. Carcinoma hepático

El carcinoma hepático primitivo es uno de los tumores más frecuentes en el mundo, y es hasta cuatro veces más fre-

*Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México.
Tel.: (7) 217 66 05. Correo electrónico: mezh_74@yahoo.com

cuenta en varones que en mujeres (Isselbacher *et al.*, 1994); suele asentarse sobre hígados cirróticos principalmente, lo que en México significa un alto riesgo debido a que la cirrosis prevalece en parte importante de la población. La máxima incidencia en los países occidentales se da en la quinta y sexta décadas de la vida, pero de 10 a 20 años antes en Asia y África. La principal razón de la elevada incidencia en Asia y África es la alta prevalencia de las infecciones por los virus de hepatitis B y C.

En sus fases iniciales, el carcinoma hepático a veces pasa inadvertido porque suele aparecer en enfermos con cirrosis subyacente y, por lo tanto, sus síntomas pueden ser interpretados como los propios de este padecimiento. Los rasgos de comienzo más habituales son el dolor abdominal y la detección de una masa en el cuadrante superior derecho; posteriormente se presentan ascitis hemorrágica e ictericia.

El diagnóstico usualmente se da por medio de ecografía, tomografía, resonancia, arteriografía hepática y gammagrafía radioisotópica con tecnecio-99m. Aproximadamente entre el 70 y el 80% de los enfermos presentan altas concentraciones de alfa-fetoproteína. La biopsia hepática percutánea puede ser diagnóstica si se encuentra en una zona localizada por ecografía o tomografía.

La evolución de la enfermedad es rápida; sin tratamiento, la mayoría de los enfermos fallecen al cabo de 3 a 6 meses después de realizado el diagnóstico. En muy pocos casos el tratamiento puede prolongar la vida, pero aún así la supervivencia a los 5 años es muy baja.

La resección quirúrgica ofrece la única posibilidad de curación. Sin embargo, pocos pacientes tienen tumores resecables en el momento del diagnóstico debido a la cirrosis subyacente, a la afectación de los dos lóbulos hepáticos o a la presencia de metástasis a distancia.

El trasplante hepático ha sido limitado por la recidiva del tumor o aparición de metástasis, pero se han experimentado otras alternativas de tratamiento como: quimioembolización, necrosis con alcohol, crionecrosis, inmunoterapia con anticuerpos monoclonales ligados a agentes citotóxicos, y tratamiento genético con vectores retrovirales que contienen genes que expresan agentes citotóxicos.

II. Expresión de citoqueratinas

En su etapa inicial de desarrollo, el hígado embrionario está compuesto de hepatoblastos que expresan las citoqueratinas (CK) 8, 18 y 19 (Van Eyken *et al.*, 1988; Stosiek *et al.*, 1990). La distribución de estas CK varía dependiendo de la madurez y diferenciación del hígado.

Las células del parénquima hepático normal del adulto expresan solamente las CK 8 y 18, mientras que las células de los conductos biliares intrahepáticos expresan además las CK 7 y 19.

La CK 8 es una proteína de 52.5 kD que se manifiesta en epitelios simples, como el biliar, y que podría intervenir en la actividad génica, diferenciación y proliferación de los hepatocitos (Stosiek *et al.*, 1990; Denk *et al.*, 1982).

La expresión de CK 8 podría ser considerada un marcador de nuevas clonas celulares en hepatocitos, y también podría ser expresada durante la proliferación celular como filamento intermedio inestable (Reid *et al.*, 1992; Van Eyken *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1988; Lai *et al.*, 1989).

La expresión de CK 8 en neoplasias hepáticas es similar a la de C-8 en los hepatocitos de la octava a la décimosegunda semana de desarrollo embriológico humano, lo que podría sugerir una desdiferenciación de los hepatocitos o predominio de líneas celulares indiferenciadas.

Las células ovales expresan las CK 7, 8, 18 y 19 en altos niveles, y la CK 14 en poca cantidad. Como se aprecia, se encuentran aquéllas que se localizan en los hepatoblastos durante el desarrollo embrionario y las detectadas en los conductos biliares intrahepáticos.

III. Citoqueratinas y hepatocarcinogénesis

Está bien documentado que en el daño hepático inducido por una variedad de agentes (incluyendo hepatocarcinógenos, alcohol y virus) proliferan células ovales (Germain *et al.*, 1988; Reuber, 1965; Braun *et al.*, 1989; Smith y Yeoh, 1996). En experimentos de hepatocarcinogénesis, estas células al inicio se localizan periportalmente, y después se diseminan en el lóbulo hepático, lo que da a conocer su capacidad de originar neoplasias (Braun *et al.*, 1989).

Algunos estudios de hígado humano realizados mediante inmunohistoquímica de citoqueratina han subrayado la atención de la ocurrencia de células ovales ricas en CK, que aparentemente están relacionadas de alguna manera con la proliferación ductular (Desmet, 1987). Éstas pueden clasificarse en tres tipos (De Vos y Desmet, 1992):

Tipo 1: células de forma y núcleo ovales, complejos de unión entre células adyacentes, variación de organelos citoplasmáticos y agrupaciones de tonofilamentos.

Tipo 2: células con muestras de diferenciación celular de conducto biliar, incluyendo interdigitaciones laterales, microvellosidades apicales, vacuolas pinocíticas basales y formación de una membrana basal.

Tipo 3: datos de diferenciación hepatocelular, como un núcleo más prominente, formación de un hemicanalículo y rosetas de glucógeno.

Se considera que las células ovales pueden diferenciarse en hepatocitos del parénquima y en células del conducto biliar.

En un estudio de hepatocarcinoma asociado al virus de hepatitis B (VHB), las células ovales fueron positivas para las CK 7, 8, 18 y 19 (Hsia *et al.*, 1992).

Como las células neoplásicas usualmente retienen las CK de sus células de origen, se piensa que éstas pueden servir para diferenciar tumores epiteliales y para estudiar su histogénesis (Quinlan *et al.*, 1985; Osborn *et al.*, 1984; Osborn, 1983). Las posibilidades de expresar CK aberrantes parecen aumentar de manera paralela a la desdiferenciación.

Van Eyken *et al.*, (1988) han reportado que el 50% de carcinomas hepatocelulares contiene células tumorales positivas para C-7 y/o 19, y que se pueden expresar CK usualmente ausentes.

Se han hecho múltiples trabajos sobre la expresión de CK en el parénquima hepático bajo condiciones patológicas, en especial por el alcoholismo (Savolainen *et al.*, 1994; Ray, 1987; Yoshioka *et al.*, 1989) y virus de hepatitis B (Braun *et al.*, 1989). Sin embargo, la investigación en relación con el virus de hepatitis C (VHC) resulta escasa, pese a que ya es la principal causa de hepatitis viral con evolución a cirrosis y cáncer (Gaiani *et al.*, 1997).

Los estudios en modelos animales y en pacientes alcohólicos han demostrado que la alteración de los filamentos de CK en el hígado es la clave en la formación de los cuerpos de Mallory (Van Eyken y Desmet, 1993).

La fuerte correlación entre colestasis y proliferación ductular marginal, particularmente en cirrosis, sugiere que la proliferación ductular es universal en las enfermedades crónicas del hígado, particularmente cuando la colestasis crónica está presente (Ray *et al.*, 1993).

Las tinciones inmunohistoquímicas para las CK 7 y 20 son útiles para el diagnóstico diferencial de colangiocarcinomas intrahepáticos de carcinomas colorectales metastásicos (Sasaki *et al.*, 1999).

IV. Implicación de las células ovales

Los hepatoblastomas son los máximos productores de alfa-fetoproteína entre los cánceres hepáticos. La razón de esta producción en los carcinomas hepatocelulares no está clara, y se ha planteado la implicación de las células ovales, pues está demostrado que a mayor cantidad de éstas, son mayores los niveles de la enzima (Abelev y Eraiser, 1999). Las células

ovales, además, expresan otros marcadores como: vimentina, OV6, OC2, OC3, GGT, Thy-1, SCF/c-kit y albúmina (Alison y Sarraf, 1998).

El AMP cíclico (AMPC) es un importante regulador del crecimiento hepático y de la diferenciación; su principal receptor intracelular es una proteína kinasa dependiente de AMPC, que consiste en dos subunidades reguladoras (RI y RII) y dos catalíticas (C). El índice RI/RII generalmente decrece durante el desarrollo del órgano, y se incrementa durante la carcinogénesis. Alteraciones en este índice han sido implicadas como un factor importante en la carcinogénesis clínica y experimental. Los conductos biliares y las células ovales contienen unos índices más altos de RI/RII que los hepatocitos y lesiones preneoplásicas; por lo tanto, una relación alterada de RI/RII contribuiría con la diferenciación de las células madres en el hepatocito (Skarpen *et al.*, 1998).

La habilidad del hígado para regenerarse es ampliamente conocida. No obstante, cuando la regeneración del hepatocito es impedida, los pequeños conductos biliares proliferan e invaden el parénquima adyacente al hepatocito. En los humanos y en animales de experimentación, las células que proliferan se refieren como células ovales. Éstas son de gran interés biológico porque representan una población celular, blanco de los carcinógenos hepáticos; además, quizá sean útiles para la terapia génica *ex vivo* para la corrección de errores innatos del metabolismo (Alison *et al.*, 1997).

Uno de los modelos más ampliamente usados de la activación de células ovales es el régimen modificado de Solt-Farber. En este modelo, las ratas son sometidas a una hepatectomía parcial de dos tercios del hígado y son alimentadas con acetil-aminofluoreno (AAF). El AAF es metabolizado a su derivado citotóxico/mitoinhibidor N-hidroxi por medio de las enzimas metabólicas de fase I. Las células biliares y las células ovales expresan muy pocas cantidades de enzimas de fase I y altos niveles de fase II comparadas con los hepatocitos, lo que favorece la destoxificación sobre la activación de hepatocarcinógenos. Por lo tanto, en presencia de AAF, las células ovales proliferan en vez de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial. Al dañar el sistema biliar con metileno de dianilina se previene la proliferación de células ovales en este modelo, lo cual refuerza el punto de vista de que estas células son derivadas de los conductos biliares.

El mecanismo de la generación de nuevos hepatocitos y células de los conductos biliares en el hígado ha sido controversial. Las células ovales se encuentran en la región periportal bajo ciertas circunstancias y tal vez representen células madre pluripotenciales. Los marcadores genéticos pueden

ser usados para determinar la habilidad de una célula particular para replicar y migrar. Los estudios de estos marcadores sugieren que los hepatocitos o las células ovals evolucionan a carcinoma hepatocelular o colangiocarcinoma si un número suficiente de mutaciones genéticas se acumula. Las implicaciones de estos estudios pueden darse en la terapia génica hepática, el tratamiento de distintos estados de insuficiencia hepática y en cáncer hepático (Ponder, 1996).

Muchos xenobióticos, como el paracetamol y el tetracloruro de carbono, causan muerte de las células del parénquima e inducen una respuesta regenerativa de los hepatocitos sobrevivientes. La regeneración es comúnmente estudiada en el hígado de la rata, donde, por ejemplo, se ha encontrado que la resección hepática permite a los hepatocitos de los lóbulos remanentes salir de la fase G₀ y después de un periodo de 15 horas, entrar en la síntesis de DNA. Un segundo tipo de reacción de crecimiento ocurre en respuesta a una amplia variedad de xenobióticos no hepatotóxicos, pero que son inductores de la familia de enzimas de la citocromo 450; estos compuestos causan hipertrofia y/o hiperplasia aunque, al retirar dicho estímulo, se provoca una rápida reversión al tamaño hepático normal a través de la inducción de la apoptosis hepática (Alison y Sarraf, 1998).

Recientemente se ha demostrado en tumores hepáticos inducidos en ratas y en series limitadas de pacientes con carcinoma hepático la presencia de deleciones del gen Tg737, cuyo producto está relacionado en la proliferación de células ovals del hígado, en la diferenciación y en el control de la ploidía celular. Por lo tanto, se le ha propuesto como candidato de un nuevo gen supresor de tumores específico del hígado, pues la pérdida de su expresión está asociada con una falla de las células ovals para responder a las señales de diferenciación, aunque todavía existen puntos en contra de esta hipótesis (Isfort *et al.*, 1997; Bonura *et al.*, 1999).

Conclusiones

El estudio de las células ovals y la expresión de las citoqueratinas ofrece un nuevo camino para el estudio del desarrollo y evolución del carcinoma hepático, uno de los tumores más frecuentes en el mundo. La determinación del momento de aparición de las citoqueratinas es importante para definir el camino de desdiferenciación que siguen las células.

La mayoría de los estudios de la expresión de citoqueratinas en casos de carcinoma hepático se ha relacionado con una evolución de cirrosis hepática alcohólica, o bien, cirrosis por virus de hepatitis B. No se ha estudiado lo suficiente en relación con el virus de hepatitis C, lo cual

amerita mayor atención debido a que es la principal causa de cirrosis hepática viral en occidente, a raíz del mayor control de las transfusiones sanguíneas que ha disminuido el contagio del virus de hepatitis B.

Los estudios indican que las células ovals constituyen las células madre pluripotenciales del hígado, que pueden evolucionar a cáncer si se acumulan las mutaciones genéticas necesarias. Su presencia se correlaciona con niveles altos de alfa-fetoproteína; sin embargo, cuando se detectan estos niveles usualmente ya hay manifestaciones clínicas de un estadio avanzado, con pocas probabilidades de curación. Sería necesario diseñar un método de detección que indicara una proliferación significativa de células ovals, previo al desarrollo de una neoplasia avanzada.

En el caso de México, la cirrosis hepática alcohólica es un problema de salud que enmascara muchos casos de carcinoma hepático. Indudablemente, en nuestro medio el mejor camino es la prevención, sin embargo, no se puede dejar de lado un nuevo camino de investigación para el entendimiento del desarrollo de una neoplasia tan letal como el cáncer hepático. Este nuevo camino está constituido por el estudio de la expresión de las citoqueratinas y la presencia de células ovals.



BIBLIOGRAFÍA



- Abelev, G. y Eraiser, T. (1999). "Cellular Aspects of Alpha-Fetoprotein Reexpression in Tumors", en *Seminars in Cancer Biology*. 9 (2): 95-107. USA.
- Alison, M.; Golding, M. y Sarraf, C. (1997). "Liver Stem Cells: When the Going Gets Tough they get Going", en *International Journal of Experimental Pathology*. 78 (6): 365-381. USA.
- Alison, M. y Sarraf, C. (1998). "Hepatic Stem Cells", en *Journal of Hepatology*. 29 (4): 676-682. USA.
- Bonura, C.; Paterlini-Brechot, P. y Brechot, C. (1999). "Structure and Expression of Tg737, a Putative Tumor Suppressor Gene, in Human Hepatocellular Carcinomas", en *Hepatology*. 30 (3): 677-681. USA.
- Braun, L.; Mikumo, R. y Fausto, N. (1989). "Production of Hepatocellular Carcinoma by Oval Cells: Cell Cycle Expression of c-myc and p53 at Different Stages of Oval Cell Transformation", en *Cancer Res*. 49: 1554-1561. USA.
- De Vos, R. y Desmet, V. (1992). "Ultrastructural Characteristics of Novel Epithelial Cell Types Identified in Human Pathologic Liver Specimens with Chronic Ductular Reaction", en *Am J Pathol*. 140 (6): 1441-1450. USA.
- Denk, H.; Krepler, R.; Lackinger, E. *et al.* (1982). "Biochemical and Immunocytochemical Analysis of the Intermediate Filament

- Cytoskeleton in Human Hepatocellular Carcinomas and in Hepatic Neoplastic Nodules of Mice", en *Lab Invest.* 46: 584. USA.
- Desmet, V. (1987). "Modulation of Biliary Epithelium. Modulation of Liver Cell Expression", edited by Reuter W. Popper H. Anas I. M.; Heinnech, P. C.; Landman, L.; Lancaster. MTP Press. pp. 195-214.
- Franke, W.; Denk, H.; Kalt, R. *et al.* (1981). "Biochemical and Immunological Identification of Cytokeratin Proteins Present in Hepatocytes of Mammalian Liver Tissue", en *Exp Cell P.* 131: 299-318. USA.
- Gaiani, S.; Gramantieri, L.; Venturoli, N. *et al.* (1997). "What is the Criterion for Differentiating Chronic Hepatitis from Compensated Cirrhosis? A Prospective Study Comparing Ultrasonography and Percutaneous Liver Biopsy", en *J Hepatol.* 27: 979-985. USA.
- Germain, L.; Noel, M.; Gourdeau, H. y Marceau, N. (1988). "Promotion of Growth and Differentiation of Rat Ductular Oval Cells in Primary Culture", en *Cancer Res.* 48: 368-378. USA.
- Henson, D. (1982). "Heterogeneity in Tumors", en *Arch Pathol Lab Med.* 106: 597. USA.
- Hsia, C.; Everts, R.; Nakatsukasa, H. *et al.* (1992). "Occurrence of Oval-Type Cells in Hepatitis B Virus-Associated Human Hepatocarcinogenesis", en *Hepatol.* 16 (6): 1327-1333. USA.
- Isfort, R.; Cody, D.; Doersen, C. *et al.* (1997). "The Tetratricopeptide Repeat Containing Tg737 Gene is a Liver Neoplasia Tumor Suppressor Gene", en *Oncogene.* 15 (15): 1797-1803. USA.
- Isselbacher, K.; Braunwald, E.; Wilson, J. *et al.* (1994). "Carcinomas del hígado", *Harrison. Principios de medicina interna.* 2: 1720-1721. McGraw-Hill-Interamericana, España.
- Johnson, D.; Herndier, B.; Medeiros, L. *et al.* (1988). "The Diagnostic Utility of the Keratin Profiles of Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma", en *Am J Surg Pathol.* 12: 187-197. USA.
- Lai, Y-S.; Thung, S.; Gerber, M. *et al.* (1989). "Expression of Cytokeratins in Normal and Disease Livers and in Primary Liver Carcinomas", en *Arch Patol Lab Med.* 113: 134-138. USA.
- Moll, R.; Franke, W.; Schiller, D. *et al.* (1982). "The Catalog of Human Cytokeratin Polypeptides: Patterns of Expression of Specific Cytokeratins in Normal Epithelia, Tumors and Culture Cells", en *Cell.* 31: 11-24. USA.
- Osborn, M.
- ____ (1983). "Intermediate Filaments as Histologic Markers an Overview", en *J Invest Dermatol.* 81: 104. USA.
- ____; Altmannberger, M.; Debus, E. *et al.* (1984). "Differentiation of the Major Human Tumor Groups Using Conventional and Monoclonal Antibodies Specific for Individual Intermediate Filament Proteins", en *Ann NY Acad Sci.* 455: 649. USA.
- Ponder, K. (1996). "Analysis of Liver Development, Regeneration, and Carcinogenesis by Genetic Marking Studies", en *EASEB Journal.* 10 (7): 673-682. USA.
- Quinlan, R.; Schiller, D.; Hatzfeld, M. *et al.* (1985). "Patterns of Expression and Organization of Cytokeratin Intermediate Filaments", en *Ann NY Acad Sci.* 455: 282. USA.
- Ray, M.
- ____ (1987). "Distribution Patterns of Cytokeratin Antigen Determinants in Alcoholic and Non-Alcoholic Liver Diseases", en *Hum Pathol.* 18: 61-66. USA.
- ____; Mendenhall, C.; French, S. *et al.* (1993). "Bile Duct Changes in Alcoholic Liver Disease", en *Liver.* 13: 36-45. USA.
- Reid, L.; Fiorino, A.; Sigal, S. *et al.* (1992). "Extracellular Matrix Gradients in the Space of Disse: Relevance to Liver Biology", en *Hepatology.* 15(6): 1198-1203. USA.
- Reuber, M. (1965). "Development of Preneoplastic and Neoplastic Lesions of The Liver in Male Rats Given 0.025% N-2-Fluorenylacetylamide", en *J Natl Cancer Inst.* 34: 697-724. USA.
- Sasaki, A.; Kawano, K.; Aramaki, M. *et al.* (1999). "Immunohistochemical Expression of Cytokeratins in Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Metastatic Adenocarcinoma of the Liver", en *Journal of Surgical Oncology.* 70 (2): 103-108. USA.
- Savolainen, V.; Lalu, K.; Penttilä, A. *et al.* (1994). "Cytokeratin Inclusions in Alcoholic Liver Disease and their Relation to the Amount of Alcohol Intake", en *Liver.* 14: 281-287. USA.
- Skarpen, E.; Thorsen, G. H.; Tasken, K. *et al.* (1998). "Localization of cAMP-Dependent Signal Transducers in Early rat Liver Carcinogenesis", en *Histochemistry & Cell Biology.* 109 (3): 203-209. USA.
- Smith, P. y Yeoh, G. (1996). "Chronic Iron Overload in Rats Induces Oval Cells in the Liver", en *Am J Pathol.* 149(2): 389-398. USA.
- Stosiek, P.; Kasper, M. y Karsten, U. (1990). "Expression of Cytokeratin 19 During Human Liver Organogenesis", en *Liver.* 10: 59-63. USA.
- Traub, P. y Schoeman, R. (1994). "Intermediate Filament Proteins: Cytoskeletal Elements with Gene-Regulatory Function?", en *Int Rev Cytol.* 154: 15-25. USA.
- Van Eyken, P.
- ____ y Desmet, V. (1993). "Cytokeratins and the Liver", en *Liver.* 13: 113-122. USA.
- ____; Sciote, R. y Desmet, V. (1991). "Immunocytochemistry of Cytokeratins in Primary Human liver Tumors", en *APMIS (Suppl).* 23: 77-85. USA.
- ____; Sciote, R.; Paterson, A. *et al.* (1988). "Cytokeratin Expression in Hepatocellular Carcinoma: An Immunohistochemical Study", en *Hum Pathol.* 19(5): 562-568. USA.
- Wu, P.; Fang, J.; Lau, V. *et al.* (1996). "Classification of Hepatocellular Carcinoma According to Hepatocellular and Biliary Differentiation Markers. Clinical and Biological Implications", en *Am J Pathol.* 149 (4): 1167-1175. USA.
- Yoshioka, K.; Kakumu, S.; Tahara, H. *et al.* (1989). "Occurrence of Immunohistochemically Detected Small Mallory Bodies in Liver Disease", en *Am J Gastroenterol.* 5: 535-539. USA.