

Carcinoma subseroso de la vesícula biliar (pT2): Valor pronóstico de la expresión de los genes supresores de tumores p53 y p27 en matrices de tejidos

Iván Roa E^{1,2}, Soledad Lantadilla H¹, Gilda Ibacache S¹, Xabier de Aretxabala U³.

p53 and p27 gene expression in subserosal gallbladder carcinoma

Background: Subserosal carcinoma is the stage that presents the greatest difficulty in the diagnosis therapeutic handling and prognosis evaluation. **Aim:** To study the expression of p53 and p27 genes in subserosal gallbladder cancer. **Material and methods:** One hundred twenty seven tissue samples of subserosal gallbladder cancer (coming from 112 females aged 62 ± 13 years and 15 men aged 67 ± 17 years) and 50 control samples were selected to construct tissue arrays. p53 and p27 genes were determined by immunohistochemistry. **Results:** Thirty eight percent of tumors were not detected at the macroscopic examination, 52% and 17% had lymph node and blood vessel involvement, respectively. Fifty six and 46% were positive for p53 and p27, respectively. No association between the expression of both genes and gender, degree of differentiation, lymph node or blood vessel involvement, was observed. Overall five years actuarial survival was 32%. Patients with positive or negative p53 expression had a 22% and 53% survival, respectively ($p = 0.05$). No association between survival and p27 expression was observed. **Conclusions:** p53 gene expression is a prognostic factor for subserosal gallbladder cancer (Rev Méd Chile 2009; 137: 1017-22). **(Key words:** Gallbladder neoplasms; Genes, p53; p27)

Recibido el 3 de marzo, 2009. Aceptado el 1 de julio, 2009.

Trabajo financiado por proyectos Fondecyt #1060375 y #PBCT6-CTI-SA.

¹Servicio de Anatomía Patológica, Clínica Alemana de Santiago, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo, Santiago de Chile. ²Facultad de Medicina, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile. ³Departamento de Cirugía, Clínica Alemana de Santiago de Chile.

EPIDEMIOLOGÍA E IMPORTANCIA DEL CÁNCER DE LA VESÍCULA BILIAR EN CHILE

El cáncer de la vesícula biliar (CVB) ha sido la principal causa de muerte por tumores malignos en la mujer chilena en los últimos veinte años¹⁻³ y continúa siendo uno de los grandes problemas en la patología tumoral maligna de la

población chilena^{4,5}. A nivel mundial nuestro país muestra una de las más altas tasas de incidencia y mortalidad^{1,2,6}. La mayor frecuencia se observa en las regiones del norte de la India y en países de Latinoamérica como Chile, Bolivia y México^{2,7}.

Carcinoma subseroso de la vesícula biliar (pT2). El carcinoma subseroso es el estadio tumoral que

Correspondencia a: Dr. Iván Roa E. Avenida Vitacura 5951, Vitacura, Santiago, Chile. E mail: iroa@alemana.cl

Abreviaturas utilizadas: CSS =carcinoma subseroso. VB =vesícula biliar. CVB =cáncer de la vesícula biliar. TMA =matrices de tejidos. DE =desviación estándar.

presenta la mayor dificultad en su evaluación histológica, pronóstica y terapéutica⁸⁻¹⁰. En la clasificación TNM corresponde a aquellos tumores que presentan invasión del tejido conjuntivo perimuscular, sin extensión más allá de la serosa ni del hígado¹¹. Las células tumorales en este estadio tumoral están confinadas a una túnica con bordes histológicos poco precisos con dos áreas de muy difícil evaluación. Su mala delimitación favorece una infiltración directa y precoz¹². Por su parte, el tratamiento quirúrgico y neoadyuvante para este grupo de pacientes, ha demostrado una muy heterogénea respuesta, lo que junto al análisis de la sobrevida de un gran número de pacientes, hace suponer la existencia de varios subgrupos de distinto pronóstico y que las clasificaciones actuales no son capaces de identificar, grupos de pacientes que sin duda requerirían tratamientos más específicos^{9,13-16}.

p53 y p27 el cáncer vesicular. En el CVB se han descrito una serie de alteraciones genético-moleculares, sin embargo, la información existente no se compara con la existente en otras neoplasias como el cáncer pulmonar, de mama o colon¹⁷⁻²¹. Se ha demostrado un daño genético global, sin que se conozca la exacta secuencia de las alteraciones genéticas relacionadas con la progresión desde las lesiones intraepiteliales hasta el carcinoma infiltrante^{2,18}.

En la vesícula biliar la participación del gen p53 en la carcinogénesis parece ser un evento precoz²². Su presencia en lesiones preneoplásicas en un bajo porcentaje y su significativo aumento en las lesiones tumorales incipientes y avanzadas así lo demuestran²³. El valor pronóstico de la expresión del gen p53 ha sido reportado en algunos estudios con resultados contradictorios. En algunos de ellos se ha demostrado que los pacientes con expresión normal presentan un mejor pronóstico, en cambio, en otros esta relación no ha sido establecida²⁴⁻²⁶.

Por su parte, p27Kip1 es uno de los mayores inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina de la familia CIP/KIP (p21, p27 y p57). Los complejos ciclina-CDK, están regulados por los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (CDKIs), que inhiben la progresión del ciclo celular²⁷. La mutación del gen p27Kip1 se ha investigado en una amplia variedad de tumores; no obstante, las sustituciones, eliminaciones o reorde-

naciones del gen p27Kip1 se producen raramente. El silenciamiento homocigoto de p27 es raro, a pesar de ello una disminución de los niveles de p27, debido a la degradación de la proteína ocurre en casi la mitad de los carcinomas y se asocia a tumores agresivos y de mal pronóstico^{28,29}.

En el cáncer de la vesícula biliar existen escasos estudios que muestran la relación entre la expresión de p27 y el pronóstico de la enfermedad. Algunos han demostrado que la disminución o pérdida de la expresión de p27 se asocia a un peor pronóstico³⁰⁻³².

El objetivo de este trabajo es determinar la expresión proteica de los genes p53 y p27 y su significado pronóstico en el CSS de la VB.

MATERIAL Y MÉTODO

Casos. Se seleccionaron 127 CSS del archivo de CVB del Hospital de Temuco, Chile. En todos los casos el diagnóstico se realizó en la pieza de colecistectomía. El nivel de infiltración tumoral fue establecido mediante el estudio seriado de la totalidad de la vesícula biliar (mapeo) de acuerdo a protocolos establecidos desde hace más de una década y previamente publicados^{12,33}. Ninguno de los pacientes recibió quimioterapia o radioterapia complementaria. Los tumores fueron clasificados de acuerdo a la clasificación de la OMS y AJCC^{11,34}.

Confeción de matrices de tejidos (TMA). Se seleccionaron 3 áreas representativas de cada uno de los tumores y de los controles. Para la confección de las matrices de los TMA, se utilizó el "Semiautomatic Tissue MicroArrayer Pathology Devices, Inc" con agujas de 2 mm. Los 3 cilindros de tejidos fueron extraídos del bloque donante previa marcación de las láminas teñidas con HE y puestos en el bloque receptor a una distancia de 3 mm de separación. Las inclusiones fueron puestas en estufa a 55°C por 30 min para obtener la adherencia entre las muestras y el bloque receptor.

Técnica de inmunohistoquímica. Se realizó la técnica estándar para tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina. Los cortes histológicos de los TMA de 4 micras de espesor fueron desparafinados e hidratados en concentraciones decrecientes de alcohol. La recuperación de antígenos se realizó mediante exposición

a microondas en *buffer* citrato pH 6,0 y lavados en PBS pH 7,4. Se utilizó anticuerpo anti p53 (“monoclonal antibody p53 [clone DO-7] Dako™”) en dilución 1/50 y anti p27 (“monoclonal antibody p27 AB-1 [clone DCS-72.F6] Labvision™”) en dilución 1/50. El anticuerpo primario fue incubado a temperatura ambiente por 60 min y luego incubado con el complejo “Super Picture Polymer Detection Kit™ Zymed en equipo Dakoautostainer™”.

Formas de medición de la positividad. Se consideró como expresión positiva a la tinción nuclear. La intensidad se evaluó en escala de: + o débil, ++ moderada, y +++ intensa. Como control positivo de p53 se empleó la tinción de células epiteliales tumorales de cánceres de colon, de casos reiteradamente positivos y casos con mucosa normal de colon para p27. La medición de los casos se realizó en el cilindro con la mayor positividad y fue clasificada en base a la intensidad y porcentaje de positividad de las células tumorales.

Para fines de este estudio se consideró como positiva la tinción nuclear de p53 y p27 en aquellos casos en que al menos 5% y 50% de las células mostraron positividad nuclear intensa, respectivamente (Figuras 1-2).

Estadística. Se realizó mediante test de chi cuadrado y exacto de Fisher para las tablas de contingen-

cia. En todos los casos se obtuvo seguimiento de hasta 120 meses. Se realizaron curvas de supervivencia actuarial de Kaplan-Meier con análisis de significación mediante Log-rank test (Cox-Mantel).

RESULTADOS

Características generales del grupo estudiado. La distribución por sexo y edad de los 127 casos en estudio se resumen en la Tabla 1. El 88% (112 casos) correspondieron a mujeres con un promedio de edad de 62,2 años (DE ± 12,7 años) y los casos restantes a hombres con una edad promedio de 67,3 (DE ± 12,5 años). La diferencia de los promedios de edad entre hombres y mujeres fue significativa ($p < 0,01$).

Treinta y ocho por ciento de los tumores no fueron detectados al examen macroscópico, siendo de carácter inaparente y constituyeron un hallazgo durante el estudio histológico. Por otro lado, la mayor parte de los casos eran tumores moderadamente (65%) o poco diferenciados (23%). El estudio sistematizado de la pieza de colecistectomía demostró permeaciones vasculares linfáticas en 66 casos (52%) y en 17% vascular sanguíneo.

Resultados del estudio inmunohistoquímico. La proteína del gen p53 se detectó en 71 casos (56%), con una

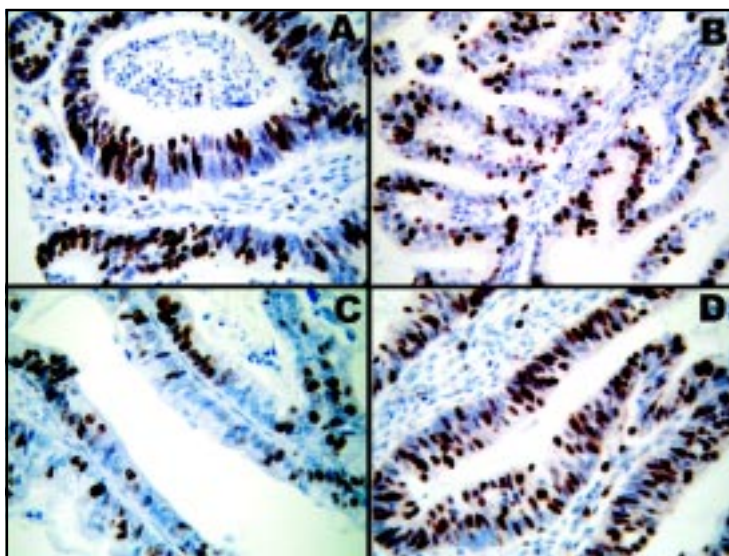


Figura 1. Expresión de p53 en CSS (Ax200 y Bx100) y p27 (Cx200 y Dx100). Se observa tinción nuclear en las células tumorales en porcentajes diferentes en cada caso. La tinción de p27 fue menos frecuente e intensa.

Tabla 1. Características morfológicas generales del grupo estudiado (n =127)

	Femenino	Masculino	Total
n	112	15	127
Edad	62,2*	67,3*	62,9
Desviación estándar (±)	12,7	12,5	12,8
Inaparentes	43	5	48
Diferenciación			
Bien	13	2	15
Moderado	72	11	83
Poco	26	3	29
Compromiso vascular	22/111	0/16	22/127
Compromiso linfático	51/111	15/16	66/127
Inmunohistoquímica			
p53 (+)	64/111	7/16	71/127
p27 (+)	49/111	9/16	58/127

*p =0,018

mayor intensidad y frecuencia en los tumores mejor diferenciados (62% tumores bien diferenciados versus 54% poco diferenciados) (p =ns). No se observó relación entre la expresión de p53 y características histológicas como compromiso vascular linfático, sanguíneo o carácter inaparente del tumor. Similares hallazgos se observaron con la expresión proteica de p27, la cual fue positiva en 58 casos (46%) y con la cual no se demostró relación con ninguno de los elementos morfológicos macroscópicos o microscópicos incluyendo el grado de diferenciación histológica.

Sobrevida de pacientes con CSS y expresión de p53 y p27. La sobrevida actuarial de los 127 pacientes incluidos en este estudio se muestra en la Figura 2A, la que fue de 52% a los 20 meses y de 32% a los 5 años, demostrando el mal pronóstico de este grupo de pacientes, sin que existiese diferencias por género. Los tumores mejor diferenciados tuvieron una significativa mejor sobrevida que los con menor diferenciación (p <0,001). Así los pacientes con tumores bien diferenciados alcanzaron una sobrevida promedio de 76% a cinco años, en cambio, los tumores poco diferenciados sólo de 28% a 5 años. El compromiso tumoral de vasos linfáticos y sanguíneos en la pared vesicular se asoció a un significativo peor pronóstico (p <0,01). La sobrevida a cinco años de los pacientes con CSS que mostraron expresión positiva de p53 fue significativamente peor que los pacientes p53 negativos (22% versus 54% a cinco años) (p =0,05) (Figura 2B).

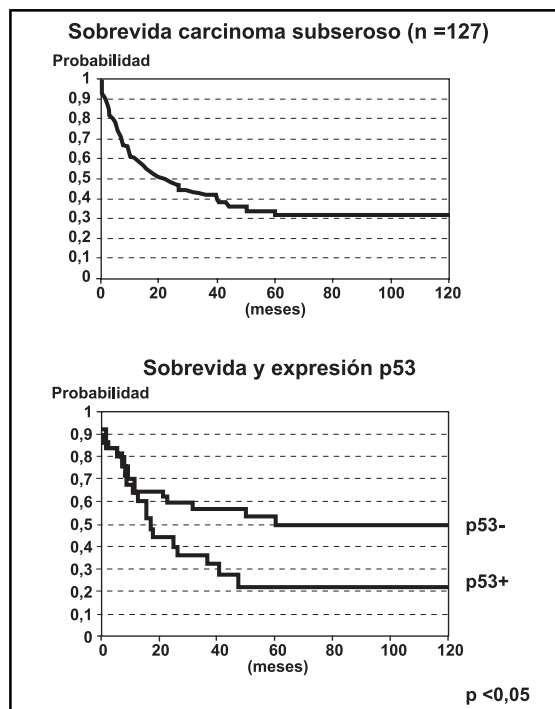


Figura 2. Sobrevida actuarial del grupo de pacientes con CSS (n =127) (A) y sobrevida en relación a la expresión de la proteína del gen p53 (B).

Respecto de la expresión de p27, no logramos demostrar en este estudio relación con la sobrevida de los pacientes con CSS, a diferencia de lo reportado en series extranjeras^{32,35}.

DISCUSIÓN

El CSS de la vesícula biliar continúa siendo uno de los problemas de mayor complejidad en la patología tumoral de este órgano. En primer lugar por su alta frecuencia, la que alcanza alrededor de 25% del total de cánceres de la VB⁸. Sin embargo, es necesario destacar que a los tumores que infiltran más allá de la túnica muscular, se les tiende a denominar carcinomas subserosos y en realidad esta túnica no existe, tal y como ha sido definida en otros segmentos del tubo digestivo como estómago o colon. Esto se debe a que la túnica muscular en la vesícula biliar es discontinua y no representa una barrera anatómica. Por fuera de ella hay una condensación de tejido conjuntivo en donde se encuentran los senos de Rokitsky-Aschoff y por fuera un tejido conjuntivo laxo que termina ya sea en la serosa en los bordes vesiculares que están revestidos por mesotelio, o bien en el tejido hepático a nivel de lecho vesicular. De esta manera, su constitución es muy heterogénea, de ahí que los tumores que infiltran esta área también presenten las mismas dificultades para su evaluación en lo que a profundidad del tumor se refiere. Una dificultad extra está dada por los senos Rokitsky-Aschoff, los que comprometidos por el tumor pueden transformar a un carcinoma *in situ* en un CSS en forma directa³⁶. Finalmente aún no está demostrado que la infiltración de la subserosa en la cara peritoneal tenga el mismo

significado pronóstico que la infiltración a nivel del lecho vesicular.

La sobrevida actuarial de 33% a cinco años es similar a la sobrevida observada en nuestra actual serie de 1.366 CVB y que ha sido parcialmente reportada en trabajos anteriores^{37,38}.

Nuestro estudio muestra que un alto porcentaje de CVB es estadio pT2 muestran expresión anómala de gen p53% (56%) y que 54% muestra una disminución en la expresión de la proteína del gen p27. Estos porcentajes se encuentran en los rangos que han sido reportados por otros autores en el CVB^{23,39-41}.

La relación que se observa entre la expresión proteica del gen p53 y la sobrevida en el CSS, aporta un elemento más en la caracterización de este particular grupo de tumores, cuya importancia es la potencial curabilidad de un alto porcentaje de pacientes con los actuales tratamientos. Sin embargo, el reconocimiento de distintos subgrupos de CSS, requiere del empleo de marcadores no convencionales en forma individual o en forma asociada, como la expresión del gen ERCC-1 cuyos resultados preliminares estamos recién comunicando (Roa datos no publicados 2008). La confección de un panel de marcadores inmunohistoquímicos con significado pronóstico, sin duda contribuirá a una mejor selección de los pacientes a terapias concordantes con la conducta biológica de esta neoplasia maligna y que afecta a un importante grupo de nuestra población.

REFERENCIAS

- ANDIA ME, HSING AW, ANDREOTTI G, FERRECCIO C. Geographic variation of gallbladder cancer mortality and risk factors in Chile: a population-based ecological study. *Int J Cancer* 2008; 123: 1411-6.
- LAZCANO-PONCE EC, MIQUEL JF, MUNOZ N, HERRERO R, FERRECCIO C, WISTUBA II ET AL. Epidemiology and molecular pathology of gallbladder cancer. *CA Cancer J Clin* 2001; 51: 349-64.
- KAPOOR VK. Gallbladder cancer: a global perspective. *J Surg Oncol* 2006; 93: 607-9.
- SERRA I. [Has gallbladder cancer mortality decrease in Chile?]. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 1079-84.
- ANDIA KM, GEDERLINI GA, FERRECCIO RC. [Gallbladder cancer: trend and risk distribution in Chile]. *Rev Méd Chile* 2006; 134: 565-74.
- PANDEY M. Risk factors for gallbladder cancer: a reappraisal. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12: 15-24.
- RANDI G, FRANCESCHI S, LA VECCHIA C. Gallbladder cancer worldwide: geographical distribution and risk factors. *Int J Cancer* 2006; 118: 1591-602.
- ROA I, DE ARETXABALA X, ARAYA JC, VILLASECA M, ROA J, GILDA IT ET AL. [Morphological prognostic elements in gallbladder cancer]. *Rev Méd Chile* 2002; 130: 387-95.
- DE ARETXABALA X, ROA I, BURGOS L, LOSADA H, ROA JC, MORA J ET AL. Gallbladder cancer: an analysis of a series of 139 patients with invasion restricted to the subserosal layer. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 186-92.
- SASAKI R, UESUGI N, ITABASHI H, FUJITA T, TAKEDA Y, HOSHIKAWA K ET AL. Clinicopathological study of depth of subserosal invasion in patients with pT2 gallbladder carcinoma. *J Surg Oncol* 2005; 92: 83-8.
- Gallbladder. In American Joint Committee on Cancer: *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York, NY: Springer. 2002; 139-44.
- ROA I, ARAYA JC, WISTUBA I, DE ARETXABALA X. [Gallbladder cancer: anatomic and anatomo-pathologic considerations]. *Rev Méd Chile* 1990; 118: 572-9.
- DE ARETXABALA X, ROA I, ARAYA JC, BURGOS L, FLORES P, HUENCHULLÁN I ET AL. Operative findings in patients with early forms of gallbladder cancer. *Br J Surg* 1990; 77: 291-3.

14. KONDO S, TAKADA T, MIYAZAKI M, MIYAKAWA S, TSUKADA K, NAGINO M ET AL. Guidelines for the management of biliary tract and ampullary carcinomas: surgical treatment. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15: 41-54.
15. YOKOMIZO H, YAMANE T, HIRATA T, HIFUMI M, KAWAGUCHI T, FUKUDA S. Surgical treatment of pT2 gallbladder carcinoma: a reevaluation of the therapeutic effect of hepatectomy and extrahepatic bile duct resection based on the long-term outcome. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1366-73.
16. GALLARDO JO, RUBIO B, FODOR M, ORLANDI L, YANEZ M, GAMARGO C ET AL. A phase II study of gemcitabine in gallbladder carcinoma. *Ann Oncol* 2001; 12: 1403-6.
17. WISTUBA II, TANG M, MAITRA A, ALVAREZ H, TRONCOSO P, PIMENTEL F ET AL. Genome-wide allelotyping analysis reveals multiple sites of allelic loss in gallbladder carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 3795-800.
18. WISTUBA, II, GAZDAR AF. Gallbladder cancer: lessons from a rare tumor. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 695-706.
19. ALVAREZ H, CORVALÁN A, ROA JC, ARGANI P, MURILLO F, EDWARDS J ET AL. Serial analysis of gene expression identifies connective tissue growth factor expression as a prognostic biomarker in gallbladder cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2631-8.
20. SAIETTA AA, GIGELOU F, PAPANASTASIOU PI, KOILAKOU SV, KALEKOU-GRECA H, MILLIARAS D ET AL. High-level microsatellite instability is not involved in gallbladder carcinogenesis. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 67-71.
21. PANDEY SN, JAIN M, NIGAM P, CHOUDHURI G, MITTAL B. Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTM3 and the susceptibility to gallbladder cancer in North India. *Biomarkers* 2006; 11: 250-61.
22. MORENO M, PIMENTEL F, GAZDAR AF, WISTUBA II, MIQUEL JF. TP53 abnormalities are frequent and early events in the sequential pathogenesis of gallbladder carcinoma. *Ann Hepatol* 2005; 4: 192-9.
23. WISTUBA II, GAZDAR AF, ROA I, ALBORES-SAAVEDRA J. p53 protein overexpression in gallbladder carcinoma and its precursor lesions: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1996; 27: 360-5.
24. DA ROCHA AO, COUTINHO LM, SCHOLL JG, LEBOUTTE LD. The value of p53 protein expression in gallbladder 60 cases. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1310-4.
25. KIM YW, HUH SH, PARK YK, YOON TY, LEE SM, HONG SH. Expression of the c-erb-B2 and p53 protein in gallbladder carcinomas. *Oncol Rep* 2001; 8: 1127-32.
26. CHANG HJ, YOO BC, KIM SW, LEE BL, KIM WH. Significance of PML and p53 protein as molecular prognostic markers of gallbladder carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2007; 13: 326-35.
27. ABUKHDEIR AM, PARK BH. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10: e19.
28. CHU IM, HENGST L, SLINGERLAND JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 253-67.
29. LE SAGE C, NAGEL R, AGAMI R. Diverse ways to control p27Kip1 function: miRNAs come into play. *Cell Cycle* 2007; 6: 2742-9.
30. FILIPITS M, PUHALLA H, WRBA F. Low p27Kip1 expression is an independent prognostic factor in gallbladder carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23: 675-9.
31. HUI AM, LI X, SHI YZ, TORZILLI G, TAKAYAMA T, MAKUUCHI M. p27 (Kip1) expression in normal epithelia, precancerous lesions, and carcinomas of the gallbladder: association with cancer progression and prognosis. *Hepatology* 2000; 31: 1068-72.
32. LI SH, LI CF, SUNG MT, ENG HL, HSIUNG CY, HUANG WW ET AL. Skp2 is an independent prognosticator of gallbladder carcinoma among p27 (Kip1)-interacting cell cycle regulators: an immunohistochemical study of 62 cases by tissue microarray. *Mod Pathol* 2007; 20: 497-507.
33. ROA I, ARAYA JC, VILLASECA M, ROA J, DE ARETXABALA X, IBACACHE G. Gallbladder cancer in a high risk area: morphological patterns. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1540-6.
34. ALBORES-SAAVEDRA J, HENSON DE, SOBIN LH. The WHO Histological Classification of Tumors of the Gallbladder and Extrahepatic Bile Ducts. A commentary on the second edition. *Cancer* 1992; 70: 410-4.
35. FILIPITS M, PUHALLA H, WRBA F. Low p27Kip1 expression is an independent prognostic carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23: 675-9.
36. ROA I, ARAYA JC, WISTUBA I, VILLASECA M, DE ARETXABALA X, BUSEL D ET AL. [Epithelial lesions associated with gallbladder carcinoma. A methodical study of 32 cases]. *Rev Méd Chile* 1993; 121: 21-9.
37. ROA I, DE ARETXABALA X, ARAYA JC, VILLASECA M, ROA J, GILDA IT ET AL. [Morphological prognostic elements in gallbladder cancer]. *Rev Méd Chile* 2002; 130: 387-95.
38. ROA I, DE ARETXABALA X, ROA J, ARAYA JC, VILLASECA M, GUZMÁN P ET AL. [Is gallbladder cancer a disease with bad prognosis?]. *Rev Méd Chile* 2002; 130: 1295-302.
39. ROA I, MELO A, ROA J, ARAYA J, VILLASECA M, DE ARETXABALA X. [P53 gene mutation in gallbladder cancer]. *Rev Méd Chile* 2000; 128: 251-8.
40. WATANABE H, DATE K, ITOI T, MATSUBAYASHI H, YOKOYAMA N, YAMANO M ET AL. Histological and genetic changes in malignant transformation of gallbladder adenoma. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 4: 136-9.
41. DA ROCHA AO, COUTINHO LM, SCHOLL JG, LEBOUTTE LD. The value of p53 protein expression in gallbladder carcinoma: analysis of 60 cases. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1310-4.