



TESIS DOCTORAL

PAPEL DEL RECEPTOR DE DIOXINA EN EL HEPATOCARCINOMA

NOELIA DE ARMAS CONDE

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR,
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA**

Conformidad del director y codirector

Pedro María Fernández Salguero

Gerardo Blanco Fernández

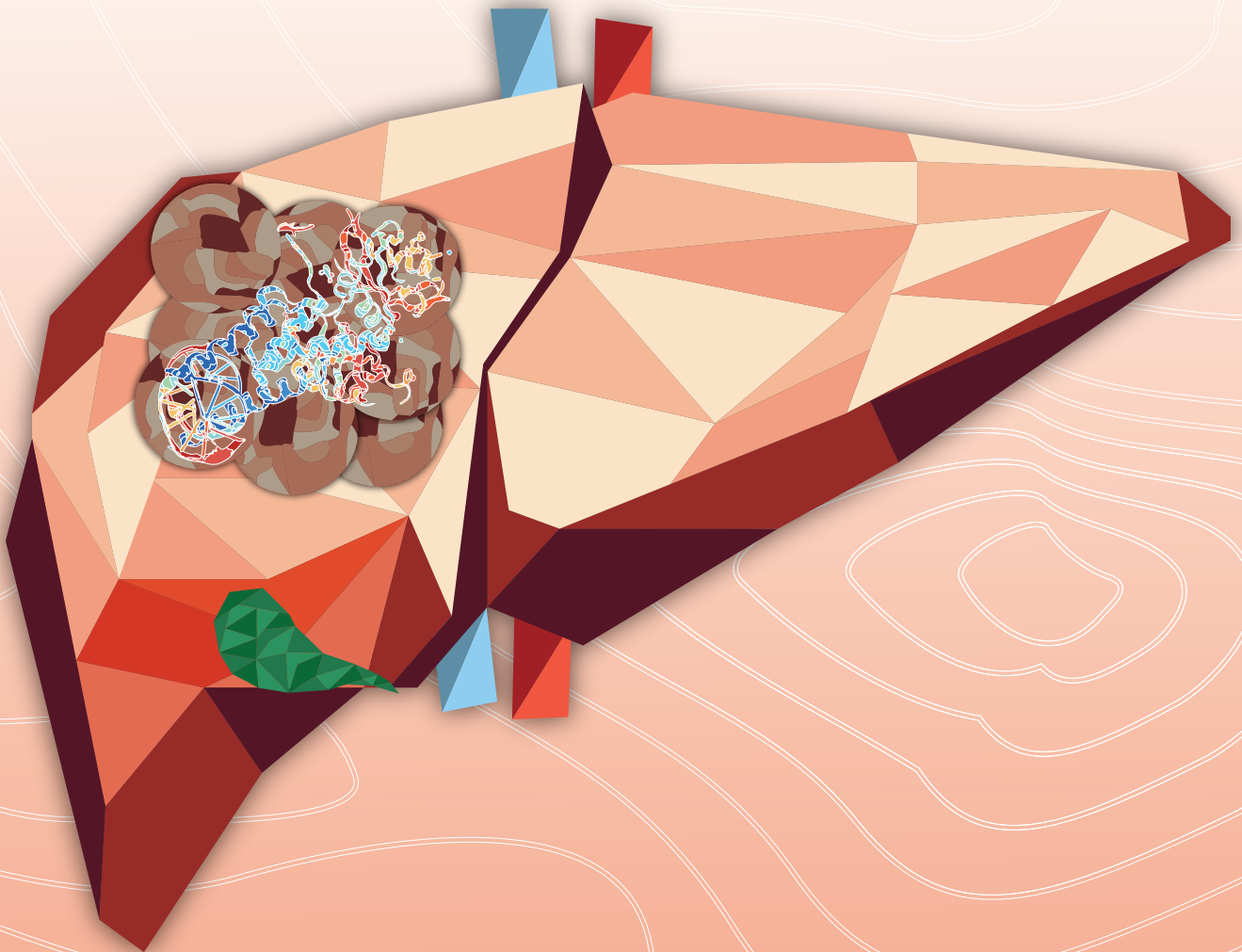
Esta tesis cuenta con la autorización del director y codirector de la misma y de la Comisión académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

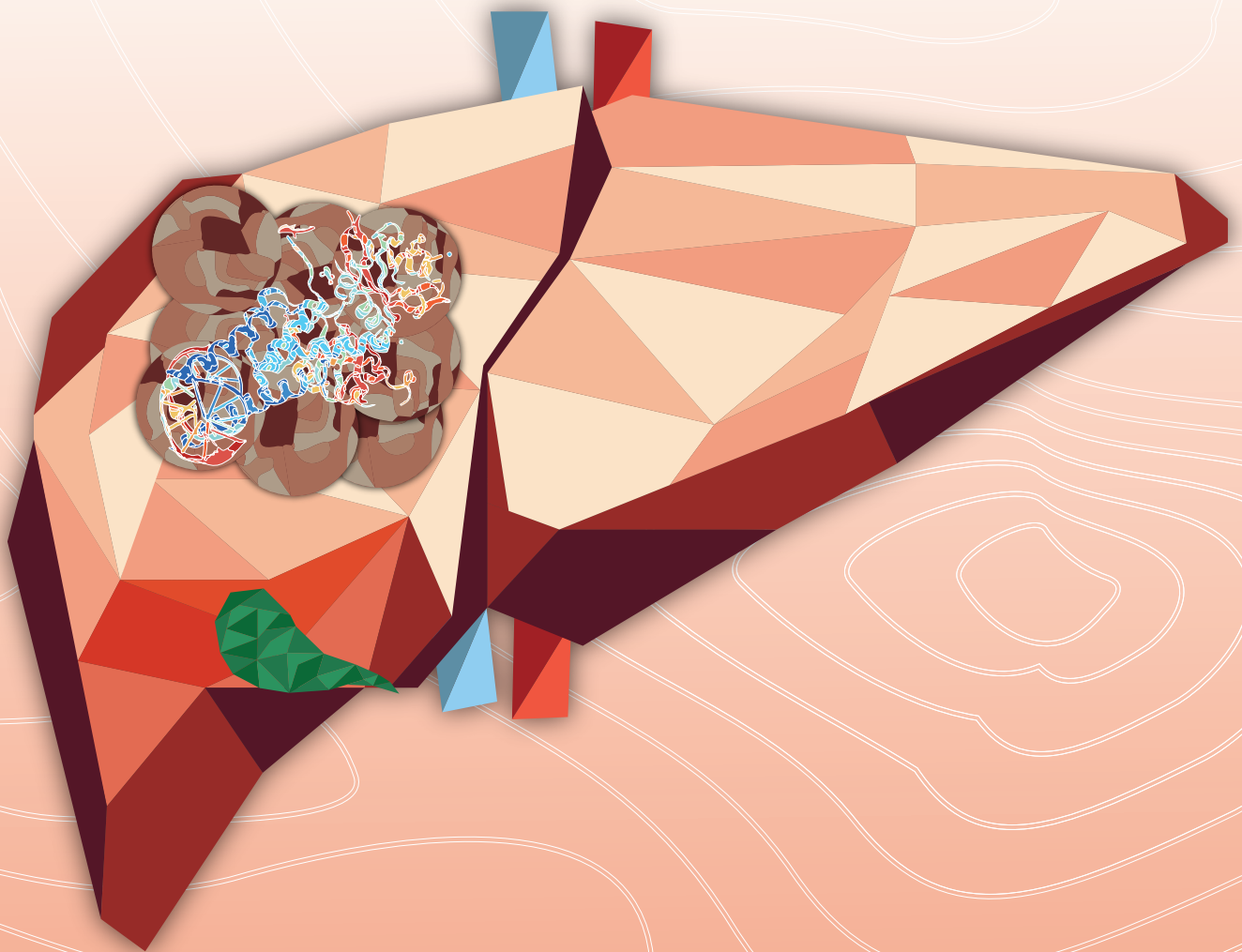
AÑO DE LECTURA 2022

PAPEL DEL RECEPTOR DE DIOXINA EN EL HEPATOCARCINOMA

TESIS DOCTORAL

NOELIA DE ARMAS CONDE





AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi tutor y director de tesis el Dr. Pedro María Fernández Salguero, catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Extremadura, sin su guía e inspiración durante estos años este proyecto difícilmente se podría haber llevado a cabo, su humildad hace brillar aún más su éxito profesional.

En segundo lugar, y no por ello menos importante, a mi codirector de tesis, mi maestro y también jefe del servicio de Cirugía Hepatobiliar y Trasplante Hepático del Hospital Universitario de Badajoz el Dr. Gerardo Blanco Fernández, con su infinita paciencia y su amor por la cirugía y por la medicina me enseña cada día el compromiso con nuestro trabajo, siendo nuestro deber ofrecer una medicina de calidad a nuestros pacientes. Siempre estaré agradecida por la oportunidad de aprender a su lado.

Al equipo de Biología Molecular de la Universidad de Extremadura y al equipo de Biobanco del Hospital Universitario de Badajoz, porque han sido parte fundamental de este engranaje, siempre dispuestos a ofrecerme su ayuda cuando lo he necesitado, esta tesis ha sido el resultado de un trabajo en equipo.

A mis compañeros del servicio de Cirugía Hepatobiliar y Trasplante Hepático del Hospital Universitario de Badajoz, por demostrarme cada día que el trabajo bien hecho, el compañerismo y el rigor científico deben ser siempre la marca de la casa.

A mi familia y en especial a mis padres y a mi hermana, porque sin ellos definitivamente no estaría escribiendo estos agradecimientos, han sido, son y serán la fuerza y el motor de mi vida.

A Julen, porque no podría haber encontrado mejor compañero de viaje.

ABREVIATURAS

- A1AT** Alfa-1 antitripsina
- AASLD** Asociación Americana para el estudio de las enfermedades del hígado
- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- AFB1** Aflatoxina B1
- AFP** Alfa- fetoproteína
- AFP-L3** Lens culinaris alfa-fetoproteína-aglutinina reactiva
- AGA** Asociación Americana de Gastroenterología
- AhR** Receptor de hidrocarburos de arilo/ receptor de dioxina
-
- AIC** Criterio de información de Akaike
- Anti-HBc** Anticuerpos contra la proteína core para el Virus de la Hepatitis B
- Anti-VHC** Anticuerpos contra el Virus de la Hepatitis C
- ARN/ RNA** Ácido ribonucleico
- Arnt** Translocador nuclear del receptor de arilos
- ASA** Sociedad Americana de Anestesiología
- BCLC** Grupo de cáncer de hígado del Hospital Clínico de Barcelona, *Barcelona Clinic Liver Cancer*
- bHLH- PAS** Estructura hélice-bucle-hélice-PAS
- BSA** Albúmina de suero bovino
- c-Raf** Protooncogén serina/treonina-proteína quinasa
- CDK8** Quinasa dependiente de Ciclina 8
- CHC/HCC** Hepatocarcinoma/ Carcinoma Hepatocelular
- CK19** Citoqueratina 19
- CK7** Citoqueratina 7
- CLIP** Programa italiano de cáncer de hígado, *the Cancer of the Liver Italian Program*
- cTACE** Quimioembolización transarterial convencional, *conventional TACE*
- CTCAE** Criterios de terminología común para eventos adversos

CTNNB1	β - catenina 1
CUPI	Índice pronóstico de la universidad de China, <i>Chinese University Prognostic Index</i>
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DCP	Des-gamma-carboxiprotrombina
DEB-TACE	Quimioembolización transarterial con perlas liberadoras de fármacos, <i>TACE with drug-eluting beads</i>
DS	Desviación estándar
EASL	Asociación Europea para el estudio del hígado
ECOG	Grupo oncológico cooperativo del Este
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
EORTC	Organización europea para la investigación y el tratamiento del cáncer
FGF-R	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
GPC3	Glypican 3
GRETCH	Grupo de estudio y tratamiento del carcinoma hepatocelular
GS	Glutamina sintetasa
HBeAg	Antígeno e del Virus de la Hepatitis B
HBsAg	Antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B
HKLC	Cáncer de hígado de Hong Kong, <i>Hong Kong Liver Cancer</i>
HR	Cociente de riesgos
Hsp70	Proteína de shock térmico de 70 kDa
Hsp90	Proteína de shock térmico de 90 kDa
IC	Intervalo de confianza
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGFR	Receptor del factor de crecimiento insulínico
IgM	Inmunoglobulina M
IIS	Índice de inmunidad-inflamación sistémica
IMC	Índice de masa corporal
INL	Índice Neutrófilos- Linfocitos

- INR** Índice internacional normalizado
- IPL** Índice Plaquetas- Linfocitos
- JIS** Estadificación integrada japonesa, *Japan Integrated Staging*
- KEAP1** Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch
- KGFR** Receptor del factor de crecimiento de los queratinocitos
- LCSGJ** Grupo de estudio de cáncer de hígado de Japón, *Liver Cancer Study Group of Japan*
- LI-RADS** Sistema de datos e informes de imágenes hepáticas
- MELD** Modelo de enfermedad hepática en etapa terminal
- MLL** Leucemia mieloide/linfoide o de linaje mixto
- MTM-HCC** Subtipo histológico macrotrabecular masivo de hepatocarcinoma
- mTOR** Diana de rapamicina en células de mamífero
- MWA** Ablación mediante microondas, *microwave ablation*
- n** Tamaño de la muestra
- NCOR1** Correpresor 1 de receptor nuclear
- NE** Nivel de evidencia
- NFE2L2** Factor nuclear 2 derivado del eritroide 2
- NIR** Fluorescencia del Infrarrojo Cercano
- NR-AhR** No represión de AhR
- NR-TAZ** No represión de TAZ
- NR-YAP** No represión de YAP
- NR-βc** No represión de Beta-catenina
- NRF2** Factor nuclear derivado de eritroide 2
- NS-AhR** No sobreexpresión de AhR
- NS-TAZ** No sobreexpresión de TAZ
- NS-YAP** No sobreexpresión de YAP
- NS-βc** No sobreexpresión de Beta-catenina
- NT** Tejido no tumoral sobre hígado no cirrótico
- NTC** Tejido no tumoral sobre hígado cirrótico
- OMS** Organización Mundial de la Salud
- OR** Razón de probabilidades
- p-ERK** ERK fosforilada
- P25** Percentil 25

P75	Percentil 75
PDFGR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEI	Inyección percutánea con alcohol, <i>percutaneous ethanol injection</i>
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-fosfato-quinasa
PKB	Proteína quinasa B
PST	Prueba del estado de funcionamiento, <i>Performance Status Test</i>
R-AhR	Represión de AhR
R-TAZ	Represión de TAZ
R-YAP	Represión de YAP
R- β c	Represión de Beta-catenina
RDI	Razón de densidades de incidencia
RFA/ RF	Ablación mediante radiofrecuencia, <i>radiofrequency ablation</i>
RH	Resección hepática
RM	Resonancia magnética
RNA-VHC	Ácido ribonucleico del Virus de la Hepatitis C
RPS6	Proteína Ribosómica S6
RR	Riesgo relativo
RSK2	Proteína quinasa ribosómica S6
S-AhR	Sobreexpresión de AhR
S-TAZ	Sobreexpresión de TAZ
S-YAP	Sobreexpresión de YAP
S- β c	Sobreexpresión de Beta-catenina
SCE	Supervivencia causa- específica
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SG	Supervivencia global
SIRT	Radioterapia interna selectiva, <i>selective internal radiation therapy</i>
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SLR	Supervivencia libre de recurrencia
TACE/ QETA	Quimioembolización transarterial, <i>transarterial chemoembolisation</i>
TARE	Radioembolización transarterial, <i>transarterial radioembolization</i>

- TAZ** Coactivador transcripcional con unión al dominio PDZ
- TC** Tomografía computarizada
- TCDD** 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
- TEAD** Factores de transcripción de unión al ADN
- TERT** Transcriptasa inversa telomerasa
- TH** Trasplante hepático
- TKR** Receptor tirosina quinasa
- TNM** Tumor- Node- Metastasis
- VEGFR** Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
- VHB** Virus de la Hepatitis B
- VHB-DNA** ADN del Virus de la Hepatitis B
- VHC** Virus de la Hepatitis C
- VHD** Virus de la Hepatitis D
- VIH** Virus de la inmunodeficiencia humana
- XAP2** Proteína que interactúa con el receptor de hidrocarburo de arilo
- XRE** Elemento de respuesta a los xenobióticos, *Xenobiotic Responsive Element*
- Y90** Itrio-90
- YAP** Proteína asociada a Yes

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	7
ABREVIATURAS	9
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	15
ÍNDICE DE FIGURAS	23
ÍNDICE DE TABLAS	25
INTRODUCCIÓN.....	29
1.1. CONCEPTO.....	31
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	31
1.2.1. Variabilidad epidemiológica según el sexo y la edad	31
1.2.2. Variabilidad epidemiológica según la distribución geográfica.....	32
1.3. FACTORES DE RIESGO Y PATOGENIA DEL HEPATOCARCINOMA	33
1.3.1. Lesiones premalignas.....	33
1.3.1.1. Cirrosis	33
1.3.1.2. Nódulos displásicos.....	33
1.3.2. Enfermedad hepática de origen vírico.....	34
1.3.2.1. Hepatitis crónica por VHB	34
1.3.2.2. Hepatitis crónica por VHC	34
1.3.2.3. Hepatitis crónica por coinfección VHB y VHC	35
1.3.2.4. Hepatitis crónica por VHD	36
1.3.3. Enfermedad alcohólica del hígado.....	37
1.3.4. Enfermedad del hígado graso no alcohólico.....	38
1.3.5. Ingesta de aflatoxinas.....	39

1.3.6. Susceptibilidad genética	40
1.3.6.1. Hemocromatosis hereditaria.....	40
1.3.6.2. Enfermedad de Wilson.....	41
1.3.6.3. Déficit α -1 antitripsina	41
1.3.6.4. Porfiria	41
1.3.7. Otros factores de riesgo	42
1.3.7.1. Obesidad.....	42
1.3.7.2. Diabetes Mellitus tipo 2	43
1.3.7.3. Tabaco.....	44
1.4. PROGRAMA DE DETECCIÓN PRECOZ DEL HEPATOCARCINOMA.....	45
1.5. PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS DEL HEPATOCARCINOMA	47
1.5.1. Procedimientos diagnósticos no invasivos.....	47
1.5.1.1. Tomografía computarizada (TC) y Resonancia Magnética (RM).....	47
1.5.1.2. Ecografía con contraste (RM)	48
1.5.2. Procedimientos diagnósticos histopatológicos	49
1.5.3. Marcadores tumorales serológicos	50
1.5.3.1. Alfa- fetoproteína	50
1.5.3.2. Otros marcadores serológicos.....	51
1.6. FACTORES PRONÓSTICOS DEL HEPATOCARCINOMA	52
1.6.1. Factores genómicos	53
1.6.1.1. Promotor TERT	53
1.6.1.2. Wnt/ β -catenina.....	54
1.6.1.3. Vía del regulador del ciclo celular y supresor tumoral p53.....	55
1.6.1.4. Modificadores epigenéticos	56
1.6.1.5. Vía del estrés oxidativo.....	56
1.6.1.6. Vía PI3K/AKT/mTOR.....	57
1.6.1.7. Vía RAS/RAF/MAPK.....	57
1.7. SISTEMAS DE ESTADIFICACIÓN DEL HEPATOCARCINOMA.....	59
1.7.1. Sistema de estadificación Tumor-node-metastasis.....	59
1.7.2. Sistema de estadificación Okuda.....	61

1.7.3. Puntuación the Cancer of the Liver Italian Program.....	61
1.7.4. Sistema de estadificación francés	62
1.7.5. Sistema Barcelona Clinic Liver Cancer.....	62
1.7.6. El índice pronóstico de la Universidad de China (CUPI)	65
1.7.7. El sistema de estadificación integrado japonés.....	65
1.7.8. Sistema de estadificación Hong Kong Liver Cancer.....	66
1.8. TRATAMIENTOS.....	67
1.8.1. Tratamientos curativos.....	67
1.8.1.1. Resección hepática	68
1.8.1.2. Trasplante hepático	70
1.8.1.3. Ablación	71
1.8.2. Tratamientos no curativos.....	73
1.8.2.1. Quimioembolización transarterial.....	73
1.8.2.2. Radioembolización	74
1.8.2.3. Tratamiento sistémico	77
JUSTIFICACIÓN.....	79
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	83
3.1. HIPÓTESIS.....	85
3.2. OBJETIVOS.....	85
3.2.1. Objetivo principal	85
3.2.2. Objetivo secundarios	85
MATERIAL Y MÉTODOS	87
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	89
4.2. PACIENTES	89
4.3. DEFINICIÓN DE VARIABLES OBJETO DE ESTUDIO	90
4.3.1. Definición de las variables dependientes.....	90
4.3.2. Definición de las variables independientes.....	90

4.3.2.1. Datos prequirúrgicos del paciente.....	90
4.3.2.2. Datos quirúrgicos.....	93
4.3.2.3. Datos hospitalarios.....	95
4.3.2.4. Seguimiento del paciente postratamiento	96
4.3.2.5. Resultados anatomopatológicos del tumor.....	97
4.3.2.6. Resultados biomoleculares del tumor y del tejido no tumoral.....	98
4.4. EXTRACCIÓN, CONSERVACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	99
4.4.1. Extracción de muestras biológicas	99
4.4.2. Conservación de muestras biológicas	100
4.4.3. Análisis de niveles proteicos mediante inmunoblotting (Western-blotting)	101
4.4.3.1. Preparación de los extractos proteicos.....	101
4.4.3.2. Medida de la concentración de proteína	101
4.4.3.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa	101
4.5. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	103
4.5.1. Análisis estadístico de los datos.....	103
RESULTADOS	105
5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GENERAL DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	107
5.1.1. Estudio de variables clínico- epidemiológicas preoperatorias.....	107
5.1.2. Estudio de variables operatorias y postoperatorias.....	109
5.1.2.1. Estudio de variables anatomopatológicas.....	110
5.1.3. Estudio de variables de seguimiento	112
5.1.4. Estudio de variables moleculares	114
5.2. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE AHR.....	116
5.2.1. Estudio de variables clínico- epidemiológicas preoperatorias	116
5.2.2. Estudio de variables anatomopatológicas.....	117

5.2.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la sobreexpresión molecular de AhR.....	118
5.3. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE β -CATENINA	120
5.3.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias.....	120
5.3.2. Estudio de variables anatomopatológicas.....	121
5.3.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la sobreexpresión molecular de β -catenina.....	122
5.4. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE YAP	124
5.4.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias	124
5.4.2. Estudio de variables anatomopatológicas	125
5.4.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la sobreexpresión molecular de YAP	127
5.5. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE TAZ	128
5.5.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias.....	128
5.5.2. Estudio de variables anatomopatológicas.....	129
5.5.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la sobreexpresión molecular de TAZ.....	130
5.6. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA REPRESIÓN MOLECULAR DE AHR.....	132
5.6.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias.....	132
5.6.2. Estudio de variables anatomopatológicas.....	133
5.6.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la represión molecular de AhR.....	135
5.7. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA REPRESIÓN MOLECULAR DE β -CATENINA.....	136
5.7.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias.....	136
5.7.2. Estudio de variables anatomopatológicas.....	137

5.7.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la represión molecular de Beta- catenina.....	138
5.8. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA REPRESIÓN MOLECULAR DE YAP.....	140
5.8.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias	140
5.8.2. Estudio de variables anatomopatológicas	141
5.8.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la represión molecular de YAP	142
5.9. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA REPRESIÓN MOLECULAR DE TAZ	144
5.9.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias.....	144
5.9.2. Estudio de variables anatomopatológicas.....	145
5.9.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la represión molecular de TAZ.....	146
5.10. ANÁLISIS DE FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SUPERVIVENCIA GLOBAL	148
5.11. ANÁLISIS DE FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD	149
5.11.1. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos, anatomopatológicos y moleculares que influyen en la Supervivencia Libre de Enfermedad	149
5.11.2. Análisis combinado del índice Neutrófilos/Linfocitos y la sobreexpresión de β -catenina con respecto a la Supervivencia Libre de Enfermedad.....	150
DISCUSIÓN	153
6.1. RELACIÓN ENTRE EL GRADO DE DIFERENCIACIÓN TUMORAL Y LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE AHR.....	155
6.2. RELACIÓN ENTRE EL TAMAÑO TUMORAL Y LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE β -CATENINA.....	157
6.3. RELACIÓN ENTRE LA INFECCIÓN VÍRICA ACTIVA Y LA SOBREENPRESIÓN	

MOLECULAR DE β -CATENINA.....	158
6.4. RELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE NEUTRÓFILOS/LINFOCITOS Y LA EXPRESIÓN DE β -CATENINA.....	159
6.5. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE TAZ Y LAS VARIABLES ESTUDIADAS	161
6.6. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO DE LA INVESTIGACIÓN	163
CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA.....	169
ANEXOS	183
9.1. ANEXO I. TABLA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS	185
9.2. ANEXO II. TABLA DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS	185

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Algoritmo de estadificación y tratamiento BCLC	64
Figura 2: Tratamientos propuestos por la EASL-EORTC (guía 2012) en función del grado de recomendación y de evidencia científica.....	67
Figura 3: Algoritmo de valuación del riesgo de descompensación hepática después de una RH para hepatocarcinomas sobre cirrosis hepática, en función la hipertensión portal, la RH y la función hepática.....	69
Figura 4: Algoritmo terapéutico con TACE para el manejo del CHC en estadio temprano, intermedio y avanzado.....	74
Figura 5: Mecanismos de acción entre TACE Y TARE	75
Figura 6: Algoritmo diagnóstico para el CHC propuesto por el grupo BCLC.....	89
Figura 7: División hepática de primer orden según la “Terminología de anatomía y resecciones hepáticas” del consenso de Brisbane	94
Figura 8: Material utilizado para la recogida de muestras biológicas. Recipientes de poliesterino con RNAlater y hoja de bisturí n°36	99
Figura 9: Secuencia de extracción de muestras biológicas de la pieza quirúrgica.....	100
Figura 10: Material utilizado para la conservación de muestras biológicas.....	100
Figura 11: Diagrama de flujo del estudio.....	107
Figura 12: Distribución por sexos de los pacientes del estudio.....	108
Figura 13: Serología vírica presente en los pacientes del estudio	108
Figura 14: Tipo de tratamiento quirúrgico.....	109
Figura 15: Tipo de resección quirúrgica.....	109
Figura 16: Pacientes que han precisado transfusión de hemoderivados.....	110
Figura 17: Tipo de complicaciones postquirúrgicas (Clasificación Clavien- Dindo).....	110
Figura 18: Grado de diferenciación tumoral de los hepatocarcinomas reseca- dos	111

Figura 19: Invasión vascular en los hepatocarcinomas resecados.....	112
Figura 20: Curva Kaplan- Meier de la SLE de los pacientes del estudio	112
Figura 21: Localización de la recidiva tumoral	113
Figura 22: Tratamiento empleado en los casos con recidiva hepática.....	113
Figura 23: Curva Kaplan- Meier de la SG de los pacientes del estudio.....	114
Figura 24: Expresión de los marcadores moleculares en los hepatocarcinomas del estudio	115
Figura 25: Curva Kaplan- Meier de la SLE con respecto a la sobreexpresión molecular de β - catenina	150
Figura 26: Curva Kaplan- Meier de la SLE con respecto a la variable combinada Sobreexpresión Beta- catenina y el INL.....	151

ÍNDICE DE TABLAS

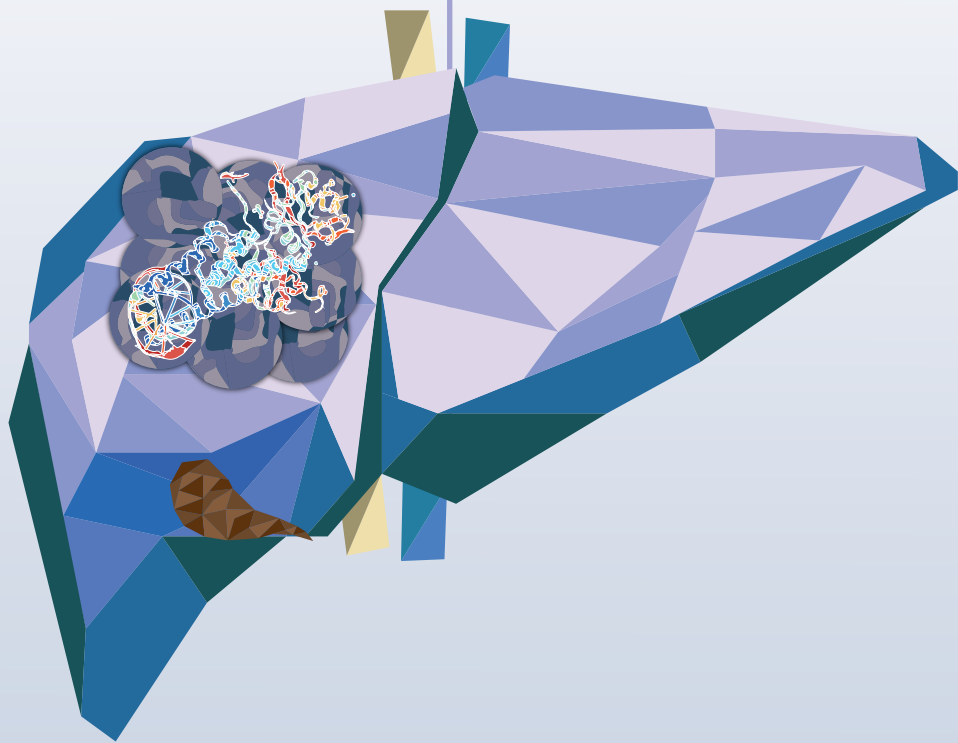
Tabla 1: Score PAGE-B. La puntuación varía de 0 a 25. Riesgo bajo ≤ 9 , intermedio (10- 17), alto ≥ 18	46
Tabla 2: LI-RADS versión 2018. Threshold growth: crecimiento del nódulo $\geq 50\%$ en un periodo ≤ 6 meses.....	48
Tabla 3: 8ª edición Sistema de estadificación de AJCC para el CHC.....	59
Tabla 4: Criterios extendidos para el TH en el CHC	70
Tabla 5: Clasificación de complicaciones quirúrgicas Clavien- Dindo.....	95
Tabla 6: 8ª edición Sistema de estratificación de AJCC para el CHCv	98
Tabla 7: Expresión de los marcadores moleculares en los hepatocarcinomas del estudio.....	115
Tabla 8: Variables clínico- epidemiológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de AhR	116
Tabla 9: Valores analíticos relacionados con la sobreexpresión molecular de AhR.....	117
Tabla 10: Variables anatomopatológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de AhR.	118
Tabla 11: Variable grado de diferenciación combinada en relación con la sobreexpresión molecular de AhR.....	119
Tabla 12: Variables clínico- epidemiológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de β - catenina.....	120
Tabla 13: Valores analíticos relacionadas con la sobreexpresión molecular de β - catenina.....	121
Tabla 14: Variables anatomopatológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de β - catenina.	122
Tabla 15: Variables clínico- epidemiológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de YAP.....	124
Tabla 16: Valores analíticos relacionadas con la sobreexpresión molecular de	

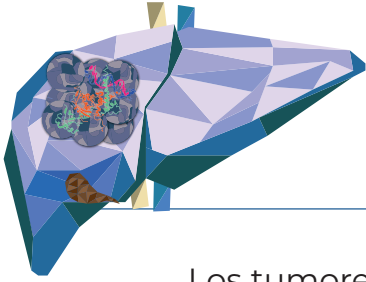
YAP	125
Tabla 17: Variables anatomopatológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de YAP.	126
Tabla 18: Variables clínico- epidemiológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de TAZ.....	128
Tabla 19: Valores analíticos relacionadas con la sobreexpresión molecular de TAZ.....	129
Tabla 20: Variables anatomopatológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de TAZ.....	130
Tabla 21: Variables clínico- epidemiológicas relacionadas con la represión molecular de AhR	132
Tabla 22: Valores analíticos relacionadas con la represión molecular de AhR	133
Tabla 23: Variables anatomopatológicas relacionadas con la represión molecular de AhR.	135
Tabla 24: Variables clínico-epidemiológicas relacionadas con la represión molecular de β - catenina	136
Tabla 25: Valores analíticos relacionadas con la represión molecular de β - catenina.....	137
Tabla 26: Variables anatomopatológicas relacionadas con la represión molecular de β - catenina	138
Tabla 27: Variables clínico-epidemiológicas relacionadas con la represión molecular de YAP.....	140
Tabla 28: Valores analíticos relacionadas con la represión molecular de YAP	141
Tabla 29: Variables anatomopatológicas relacionadas con la represión molecular de YAP	142
Tabla 30: Variables clínico- epidemiológicas relacionadas con la represión molecular de TAZ.....	144
Tabla 31: Valores analíticos relacionadas con la represión molecular de TAZ....	145
Tabla 32: Variables anatomopatológicas relacionadas con la represión molecular de TAZ	146

Tabla 33: Tabla resumen de la expresión molecular en relación con las variables estudiadas tras el análisis multivariante147

Tabla 34: Tabla que recoge el tiempo medio y el porcentaje de SLE al año a los 3 años y a los 5 años por grupos de la variable combinada Sobreexpresión β - catenina y el INL 151

1. INTRODUCCIÓN





INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTO

Los tumores primarios hepáticos malignos pueden desarrollarse a partir de diferentes componentes del hígado, a partir de los hepatocitos, del epitelio de la vía biliar, de las células neuroendocrinas, células endoteliales, células mesenquimales o de la combinación de ellas [1]. En el caso del hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (CHC/ HCC), se trata de un tumor de origen epitelial que surge a partir de la acción de diferentes carcinógenos sobre el hepatocito, provocando una proliferación celular anormal de este.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer hepático es el sexto cáncer más comúnmente diagnosticado y fue la cuarta causa de muerte por cáncer en todo el mundo en 2018, con alrededor de 841.000 casos nuevos y 782.000 muertes anuales. El CHC comprende entre el 75- 85% de esta patología [2], por tanto, hablar de la epidemiología del cáncer hepático es prácticamente equivalente a hablar de la epidemiología del CHC.

1.2.1. Variabilidad epidemiológica según el sexo y la edad

Las tasas de incidencia y mortalidad son de 2 a 3 veces más altas entre los varones en la mayoría de las regiones del mundo, ocupando el quinto lugar en términos de incidencia global y el segundo en términos de mortalidad en varones [2].

La mayor disparidad de género en la incidencia se produce en los países de Europa Central, donde algunos registros tienen tasas entre los hombres cuatro a cinco veces más altas que las tasas entre las mujeres. La disparidad de género en dichas tasas no se comprende bien, aunque la mayoría de los factores de riesgo de cáncer de hígado son más prevalentes en hombres que en mujeres. También se ha planteado la hipótesis de que las diferencias en las hormonas esteroides sexuales, las respuestas inmunitarias y la epigenética podrían estar relacionadas con las tasas más altas en este sexo [3].

La edad de aparición del CHC varía en diferentes partes del mundo. Aparece por encima de los 60 años en países como Japón, América del Norte y países europeos. Por el contrario, en partes de Asia y la mayoría de los países africanos, el

CHC se diagnostica comúnmente en el rango de edad de 30 a 60 años [4]. El estudio BRIDGE mostró que la edad media al momento del diagnóstico del CHC era de 69, 65 y 62 años en Japón, Europa y América del Norte, respectivamente, mientras que de 52, 57 y 61 años en China, Corea del Sur y Taiwan, respectivamente [5].

1.2.2. Variabilidad epidemiológica según la distribución geográfica

La variación de la incidencia y prevalencia del CHC en función de la zona geográfica es el resultado de la diferente exposición a los factores de riesgo [5]. Por ello, las tasas de incidencia más altas se observan principalmente en entornos con un nivel socioeconómico pobremente desarrollado, siendo más frecuente en los países localizados al norte y occidente de África (Egipto, Gambia, Guinea) y al oriente y sur de Asia (Mongolia, Camboya y Vietnam). Entre los determinantes clave se encuentran la infección crónica por virus de la hepatitis B (VHB) y la exposición a aflatoxinas; en el caso de Mongolia, el virus VHB y el de la hepatitis C (VHC), y las coinfecciones de portadores de VHB con VHC o con el de la hepatitis D (VHD), así como el abuso de alcohol, contribuyen también a la alta carga tumoral [2,3].

Por el contrario, la incidencia ha disminuido en otros países asiáticos como China y Japón, así como en España e Italia, probablemente debido a la implementación de programas de salud pública destinados al control de la exposición a factores de riesgo que se relacionan con esta enfermedad. No obstante, la creciente prevalencia de obesidad y diabetes en el mundo ha contribuido a que en áreas de bajo riesgo de CHC, como Europa y América del Norte, se haya observado una creciente incidencia de las enfermedades del hígado graso no alcohólico como inductor significativo a la etiología del CHC [2,3,5].

1.3. FACTORES DE RIESGO Y PATOGENIA DEL HEPATOCARCINOMA

1.3.1. Lesiones premalignas

1.3.1.1. Cirrosis

La cirrosis es el factor de riesgo más importante para el CHC, considerada una lesión premaligna y un marcador de carcinogénesis de larga evolución mediado por la inflamación crónica y el daño hepático[6].

La cirrosis está presente en el 80-90% de los pacientes con CHC, el riesgo acumulado a los 5 años de desarrollar CHC en pacientes cirróticos oscila entre el 5-30% [7]. Así mismo, este riesgo dependerá de la causa subyacente (la proporción de pacientes con CHC y cirrosis es del 88% y 93% en aquellos que presentan infección por VHB y VHC, respectivamente; en pacientes con hemocromatosis la incidencia a 5 años es del 21% y en pacientes alcohólicos entre el 8-12% [8]), de la región o la raza (mayor en la población asiática), y del estado de la cirrosis (en los pacientes con cirrosis descompensada la incidencia anual de CHC varía entre el 1-4% y la incidencia acumulada a los 5 años entre el 5-30% [9]).

1.3.1.2. Nódulos displásicos

El CHC que surge en el hígado cirrótico suele estar precedido de lesiones precancerosas no malignas como nódulos regenerativos/nódulos displásicos de alto y bajo grado. La prevalencia de malignidad de estas lesiones precancerosas depende en gran medida del tamaño de la lesión y de su grado de displasia. Lesiones inferiores a 1 cm no suelen ser malignas mientras que la mayoría de los nódulos que superan los 2 cm son hepatocarcinomas [10]. Así mismo, los nódulos displásicos de alto grado son considerados los verdaderos precursores del CHC, mientras que se cree que los nódulos restantes sólo participan marginalmente en la carcinogénesis hepática [11].

Existen varios estudios al respecto. En el de Borzio et al., durante un seguimiento de 33 meses de pacientes con cirrosis, 28 de 90 nódulos (31%) se transformaron en CHC, con una tasa de transformación maligna de 3.5, 15.5, 31 y 48.5% a 1, 2, 3 y 5 años, respectivamente; siendo los nódulos displásicos de alto grado un predictor independiente para el desarrollo de CHC (RR, 2.4; IC 95% 1.1-5.8) [11]. En el estudio de Kobayashi et al., que realiza un seguimiento en una serie de 154 pacientes que presentaban nódulos hepáticos; 29 de ellos (18.8%) progresaron a CHC durante un seguimiento medio de 2.8 años; siendo el riesgo de degeneración

neoplásica mayor en los nódulos displásicos de alto grado (46.2%, 61.5%, 80.8% a 1, 3 y 5 años, respectivamente) que en los de bajo grado (2.6%, 30.2%, 36.6% a 1, 3 y 5 años, respectivamente) y con los nódulos de regeneración (3.3%, 9.7%, 12.4% a 1, 3 y 5 años, respectivamente), Log-rank $p < 0.0001$ [12].

1.3.2. Enfermedad hepática de origen vírico

1.3.2.1. Hepatitis crónica por VHB

El VHB es en sí mismo carcinogénico, dada la existencia de pacientes con CHC y VHB sin cirrosis asociada[9]; es, además, el factor de riesgo más frecuente para el desarrollo de CHC a nivel mundial [13].

Aproximadamente entre el 15-40% de los pacientes infectados por VHB desarrollarán cirrosis, fallo hepático o CHC [14] y en torno al 70-80% de los pacientes con VHB y CHC presentan cirrosis hepática [7].

La relación existente entre el CHC y la infección por VHB se produce como consecuencia de la acción de proteínas víricas con propiedades oncogénicas o bien debido a la integración del genoma vírico en el genoma del huésped provocando la consiguiente activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores [15].

A pesar de que en la mayoría de los casos de infección por VHB y CHC éste se presenta en pacientes cirróticos, puede desarrollarse también en pacientes sin cirrosis hepática. El riesgo se ve incrementado en aquellos pacientes con infección crónica por VHB (aquellos que presentan el antígeno de superficie del virus [HBsAg]), en varones o ancianos, en aquellos con antecedentes familiares de CHC, por exposición a aflatoxinas, por consumo habitual de alcohol o tabaco, que hayan sido coinfectados por VHC o VHD, en aquellos con niveles de replicación del VHB elevados (indicado por los niveles de VHB-DNA y por la presencia de antígeno "e" del VHB (HBeAg) [16]) o en los que estén infectados por el VHB genotipo C [7].

1.3.2.2. Hepatitis crónica por VHC

Aproximadamente el 70% (intervalo 55-85%) de las personas infectadas por el VHC desarrollarán una infección crónica. En ellas, el riesgo de desarrollar cirrosis oscila entre el 15% y el 30% en los 20 años siguientes [17]. Una vez que se establece la cirrosis relacionada con VHC, el CHC se desarrolla con una incidencia anual del 1-8% (media de 3.5%) [8]. A pesar de que es raro que esta neoplasia se desarrolle en pacientes VHC sin cirrosis, cuando lo hace, lo es en estados de fibrosis hepática avanzada [8].

La etiopatogenia del VHC para el desarrollo del CHC se debe a mecanismos directos e indirectos. Por un lado, de forma directa, las proteínas virales interactúan con ciertas vías de señalización para deshabilitar la respuesta inmune innata y con las proteínas celulares para facilitar la entrada del virus, la traducción y síntesis de proteínas, la síntesis del ácido ribonucleico (ARN) genómico viral y el ensamblaje y liberación de los virus infecciosos, teniendo alguna de estas proteínas celulares papeles importantes en el control de la proliferación celular y en la supresión de tumores. Por otro lado, de forma indirecta, el VHC induce un estado proinflamatorio y de estrés oxidativo que lleva a una inflamación hepática crónica y consecuentemente a fibrosis, contribuyendo así a la proliferación de hepatocitos modificados [18].

A pesar de la capacidad del VHC para ser un factor independiente para el desarrollo del CHC, su riesgo se ve incrementado en pacientes que contraen la infección en edad avanzada, en varones, por la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o VHB y, probablemente, en pacientes diabéticos y obesos [7]. Así mismo, el consumo de alcohol, a pesar de ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de CHC, cuando está combinado con la infección por VHC o VHB, eleva el riesgo de desarrollar este tipo tumoral de 1.5 a 2 veces [19].

1.3.2.3. Hepatitis crónica por coinfección VHB y VHC

El aumento del riesgo de CHC por infección dual puede deberse a la necro-inflamación crónica del hígado como consecuencia de la respuesta repetitiva del sistema inmune contra la infección por VHC y VHB conduciendo, por tanto, a la transformación maligna de los hepatocitos como resultado de procesos sostenidos de muerte y de regeneración celular. Además del mecanismo común, el ADN (Ácido desoxirribonucleico) del VHB puede integrarse en el genoma humano y puede iniciar un proceso de hepatocarcinogénesis, lo que permite al VHB transformar los hepatocitos incluso en ausencia de inflamación crónica [20].

Los estudios epidemiológicos sobre la interacción viral son inconsistentes. En el metaanálisis llevado a cabo por Cho et al., que incluye 59 estudios que evalúan la coinfección VHB y VHC, se observa un efecto subaditivo (efecto sumatorio menor que la suma de las estimaciones puntuales de OR para cada mono infección) sobre el riesgo de CHC en los estudios publicados entre 2000-2009, en los estudios de cohortes y en aquellas áreas geográficas con infección endémica por VHB. Por el contrario, presentaron un efecto aditivo (el efecto sumatorio es igual a la suma de las estimaciones de OR para cada mono infección) en aquellos publicados entre 1985-1999, en estudios de casos y controles y en estudios realizados en áreas donde la infección por VHC era prevalente. Estos estudios sugieren que

sería razonable observar un efecto subaditivo ya que la sobreinfección por un virus tiende a inhibir la infección por el otro virus entre los casos coinfectados [21].

Por otro lado, el estudio de cohortes prospectivas taiwanesas de Huang et al., diseñado para conocer el riesgo de desarrollar CHC en pacientes con edades comprendidas entre los 30-75 años con infección por VHC y VHB, muestra una incidencia de 38.35% en hombres y de 27.40% en mujeres en aquellos pacientes con coinfección vírica, siendo el riesgo de desarrollar CHC mayor en aquellos que presentaban una infección dual de 19.4 (IC 95% 12.9-29.4) con respecto a la mono infección por VHB de 12.9 (IC 95% 10.2- 16.5) o por VHC de 10.3 (IC 95% 7.6- 13.9), especialmente en mujeres pero sin efecto multiplicativo [22].

1.3.2.4. Hepatitis crónica por VHD

El VHD es un virus de ARN defectuoso que requiere la función auxiliar del VHB para el ensamblaje viral y la transmisión in vivo, es altamente patógeno y causa la forma menos común de la enfermedad. No obstante, es la forma más grave y de progresión más rápida de hepatitis viral crónica, que conduce a cirrosis en aproximadamente el 80% de los casos dentro de los 10 años. La cirrosis relacionada con el VHD puede ser una enfermedad estable durante muchos años, pero una alta proporción de pacientes finalmente muere por descompensación hepática o por CHC, a menos que se sometan a un trasplante hepático (TH). Sin embargo, la proporción de pacientes que desarrollarán cada una de estas complicaciones a largo plazo sigue siendo incierta debido a la falta de grandes estudios prospectivos sobre la historia natural de este virus [23].

En el estudio de Ji et al. se objetivó que el riesgo de CHC aumentó considerablemente en pacientes con infección aguda o crónica por VHD (RDI= 137.17, IC 95% 62.19-261.51 vs RDI=99.26, IC del 95% 42.39-196.55, respectivamente) en relación a la población general. Así mismo, utilizando como grupo de referencia a los pacientes con infección crónica por VHB, el riesgo de CHC se mantuvo elevado tanto para el grupo con infección aguda como para el de infección crónica por VHD (RDI= 6.11, IC del 95% 2.77-11.65 vs RDI=3.90, IC del 95% 1.61-7.22), indicando que el incremento en la razón de densidades de incidencia de VHD es independiente de la infección por VHB y, por tanto, que el VHD es un factor de riesgo en sí mismo para el desarrollo de CHC [24].

1.3.3. Enfermedad alcohólica del hígado

El consumo de alcohol ha sido reconocido como factor de riesgo para el desarrollo del CHC, bien por mecanismos indirectos como es el desarrollo de cirrosis o por mecanismos directos dada su capacidad genotóxica.

El modelo de carcinogénesis hepática propuesto por Donato et al. muestra que la ingesta de alcohol a largo plazo causa la inducción de la enzima Citocromo P450 2E1 (CYP2E1), lo que resulta en un aumento de la producción de acetaldehído a nivel hepático tras la metabolización del etanol, el cual es capaz de inhibir los mecanismos de apoptosis así como el sistema de reparación del ADN. Por otro lado, se produce un aumento del estrés oxidativo hepático debida a la producción de especies reactivas del oxígeno y de radicales hidroxietilo, capaces de formar aductos de proteínas de ADN y de reaccionar con las moléculas de lípidos ubicadas en la membrana celular, lo que provoca daño en el ADN celular [25].

Asumiendo que una bebida alcohólica estándar contiene en torno a 13.7g de alcohol, un consumo moderado se define como una ingesta menor de 3 bebidas alcohólicas/día (<40 g de alcohol) considerándose un consumo abusivo el que es igual o superior a 3 bebidas alcohólicas/día (40-60 g de alcohol) [9]. Varios estudios muestran una relación directa entre la dosis de alcohol ingerida y el riesgo de desarrollar CHC, teniendo una mayor susceptibilidad el sexo femenino a menores dosis de alcohol.

Turati et al. mostraron en su metaanálisis un aumento significativo del 16% en el riesgo CHC entre los bebedores con un consumo abusivo y del 22% en aquellos con un consumo de más de 6 bebidas alcohólicas/día (consumo nocivo) en comparación con los no bebedores, no encontrando un mayor riesgo en los bebedores de nivel moderado [26]. Por otro lado, en el metaanálisis de Gutjahr et al. se observó que los riesgos relativos de CHC para un consumo moderado, abusivo y nocivo de alcohol fueron de 1.45, 3.03 y 3.60, respectivamente y para ambos sexos en comparación con los no bebedores. Las dosis consideradas como moderada, abusiva y nociva para el sexo femenino se establecieron en <20 g de alcohol, 20-40 g de alcohol y >40 g de alcohol, respectivamente [27].

En cuanto al planteamiento de si la interrupción de la ingesta de alcohol disminuye el riesgo de desarrollar CHC, el metaanálisis presentado por Heckey et al. estima que el riesgo de CHC disminuye tras el cese de la ingesta de alcohol de 6-7% por año; siendo necesario un periodo estimado de 23 años después de abandonar el consumo de alcohol (IC 95% 14-70 años) para que el riesgo de cáncer hepático se iguale al de los abstemios [28].

Así mismo, se ha observado una correlación importante entre la ingesta

de alcohol (50-80 g/día) y la infección por virus hepatótrofos (VHB y VHC) y Diabetes Mellitus, existiendo un incremento en el riesgo para el desarrollo de CHC cuando el alcohol se combinaba con estos otros factores. En casos en los que el consumo de alcohol sea >80 g/día, y exista una infección crónica por VHB o VHC, se ha objetivado una OR para el desarrollo de CHC de 53.9 (alcohol solo OR= 2.4, virus solo OR= 19.1). Si estas cifras de consumo se establecen junto con la presencia de diabetes (tanto dependientes de insulina como no dependientes de insulina) se ha objetivado una OR de 9.9 para el desarrollo de CHC (diabetes solo OR= 2.4) [29].

De igual forma, se ha sugerido la existencia de un cierto sinergismo entre el consumo de alcohol y la obesidad; en este caso, el riesgo de incidencia de CHC es de 3.1 veces mayor en consumidores de alcohol (95% IC, 1.1-8.3) que tienen un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 30 kg/m² en comparación con los abstemios que presenten un IMC menor de 30 kg/m² [30].

1.3.4. Enfermedad del hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) incluye un espectro de enfermedades hepáticas que varía desde la esteatosis simple, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) caracterizada por inflamación hasta la fibrosis relacionada con la EHNA que conduce a cirrosis hepática [9]. Sin embargo, varios estudios han evidenciado el desarrollo de CHC en pacientes con EHGNA en ausencia de cirrosis: Mittal S. et al., en su estudio de cohorte retrospectiva, observó que hasta el 13% de los pacientes con CHC no presentaban evidencia de cirrosis en el momento del diagnóstico, siendo los únicos factores de riesgo la EHGNA o el síndrome metabólico [31].

La prevalencia de EHGNA se estima entre el 10-35% de la población; sin embargo, esta incidencia varía en función de la población en estudio así como del método diagnóstico utilizado [32].

Por otro lado, el riesgo de CHC en pacientes diagnosticados de EHGNA o EHNA no está claramente establecido [9]. No obstante, la EHGNA es más frecuente en cohortes con una afectación metabólica preexistente, asociándose por tanto a Diabetes Mellitus tipo II, obesidad e hipertrigliceridemia. Sin embargo, a pesar de que estos factores de riesgo para el desarrollo de EHNA pueden contribuir al desarrollo de CHC (OR para CHC si se ha establecido previamente el diagnóstico de síndrome metabólico es de 2.58 (IC 95% 2.40-2.76), en el estudio de T. Welzel et al. [33]), la patogénesis exacta por la que los pacientes con EHNA desarrollan CHC es desconocida [32], porque si bien puede deberse a la cirrosis desarrollada en fases avanzadas, existen estudios donde ésta no está presente.

1.3.5. Ingesta de aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Las condiciones favorables para la contaminación natural de alimentos por aflatoxinas se producen en latitudes entre 40° N y 40° S del ecuador bajo condiciones de altas temperaturas y humedad ambiental durante la producción, cosecha, almacenamiento y procesamiento de alimentos como el maíz, los cacahuetes y la soja. Las aflatoxinas son consideradas por tanto un contaminante común, sobre todo en las dietas básicas de los países en desarrollo [9,34].

Las cuatro aflatoxinas principales son las aflatoxinas B1 (AFB1), B2, G1 y G2, donde la aflatoxina B1 es la que con mayor frecuencia se encuentra en los alimentos de consumo humano contaminados y la que mayor potencial hepatocarcinogénico presenta [35].

El riesgo de cáncer debido a la exposición a las diversas formas de aflatoxina está bien establecido y se basa en la dosis acumulada a lo largo de la vida. Dos factores principales, la aflatoxina y el VHB, que ocurren comúnmente en las mismas poblaciones, influyen en el riesgo de padecer cáncer de hígado. La acción sinérgica de estos dos factores aumenta el riesgo de cáncer entre 25 y 30 veces. El mecanismo sugerido para esta sinergia es que la aflatoxina suprime los mecanismos de reparación del ADN que ayudan a limitar el desarrollo del cáncer por el VHB y el VHB evita la detoxificación de las mismas. También es posible que la inmunotoxicidad de la aflatoxina interfiera con los mecanismos de supresión del cáncer [34].

Chu Y. et al., en su estudio de casos y controles, objetivó que los niveles de AFB1-albúmina detectados en el suero en pacientes con enfermedad crónica de VHB se asociaban significativamente con un mayor riesgo de cirrosis y de CHC dependiente de la dosis de tóxico. La Odds ratio ajustada multivariada con un IC del 95% para los niveles séricos altos vs indetectables de AFB1-albúmina fue de 2.45 (1.51-3.98) para cirrosis, 5.47 (2.20-13.63) para CHC cirrótico y 5.39 (1.11-26.18) para CHC no cirrótico [36]. Estos resultados sugieren que AFB1 no sólo puede aumentar el riesgo de cirrosis, sino que también participa en la etiología de la hepatocarcinogénesis.

1.3.6. Susceptibilidad genética

Existen varios trastornos hereditarios que se han asociado con un mayor riesgo de CHC.

1.3.6.1. Hemocromatosis hereditaria

La hemocromatosis es un trastorno hereditario, con un patrón de herencia autosómico recesivo, que se caracteriza por una excesiva absorción gastrointestinal de hierro. Este exceso de hierro se deposita, entre otros órganos, en el parénquima hepático, pudiendo provocar cirrosis con el tiempo [13,37].

En el estudio de Elmerberg et al. se ha objetivado un incremento de 20 veces el riesgo de cáncer hepático en esta población (RDI= 21, IC 95% 16-27), correspondiendo el 79% con CHC [37]. Por otro lado, en el estudio prospectivo de Fracanzani et al. se observó que el riesgo relativo (RR) para desarrollar neoplasias hepáticas fue significativamente mayor en los pacientes con hemocromatosis hereditaria (RR= 1.8, IC 95% 1.1-2.9) en comparación con los pacientes que presentaban hepatopatía crónica no relacionada con el metabolismo del hierro. Así mismo, en el análisis multivariante tras haber sido ajustado para consumo de alcohol, tabaco e historia familiar de cáncer, el riesgo para desarrollar cáncer fue mayor en los pacientes con hemocromatosis (RR= 1.9, IC 95% 1.1-3.1), lo que sugiere que la hemocromatosis, per se, es un factor de riesgo que contribuye al desarrollo de neoplasias tanto hepáticas como extrahepáticas en estos pacientes [38].

En el estudio de Ji et al. se objetivó que el riesgo de CHC aumentó considerablemente en pacientes con infección aguda o crónica por VHD (RDI= 137.17, IC 95% 62.19-261.51 vs RDI=99.26, IC del 95% 42.39-196.55, respectivamente) en relación a la población general. Así mismo, utilizando como grupo de referencia a los pacientes con infección crónica por VHB, el riesgo de CHC se mantuvo elevado tanto para el grupo con infección aguda como para el de infección crónica por VHD (RDI= 6.11, IC del 95% 2.77-11.65 vs RDI=3.90, IC del 95% 1.61-7.22), indicando que el incremento en la razón de densidades de incidencia de VHD es independiente de la infección por VHB y, por tanto, que el VHD es un factor de riesgo en sí mismo para el desarrollo de CHC [24].

1.3.6.2. Enfermedad de Wilson

La enfermedad de Wilson es un trastorno autosómico recesivo del metabolismo del cobre y se ha atribuido a mutaciones en el gen *ATP7B* ubicado en el brazo largo del cromosoma 13.6. La proteína *ATP7B* defectuosa da como resultado alteraciones en la excreción de cobre en la bilis y conduce a la acumulación y depósito del cobre a nivel hepático y extrahepático [39].

Las neoplasias intraabdominales en relación con la Enfermedad de Wilson, como es el caso del CHC, han sido descritas en la bibliografía. Sin embargo, el riesgo para desarrollar la enfermedad de Wilson es relativamente bajo, menor del 1%, como lo demuestra el estudio de Walshe et al., en el que, tras hacer un seguimiento a 363 pacientes de esta enfermedad, desarrollaron CHC 2 pacientes (0.5%) a los 31 y 38 años después del diagnóstico inicial, presentando ambos casos cirrosis subyacente [40].

1.3.6.3. Déficit α -1 antitripsina

El déficit de alfa-1 antitripsina (A1AT) es una enfermedad autosómica dominante en la que la mutación del gen que la codifica promueve su polimerización intrahepatocitaria, atrapando así A1AT en el retículo endoplásmico de los hepatocitos y provocando que los niveles séricos de A1AT sean bajos. La acumulación de A1AT en el hígado desencadena la apoptosis de las células hepáticas y la regeneración hepatocelular crónica [41]. Este proceso de regeneración crónica conlleva el desarrollo de fibrosis, cirrosis y CHC. Con esta premisa, el estudio de Antoury et al. consistió en valorar la asociación entre el déficit de A1AT y el CHC en pacientes con enfermedad hepática avanzada, observándose una tasa de incidencia del 8.5% para el desarrollo de CHC en comparación con el 31.1% en pacientes que presentaron otra causa de hepatopatía ($p=0.001$). Al comparar la tasa de incidencia de CHC por subgrupos, la mayor tasa de incidencia acumulada se encontró en sujetos con VHC (2.7%/año), siendo la tasa más baja en pacientes con cirrosis y con déficit de A1AT (0.88%/año) ($p < 0,001$) [41].

1.3.6.4. Porfiria

Tanto la porfiria aguda intermitente como la porfiria cutánea tarda son trastornos que provocan una deficiencia enzimática responsable de la biosíntesis del grupo hemo [13].

En la revisión realizada por Stewart de pequeños estudios retrospectivos y prospectivos de cohortes, los pacientes con porfiria que son diagnosticados de CHC son pocos, variando su incidencia de 0-33%; así mismo, en algunos de estos estudios no se han considerado factores de confusión como el alcohol o las hepa-

titis víricas [42].

1.3.7. Otros factores de riesgo

1.3.7.1. Obesidad

Los cambios metabólicos que acompañan al exceso de peso corporal, como EGHNA, EHNA y la diabetes mellitus tipo 2, pueden contribuir a la patogénesis del CHC [9]. El 30-40% de la población de países del oeste, diagnosticada de CHC, no presenta infección crónica por VHB o VHC, sugiriendo la implicación de otras causas de enfermedad; algunos de estos pacientes tenían más probabilidades de tener características clínicas o bioquímicas de EGHNA (obesidad) o del síndrome metabólico [7].

Son diversos los estudios que relacionan la obesidad con el CHC, a pesar de que algunos de ellos presentan limitaciones particularmente relacionadas con la ausencia de datos sobre la presencia de cofactores de daño hepático. En el metaanálisis llevado a cabo por Gupta A. et al. se objetiva que los individuos obesos diagnosticados de CHC presentaban una mortalidad casi 2 veces mayor en comparación con los que no presentaban obesidad HR 1.96 (IC 95% 1.46-2.46), siendo más evidente en las poblaciones del oeste HR 2.10 (IC 95% 1.77-2.48) que en las poblaciones asiáticas [43].

Así mismo, la obesidad supone un importante factor de riesgo sumatorio en aquellos pacientes que ya presentan enfermedad hepática de base, tal como refleja el estudio prospectivo de Chen C. et al., donde la obesidad central y la obesidad extrema ($IMC \geq 30$ kg/m²) se asociaron de forma independiente con un riesgo 2 y 4 veces mayor para CHC en los sujetos seropositivos al VHC, respectivamente (RR: 4.13, IC 95% 1.38- 12.4), en comparación con aquellos que no presentaban la infección de base [44].

No solamente se ha identificado la obesidad en la población adulta como riesgo para el desarrollo de CHC. La obesidad infantil, en el estudio de cohortes retrospectivas de Berentzen T. et al., presenta una asociación positiva con el riesgo de desarrollar cáncer en la edad adulta, observándose a los 7 y 13 años de edad una HR para el cáncer de hígado de 1.19 (1.04-1.38) y de 1.36 (1.17-1.58), respectivamente, por cada unidad que aumenta el IMC z-score [45].

1.3.7.2. Diabetes Mellitus tipo 2

La Diabetes Mellitus tipo 2, como se ha señalado anteriormente, forma parte del síndrome metabólico que se caracteriza por resistencia a la insulina y que predispone a la enfermedad de hígado graso no alcohólico [46], identificándose como factor independiente para la progresión hacia formas más avanzadas de dicha enfermedad [47].

En el metaanálisis realizado por El-Serag et al. sobre la asociación entre diabetes y CHC, los autores señalan que la diabetes tipo 2 está asociada con un aumento de aproximadamente 2.5 veces el riesgo de CHC, fortaleciéndose esta asociación en los pacientes que presentaban diabetes de más de 10 años de evolución [46].

El mecanismo por el cual la diabetes mellitus tipo 2 aumenta el riesgo de CHC sigue sin estar claro a día de hoy [9]. Sin embargo, parece que los niveles elevados de insulina, causados por la resistencia a esta hormona en la grasa, el hígado y el tejido muscular pueden explicar, en parte, este hecho. La hiperinsulinemia puede aumentar el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), que a su vez estimula la proliferación de células hepáticas, además de producir un aumento de la secreción de proteínas de la matriz y de otros precursores de la fibrosis hepática por las células estrelladas hepáticas, así como disminuir la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, que se asocia con lesiones hepatocelulares, inflamación y fibrosis hepática. Por otro lado, la resistencia a la insulina se asocia de forma independiente con la progresión de la fibrosis hepática, que es un factor de riesgo para el CHC [48].

Así mismo, la diabetes mellitus puede establecer sinergismo con otros factores de riesgo como la hepatitis vírica o el consumo de alcohol, favoreciendo de esta manera la hepatocarcinogénesis. Desde el punto de vista de la hepatitis vírica, el estudio prospectivo de Chen C. et al. muestra un RR para el desarrollo de CHC de 264.7 (IC 95%, 35.2-1993) para sujetos seropositivos a HBsAg con obesidad y diabetes y de 134.5 (IC 95%, 17.5-1035) para sujetos seropositivos para anticuerpos contra el VHC (anti-VHC) con obesidad y diabetes en comparación con el grupo de referencia que no presentaban infecciones crónicas víricas, sin diabetes y con bajo IMC [44]. En cuanto al consumo de alcohol, ya hemos mencionado anteriormente el estudio de Hassan M. et al. donde la OR para el desarrollo de CHC era de 9.9 cuando se combinaba con el consumo de alcohol y la presencia de diabetes, en comparación con el riesgo que presentaba únicamente el diagnóstico de diabetes (OR=2.4) [29].

En cuanto al tratamiento antidiabético, existen controversias sobre la influencia que este pueda ejercer sobre el desarrollo del CHC. Algunos estudios han

sugerido que la metformina presenta un efecto quimiopreventivo, al contrario que las sulfonilureas y la insulina, esta última utilizada en pacientes diabéticos de larga evolución y habitualmente con comorbilidades asociadas relacionadas con un incremento en la incidencia de CHC [49,50]. No obstante, está por determinar si estas relaciones son causales o están influenciadas por la duración o la gravedad de la propia Diabetes Mellitus o por otros posibles factores de confusión, lo que requerirá la realización de estudios diseñados para tal fin [48].

1.3.7.3. Tabaco

El humo del tabaco contiene varios carcinógenos hepáticos como N-nitrosodimetilamina, 4-amino-bifenilo, arsénico y cloruro de vinilo que pueden contribuir al desarrollo de CHC [9].

La asociación entre el cáncer hepático y el tabaquismo ha sido controvertida debido a la presencia de factores de confusión como el alcohol o las infecciones víricas [3]. Sin embargo, en el metaanálisis de Lee et al., en el que se tienen en cuenta estos posibles factores de confusión, se objetiva que el consumo de tabaco aumenta 1.5 veces el riesgo de desarrollar cáncer hepático. También se observó una tendencia positiva en dosis-respuesta para el número de cigarrillos fumados por día, lo que respalda aún más una asociación causal entre el consumo de cigarrillos y el riesgo de cáncer de hígado [51].

Así mismo, en el estudio prospectivo de Petrick et al. se objetiva que los exfumadores y los fumadores actuales tenían un mayor riesgo de CHC en comparación con los que nunca habían fumado. Fumar más de 25 cigarrillos al día se asoció con un aumento del 55% del riesgo de CHC (IC 95%: 1.30-1.84). Por otro lado, el número de años transcurridos desde el cese del consumo de tabaco se asoció inversamente con el riesgo de CHC ($p= 0.003$), igualándose dicho riesgo en aquellos que habían dejado de fumar desde hacía más de 30 años con los no fumadores [52].

1.4. PROGRAMA DE DETECCIÓN PRECOZ DEL HEPATOCARCINOMA

Los objetivos de los programas de seguimiento y vigilancia precoz son la detección y el tratamiento de la enfermedad en estadios tempranos, que resultan en la consecuente reducción de su mortalidad. Su utilidad y aplicabilidad dependerá de la incidencia de la enfermedad en la población, de la eficiencia y de la disponibilidad de las pruebas diagnósticas, así como de la efectividad de los tratamientos disponibles [53].

Existen múltiples trabajos que avalan la utilidad del programa de cribado para la detección del CHC en población de riesgo. En el ensayo clínico de Zhang et al. se objetivó que un seguimiento combinado de niveles séricos de Alfa-fetoproteína (AFP) y de ecografía cada 6 meses condujo a una reducción del 37% en la mortalidad por CHC en individuos de 35- 59 años con infección por VHB o antecedentes de hepatitis crónica en Shanghai [54]. Por otro lado, el metaanálisis publicado por Singal et al. de 47 estudios con 15.158 pacientes mostró que la vigilancia del CHC se asoció con una mejor detección en estadios precoces (OR 2.08, IC 95% 1.80-2.37), con mejores tasas de tratamiento curativo (OR 2.24, IC 95% 1.99-2.52) así como con una mayor supervivencia (OR 1.90, IC 95% 1.67-2.17) [55].

En el caso del CHC, debido a su incidencia variable en función del área geográfica, existen diferentes recomendaciones en función de la guía clínica que se considere. Por lo general, aunque existen muchos factores de riesgo para el CHC, solo algunos de ellos lo aumentan lo suficiente como para justificar su cribado y vigilancia. Para todas las sociedades médicas, estos factores incluyen la cirrosis causada por VHB y VHC, la cirrosis derivada de otras causas y, en menor medida, un subconjunto de portadores de hepatitis B no cirróticos y de hepatitis C crónica con fibrosis en estadio 3. No está incluida por el momento la EHGNA no cirrótica u otras enfermedades crónicas del hígado, ni tampoco factores de riesgo menores como la edad avanzada, el sexo masculino, el consumo excesivo de alcohol o el tabaquismo [9].

La última guía publicada en 2018 de la Asociación Europea para el estudio del hígado (EASL) recomienda el seguimiento, mediante ecografía abdominal cada 6 meses, de los pacientes cirróticos con un estadio Child-Pugh A o B, y Child-Pugh C cuando se encuentran en espera de un TH; por otro lado, recomiendan el seguimiento en pacientes no cirróticos cuando presenten VHB con un riesgo intermedio/alto de desarrollar CHC de acuerdo con el score PAGE-B para pacientes caucásicos [56] y en pacientes con un grado de fibrosis F3 independientemente de la etiología, según la evaluación del riesgo individual [57].

Tabla 1: Score PAGE-B. La puntuación varía de 0 a 25. Riesgo bajo ≤ 9 , intermedio (10- 17), alto ≥ 18

Age (years)	Gender	Platelets (/mm ³)
16-29: 0	Female: 0	$\geq 200,000$: 0
30-39: 2	Male: 6	100,000-199,999: 6
40-49: 4		$<100,000$: 9
50-59: 6		
60-69: 8		
≥ 70 : 10		

Las recomendaciones previas son similares a las publicadas en 2018 por la Asociación Americana para el estudio de las enfermedades del hígado (AASLD) que propone el seguimiento con ecografía cada 6 meses combinado o no con la determinación de la proteína AFP sérica en los pacientes cirróticos, exceptuando a los pacientes con estadio Child-Pugh C a menos que estén en espera de TH [58].

En el caso de la guía de práctica clínica de Asia y el Pacífico, los pacientes que deben tener un seguimiento son aquellos que se encuentran en el grupo de alto riesgo, es decir, pacientes cirróticos y aquellos que presenten una infección crónica por VHB; el seguimiento de estos pacientes se realizaría mediante la combinación de la determinación de AFP sérica y de ecografía cada 6 meses [59].

1.5. PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS DEL HEPATOCARCINOMA

A día de hoy, el diagnóstico temprano del CHC es factible en el 30-60% de los casos en países desarrollados mediante el uso de pruebas de imagen. Sin embargo, el verdadero reto diagnóstico se plantea en la detección de nódulos inferiores a 2 cm, ya que son difíciles de caracterizar mediante examen radiológico o histopatológico [60]

1.5.1. Procedimientos diagnósticos no invasivos

Las imágenes radiológicas tienen prioridad en la evaluación diagnóstica de pacientes con sospecha de CHC, ya que pueden facilitar el diagnóstico de CHC sin necesidad de una biopsia así como proporcionar una determinación general de la carga tumoral [8]. En la mayoría de los casos, el diagnóstico puede establecerse a partir de pruebas de imagen según las guías establecidas por la AASLD y la EASL [57,58].

1.5.1.1. Tomografía computarizada (TC) y Resonancia Magnética (RM)

La guía EASL recomienda, si existe un nivel de evidencia (NE) alto, que los procedimientos diagnósticos no invasivos deben ser utilizados como único método de elección en los pacientes cirróticos con nódulos ≥ 1 cm, los cuales alcanzan una alta probabilidad de detección precoz del CHC basándose en imágenes obtenidas mediante TC multifásico o RM dinámica con contraste. El patrón radiológico típico del CHC consiste en el hiperrealce en fase arterial con lavado en fase venosa portal o retardada. Para el caso de pacientes no cirróticos, el diagnóstico por imagen no es suficiente y, por tanto, requerirá frecuentemente la biopsia de la lesión.

En cuanto al número de pruebas radiológicas que se deberán realizar para confirmar el diagnóstico, en la última actualización de la EASL de 2018, se establece la realización de no más de una prueba siempre y cuando el nódulo, mayor de 1 cm, presente el patrón radiológico típico; esto es también aplicable para nódulos de 1-2 cm siempre y cuando se realicen en centros de excelencia con equipos radiológicos de alta gama. En el caso de duda diagnóstica, deberá realizarse una segunda prueba radiológica de otra modalidad diferente a la realizada en primer lugar, y en caso de no obtener un patrón radiológico típico, se tiene que proceder a la biopsia de la lesión.

Respecto a la AASLD, el Colegio Americano de Radiología publicó en 2011 una guía sobre como el TC multifásico y la RM deberían de ser realizados, interpretados e informados. Este “Sistema de datos e informes de imágenes hepáticas” (LI-RADS) clasifica las nuevas lesiones en cinco clases según su tamaño, la extensión del intervalo de crecimiento y los patrones de realce tumoral. De esta forma, LI-RADS 1 o 2 corresponden a lesiones benignas, LI-RADS 3 lesiones con baja probabilidad de CHC, LI-RADS 4 a probable CHC y LI-RADS 5 a CHC. Por su parte, LI-RADS M asigna observaciones con características altamente sugestivas o incluso diagnósticas de malignidad, pero no específicas de CHC [61].

Tabla 2: LI-RADS versión 2018. Threshold growth: crecimiento del nódulo $\geq 50\%$ en un periodo ≤ 6 meses

Arterial phase hyperenhancement (APHE)		No APHE		Nonrim APHE		
Observation size (mm)		< 20	≥ 20	< 10	10-19	≥ 20
Count additional major features: • Enhancing “capsule” • Nonperipheral “washout” • Threshold growth	None	LR-3	LR-3	LR-3	LR-3	LR-4
	One	LR-3	LR-4	LR-4	LR-4 / LR-5	LR-5
	\geq Two	LR-4	LR-4	LR-4	LR-5	LR-5



Observations in this cell are categorized based on one additional major feature:
 • LR-4 – if enhancing “capsule”
 • LR-5 – if nonperipheral “washout” **OR** threshold growth

La AASLD, al igual que la EASL, no establece superioridad entre TC o RM, como tampoco sobre el tipo de contraste a utilizar.

En el caso de lesiones < 1 cm las guías recomiendan su seguimiento. Así, la EASL recomienda en primer lugar discutir el caso en un comité multidisciplinar y el seguimiento de la misma durante el primer año en intervalos inferiores a 4 meses mediante ecografía. Por su parte, la AASLD recomienda el seguimiento con ecografía de 3-6 meses acompañado o no de la determinación de AFP.

La guía de práctica clínica de Asia y el Pacífico establece unas recomendaciones similares a la EASL, recomendando como primera línea diagnóstica el uso de TC dinámica, RM dinámica o RM con contraste a base de gadolinio si el programa de detección precoz de CHC presenta un resultado anormal (NE 1A) [59].

1.5.1.2. Ecografía con contraste (RM)

El uso de la ecografía con contraste para el diagnóstico del CHC es limitado dado el riesgo de errores que se puede producir con una tasa del 2-5% en los nódulos nuevos visualizados en un paciente cirrótico. El diagnóstico se basa en la identificación de las características típicas del CHC, que en el caso de la ecografía con contraste serían el hiperrealce en fase arterial con lavado tardío (mayor a 60

segundos) de intensidad media [57].

La ecografía con contraste se puede utilizar para caracterizar uno o muy pocos nódulos visibles en la ecografía basal convencional, pero no se recomienda como técnica de imagen de primera línea o para estrategias de recuperación en términos de coste-efectividad dado que se necesitaría un TC o RM para su estadificación. En el caso de que la RM o el TC sugieran una lesión maligna diferente al CHC, la EASL no recomienda el uso de ultrasonografía aunque sí obtener una confirmación histopatológica [57]. De igual forma, la AASLD no recomienda este método de imagen como técnica diagnóstica debido a la posibilidad de falsos positivos en pacientes con colangiocarcinoma intrahepático [58].

Por otro lado, la guía de práctica clínica de Asia y el Pacífico sobre el tratamiento del CHC, la considera útil para la caracterización de nódulos hepáticos detectados por ecografía, siendo tan sensible como la TC dinámica o la RM dinámica (NE 2B). No obstante, esta aproximación no parece ser más coste-efectiva puesto que necesitará un TC o RM para su estadificación [59].

1.5.2. Procedimientos diagnósticos histopatológicos

El diagnóstico histopatológico del CHC se basa en los criterios de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [62] y del Grupo de consenso internacional para la neoplasia hepatocelular [63]. La estadificación morfológica se basa en una evaluación macroscópica e histológica precisa de las lesiones tumorales y debe realizarse de acuerdo con la clasificación Tumor- Node- Metastasis (TNM) válida, incluida la evaluación del margen de resección [57].

Como se ha ido adelantando previamente, el uso de la biopsia hepática en el diagnóstico del CHC queda relegado, en el caso de la guía EASL, a aquellos nódulos <1 cm no concluyentes después de la realización de dos pruebas de imagen distintas. En el caso de la guía AASLD, debe considerarse en pacientes con una lesión nodular hepática cuya apariencia no es típica de CHC en imágenes con contraste, especialmente para observaciones categorizadas como LI-RADS 4 o LI-RADS M.

Para ayudar a su diagnóstico, los marcadores inmunohistológicos como la citoqueratina 19 (CK19) o la citoqueratina 7 (CK7) se asocian comúnmente a adenocarcinomas. Sin embargo, estos marcadores pueden ser positivos para CHC en un 10-20% de los casos. Por ello, su combinación permitirá precisar el diagnóstico histológico, además de que la tinción de CK7 es más significativa en nódulos displásicos de alto grado [64].

Otros biomarcadores útiles para el diagnóstico del CHC son: la proteína de shock térmico de 70 kDa (Hsp70), glutamina sintetasa (GS) y glypican 3 (GPC3). Cuando al menos dos de estos tres marcadores son positivos, la sensibilidad y la

especificidad para el CHC ascienden al 60 y al 100%, respectivamente [65].

1.5.3. Marcadores tumorales serológicos

1.5.3.1. Alfa- fetoproteína

La AFP es una glicoproteína de 70 kDa producida por el hígado fetal y el saco vitelino durante el primer trimestre del embarazo. Está también presente en adultos en condiciones normales en pequeñas cantidades [66]. La AFP representa el onco-biomarcador más destacado para el diagnóstico precoz del CHC, el seguimiento de su progresión, su capacidad de metástasis, la evaluación del pronóstico tumoral y el éxito de las medidas terapéuticas antitumorales [67].

A pesar de que la AFP se considera un “estándar de oro” entre los biomarcadores específicos de tumores, presenta una baja sensibilidad. En el estudio de Trevisani et al. un valor de corte de 20 ng/ml, en una población con una prevalencia del 5% para el CHC, el valor predictivo positivo fue del 25.1% y el valor predictivo negativo del 97.7%, lo que supone que, en una población con baja incidencia de CHC, los valores de AFP no son útiles en solitario como método de screening para identificar pacientes con un alto riesgo de sufrir este tipo de tumor. Por otro lado, el valor predictivo positivo más alto registrado, cuando la prevalencia del CHC es baja, se observó para niveles de AFP de 200 ng/ml lo que proporciona una asignación correcta a dos tercios de los casos. Así mismo, se observó que en los pacientes que no presentaban infección vírica subyacente, el valor predictivo positivo fue del 100% independientemente de la prevalencia del CHC en la población, de modo que una elevación en los niveles de AFP podría ser indicativa de CHC en pacientes no infectados [68].

Por tanto, para pacientes con factores de riesgo para desarrollar CHC, la vigilancia con AFP es subóptima ya que sus niveles pueden ser normales en aproximadamente el 30-40% de los pacientes o bien estar elevados debido a causas no relacionadas con el tumor como la hepatitis viral crónica, lo que lleva a sensibilidades del 58-68% y especificidades del 80-94% en algunos estudios (valor de corte 20 ng/ml) [66].

Otros biomarcadores útiles para el diagnóstico del CHC son: la proteína de shock térmico de 70 kDa (Hsp70), glutamina sintetasa (GS) y glypican 3 (GPC3). Cuando al menos dos de estos tres marcadores son positivos, la sensibilidad y la especificidad para el CHC ascienden al 60 y al 100%, respectivamente [65].

Esta discordancia en cuanto a la utilidad de la AFP como parte del diagnóstico, también se refleja en las guías clínicas. La AASLD utiliza el marcador tu-

moral AFP como parte del diagnóstico del CHC, ya sea para el seguimiento de aquellas lesiones <10 mm o como criterio para realizar una prueba de imagen tipo TC multifásico o RM cuando los niveles son ≥ 20 ng/ml [58]. En cuanto a la EASL, no hay recomendaciones en el uso de la AFP, considerándolo un marcador subóptimo en términos de costo-efectividad para la vigilancia rutinaria del CHC temprano [57]. Por último, la guía de práctica clínica Asia- Pacífico no recomienda el uso de AFP como test confirmatorio en hepatocarcinomas pequeños (NE B1); esta guía considera que se debe establecer su punto de corte en 200 ng/ml en los programas de seguimiento combinado con ecografía, y en el caso de que el paciente haya recibido tratamiento erradicador para el virus de la hepatitis este valor de corte puede establecerse más bajo (NE B2) [59].

1.5.3.2. Otros marcadores serológicos

Existen otros marcadores serológicos como la Des-gamma-carboxiprotrombina (DCP) o la *Lens culinaris* alfa-fetoproteína-aglutinina reactiva (AFP-L3), los cuales se han visto incrementados en el suero de los pacientes con CHC. Sin embargo, no existe suficiente evidencia científica para recomendar su uso en el diagnóstico de CHC, así como tampoco mediante su combinación con otras metodologías [69].

1.6. FACTORES PRONÓSTICOS DEL HEPATOCARCINOMA

Existen múltiples factores que contribuyen a la recidiva del CHC. El estudio de Imamura et al. los clasifica en función del tiempo de recidiva tras la realización de la hepatectomía. Aquellos factores que contribuyen a la recurrencia en menos de dos años, “factores de recurrencia temprana”, serían: la resección no anatómica, la presencia de invasión vascular microscópica y valores séricos de AFP ≥ 32 ng/ml. Por otro lado, aquellos que contribuyen a una recurrencia después de dos años, “factores de recurrencia tardía”, estarían conformados por: un alto grado de actividad de la hepatitis, CHC multifocal y el tipo de clasificación macroscópica tumoral [70].

Por otro lado, el estudio de Cha et al. analizó 164 pacientes a los que se le realizó resección hepática (RH) por CHC, identificando la invasión vascular y un tamaño tumoral mayor de 5 cm como factores predictores de recidiva tras resección curativa; así mismo, la invasión vascular en el tumor inicial se correlacionó con una supervivencia deficiente una vez que se produjo la recidiva [71].

En el caso del estudio de Liu et al. la trombosis portal y un tamaño tumoral mayor de 5 cm fueron identificados como factores pronósticos independientes para la recidiva del CHC. Adicionalmente, unos niveles séricos de AFP >400 g/ml, y la necesidad de transfusiones sanguíneas intraoperatorias, son considerados como factores pronósticos independientes para una peor supervivencia global (SG) [72].

Uno de los estudios con mayor volumen de pacientes con CHC, 12.118 sujetos a los que se le realizó resección hepática, señala en su análisis estratificado por enfermedad hepática asociada a 6 factores pronósticos tumorales: tamaño del tumor, número de tumores, extensión intrahepática del tumor, metástasis extrahepática, invasión de la vena porta e invasión de la vena hepática. Además, identificó 3 factores clínicos (edad, grado de daño hepático y nivel de AFP) y 2 factores quirúrgicos (resecabilidad quirúrgica y margen quirúrgico libre), todos ellos factores pronósticos independientes para la SG [73].

Por último, la invasión vascular, tanto macroscópica como microscópica, es de todos estos factores el predictor más potente de recurrencia y supervivencia, estando directamente asociado con la diferenciación histológica y el tamaño tumoral, tal como indica el artículo de Llovet et al. De este modo, la invasión vascular microscópica afecta al 20% de los tumores de 2 cm de diámetro, del 30 al 60% de

los casos de nódulos de 2 a 5 cm y hasta del 60 al 90% en nódulos de más de 5 cm [74]. Previamente, el estudio de Mazzaferro et al. ya indicó que la invasión microvascular está estrictamente relacionada con las covariables de tamaño, número y clasificación del tumor, duplicando el riesgo de recurrencia y de muerte, independientemente del criterio morfológico utilizado para tratar a estos pacientes (criterios de Milán, criterios Up-to-seven) [75].

Desafortunadamente, en la actualidad es imposible identificar la invasión microscópica del tumor antes de la resección, y es por ello que se espera que los estudios genómicos brinden información molecular al respecto.

1.6.1. Factores genómicos

Existen numerosos estudios y publicaciones que intentan esclarecer las vías genómicas y moleculares de la carcinogénesis hepática. En estos estudios, las mutaciones genéticas que más frecuentemente se observan están relacionadas con el mantenimiento de los telómeros, la vía Wnt/ β -catenina, la vía del regulador del ciclo celular y supresor tumoral p53, los modificadores epigenéticos, la vía del estrés oxidativo, la vía fosfatidilinositol-3-fosfato-quinasa/Proteína quinasa B (PI3K/AKT-PKB), la ruta activada por rapamicina en células de mamífero (mTOR) y la vía de los reguladores de la proliferación celular RAS/RAF/MAPK [76].

Otros biomarcadores útiles para el diagnóstico del CHC son: la proteína de shock térmico de 70 kDa (Hsp70), glutamina sintetasa (GS) y glypican 3 (GPC3). Cuando al menos dos de estos tres marcadores son positivos, la sensibilidad y la especificidad para el CHC ascienden al 60 y al 100%, respectivamente [65].

1.6.1.1. Promotor TERT

La transcriptasa inversa telomerasa (TERT) es una enzima que alarga los telómeros de los cromosomas eucarióticos empleando como molde una molécula de ARN que es un componente intrínseco de la propia telomerasa. Las mutaciones de la región promotora en el gen que codifica TERT dan lugar a un aumento de la expresión de la enzima y a un mantenimiento de la longitud de los telómeros, contribuyendo, por tanto, a la estabilización cromosómica y a la inmortalización de las células cancerosas [77]. La mutación del promotor del gen *TERT* se ha identificado como la alteración genética somática más frecuente en el CHC, con una prevalencia de entre el 20 y el 82%. Asimismo, estas mutaciones se han identificado en lesiones premalignas, aumentando la prevalencia de la mutación con el grado de displasia. Se ha llegado a identificar mutaciones en el promotor TERT en el 6% de los nódulos displásicos de bajo grado, en el 19% de los nódulos displásicos de alto grado y en el 61% de los hepatocarcinomas tempranos [78].

Coherentemente, en el estudio de Nault et al. las mutaciones en el promotor TERT fueron identificadas como las alteraciones genéticas somáticas más frecuentes en el CHC (presentes en el 59% de los hepatocarcinomas estudiados) y como el primer gen mutado de forma recurrente en las lesiones preneoplásicas cirróticas (en el 25% de macronódulos cirróticos con o sin displasia) además de estar involucradas en el último paso de la transformación maligna del adenoma hepatocelular. Esta mutación se observó con más frecuencias en hombres ($p=0.001$), en pacientes con niveles séricos de AFP bajos ($p=0.01$), en tumores pequeños <5 cm ($p=0.01$) no relacionados con VHB ($p<0.0001$) y en aquellos que además presentaban mutación para el gen de la β -catenina 1 (*CTNNB1*) ($p<0.0001$) [79]. La mutación del gen *CTNNB1* sugiere la existencia de cooperación entre la vía del promotor TERT y esta ruta de señalización en la carcinogénesis hepática [15].

Por otro lado, en el estudio de Totoki et al., sobre 469 genomas de pacientes de CHC observó que 254 (54%) presentaron mutación en el promotor TERT, siendo la frecuencia de estas mutaciones mayor en los casos positivos para VHC (121/188; 64%), menor en los casos que no presentaron patología vírica asociada (88/149; 59%) y aún más reducida en los casos positivos para VHB (44/120; 37%) [80]. Esta preferencia en los pacientes con VHC positivo fue también observada en el estudio de Pezzuto et al. con una frecuencia del 53.6% en comparación con la de los VHB positivos (41.6%) ($p<0.001$) [81]. Con respecto al VHB, otros autores señalan que la integración del genoma viral en el promotor *TERT* contribuye a la sobreexpresión de la enzima en el 15-20% de los hepatocarcinomas estudiados [76].

1.6.1.2. Wnt/ β -catenina

La β -catenina es una proteína multifuncional involucrada en la adhesión célula-célula al intermediar y fortalecer el enlace de E-cadherina y α -catenina al citoesqueleto de actina. Por otro lado, la β -catenina es un intermediario molecular esencial en la señalización Wingless/Wnt durante el desarrollo embrionario [82]. La vía Wnt se divide comúnmente en señalización dependiente (canónica) e independiente (no canónica) de β -catenina, habiéndose objetivado que su desregulación está implicada en diferentes procesos de carcinogénesis. La señalización aberrante de la ruta Wnt canónica no se limita a las células cancerosas, sino que interactúa dinámicamente con células del microambiente tumoral y del sistema inmunológico. La función de la señalización no canónica de Wnt es similar en desarrollo y cáncer, regulando no sólo la extensión convergente y la movilidad del tejido durante el desarrollo, sino también la motilidad de las células cancerosas durante la metástasis [83].

Las mutaciones en el gen que codifica la β -catenina, así como en el gen que codifica el intermediario AXIN-1, involucrado en la degradación citoplasmáti-

ca de la β -catenina, están sobreexpresados en hepatocarcinomas [84]. En el estudio de Calderaro et al., en las muestras de CHC resecados, se identificó un 11% de alteraciones en el gen *AXIN-1* y un 40% en el gen *CTNNB1*. Por otro lado, la mutación de este último se asoció con tumores grandes (OR 2.14, $p= 0.002$), bien diferenciados (OR 2.46, $p< 0.001$), pseudoglandulares (OR 3.27, $p< 0.001$), con colestasis tumoral (OR 5.53, $p< 0.001$) y con falta de infiltrados inflamatorios a nivel histopatológico (OR 3.41, $p< 0.001$) [85]. Así mismo, otros estudios han objetivado que las frecuencias de mutación en *CTNNB1* y *p53* aumentaron significativamente con la progresión tumoral [86].

1.6.1.3. Vía del regulador del ciclo celular y supresor tumoral p53

El gen *p53* se activa en respuesta al daño en el ADN induciendo la detención del ciclo celular para permitir la reparación del daño y la supervivencia de la célula o, por el contrario, la muerte celular por apoptosis. Las deleciones alélicas en el cromosoma 17p13 y las mutaciones aleatorias en el dominio de unión al ADN de *p53* hacen que este gen pierda su función, evitando el plegamiento correcto de la proteína y su acumulación en el núcleo celular donde ejerce su función [82].

En regiones como Asia oriental y el África subsahariana, donde la contaminación de alimentos con aflatoxinas ha sido señalada como factor etiológico para el desarrollo de CHC, se ha objetivado que al menos la mitad de los pacientes diagnosticados con esta patología presentan una mutación en el codón 249 del gen *p53* [87]. Así mismo, se han observado mutaciones en el codón 220 en pacientes con hemocromatosis diagnosticados de CHC [88].

Otros estudios han relacionado la mutación en el gen *p53* con una expresión más baja de aquellos genes que favorecen la diferenciación celular de los hepatocitos, reflejando la tendencia de que las células tumorales con *p53* mutado estén poco diferenciadas [89,90]. En el estudio de Calderaro et al., la mutación en *p53* estuvo presente en el 21% de los hepatocarcinomas analizados y asociada a una pobre diferenciación tumoral (OR 6.41, $p< 0.001$), a invasión tanto macrovascular (OR 2.57, $p= 0.004$) como microvascular (OR 2.03, $p= 0.02$). Por otro lado, se identificó una fuerte correlación con un subtipo histológico macrotrabecular masivo de CHC (MTM-HCC) que se caracteriza por un patrón de crecimiento macrotrabecular predominante ($> 50\%$), más frecuente en pacientes infectados por el VHB ($p= 0.007$), con niveles séricos de AFP elevados ($p= 0.02$) y con características histológicas de agresividad (nódulos satélite $p< 0.001$, invasión macrovascular $p< 0.001$ e invasión microvascular $p< 0.001$) [85].

1.6.1.4. Modificadores epigenéticos

La epigenética consiste en modificaciones químicas adquiridas en la cromatina nuclear que implican, mayoritariamente, metilación-desmetilación de los dinucleótidos CpG y acetilación-desacetilación de las proteínas histonas que conforman los nucleosomas, todas ellas con un fuerte impacto en la regulación de la expresión génica. Las alteraciones epigenéticas pueden estar inducidas por el envejecimiento, la inflamación crónica o la infección viral, y estas modificaciones pueden inducir la inactivación de genes supresores de tumores con un papel causal en la carcinogénesis y en la progresión tumoral [91,92].

En el caso del CHC, el empleo de la secuenciación masiva del exoma tisular ha permitido identificar mutaciones genéticas que inactivan genes modificadores de histonas en leucemia mieloide/linfoide o de linaje mixto (MLL) (mutado en el 2% de los casos secuenciados), en proteínas remodeladoras de nucleosomas (ARID1A, ARID1B y BRD7) (mutado hasta en un 17%) y en el corregulador transcripcional correpresor 1 de receptor nuclear (NCOR1), mutado hasta en un 29%, entre otras. La alteración inactivante en estos genes debida a mutaciones que implican desplazamiento del marco de lectura y las mutaciones sin sentido sugieren su función como genes supresores de tumores en el CHC. Así mismo, se ha visto que NCOR1 suprime directamente la función del gen CTNNB1 teniendo exclusividad de función con otras mutaciones en genes de la vía Wnt [80].

En el estudio de Schulze et al., analizaron el espectro mutacional de 243 tumores hepáticos para identificar procesos mutagénicos operativos en el CHC. Se encontraron 11 vías alteradas en el 5% de ellos que implicaban mutaciones en modificadores epigenéticos (complejos MLL fundamentalmente, 32%), y en complejos remodeladores de nucleosomas y reguladores de la cromatina (ARID1A, ARID1B, ARID2, entre otros, 28%) [86].

1.6.1.5. Vía del estrés oxidativo

El factor nuclear derivado de eritroide 2 (NRF2) es un factor de transcripción que integra señales de estrés celular y que responde dirigiendo varios programas de transcripción. Esta proteína reguladora y su regulador negativo, la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (KEAP1) conforman un módulo (NRF2-KEAP1) que es de primordial importancia para mantener el medio homeostático durante la respuesta celular adaptativa a diferentes tipos de estrés [93].

Estas proteínas reguladoras se han visto alteradas en el CHC debido a la mutación del gen del factor nuclear 2 derivado del eritroide 2 (NFE2L2), lo que produce la inhibición de la degradación de NRF2 mediada por KEAP1. En el estudio de Guichard et al., esta mutación estuvo presente en el 6.4% de los hepatocarcino-

mas, presentando además seis de las ocho muestras una mutación asociada en el gen *CTNNB1* ($p=0.01$) [94]. También en el estudio de Totoki et al. esta mutación se presentó hasta en el 5% de las muestras, así como mutaciones en el gen *KEAP1* hasta en el 11% de los pacientes [80].

1.6.1.6. Vía PI3K/AKT/mTOR

La vía PI3K/AKT/mTOR también desempeña una función significativa en el crecimiento celular, la regulación de la supervivencia, el metabolismo y la inhibición de la apoptosis celular. La activación de esta vía se inicia mediante señales de entrada que se transducen al interior de la célula después de la unión del factor de crecimiento correspondiente a un receptor de membrana plasmática con actividad tirosina quinasa (TKR); entre ellos se incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el receptor del factor de crecimiento insulínico (IGFR) [95].

En el CHC, la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR juega un papel importante y se activa en el 30 al 50% de los casos. La proteína ribosómica S6 (RPS6), una proteína integrante de la cascada de señalización de mTOR, se objetivó en el estudio de Villanueva et al. como activada de forma aberrante en el 47.7% de los hepatocarcinomas [96]. Así mismo, en el estudio de Tovar et al. se identificó la activación del factor de crecimiento insulínico (IGF) en el 21.4% de las muestras analizadas, asociándose significativamente con la activación de RPS6, lo que sugiere la implicación también del IGF en la activación de la cascada mTOR en la carcinogénesis hepática [97].

1.6.1.7. Vía RAS/RAF/MAPK

La vía del oncogén Ras constituye una red de señalización dominante que promueve la proliferación y la supervivencia celular. La unión de diferentes factores de crecimiento (por ejemplo, EGF e IGF-1) a sus receptores (por ejemplo, EGFR e IGF-1R) induce la activación de Ras, que a su vez activa de forma consecutiva el protooncogén serina/treonina-proteína quinasa (c-Raf) y las quinasas mitogénicas MEK y ERK. En el núcleo, ERK fosforilada (p-ERK) activa factores de transcripción y quinasas (por ejemplo, Elk-1 y c-Jun) involucradas en diversas respuestas celulares tales como proliferación celular, supervivencia, diferenciación, motilidad y angiogénesis [95,98].

En el estudio de Guichard et al., se concluyó que las mutaciones en genes pertenecientes a la familia Ras son poco frecuentes en el CHC (< 2%). Sin embargo, se identificaron mutaciones recurrentes en un 9.6% de los casos en el gen *RPS-6KA3* que codifica la proteína quinasa ribosómica S6 (RSK2), la cual pertenece a la

vía de señalización Ras/MAPK y es fosforilada y activada directamente por ERK1/2. Dado que esta proteína ejerce una función de inhibición por retroalimentación en la vía ERK, las mutaciones en RPS6KA3 inactivan la función de RSK2. Así mismo, la mutación de este gen se asoció en dicho estudio con mutaciones en AXIN1 ($p=0.02$), lo que sugiere una cooperación entre la inactivación de RPS6KA3 y la activación de Wnt/ β -catenina en la carcinogénesis hepática [94].

1.7. SISTEMAS DE ESTADIFICACIÓN DEL HEPATOCARCINOMA

No existe un consenso sobre qué sistema de estadificación es el mejor, la razón principal es que cada sistema se estableció sobre la base de diferentes poblaciones de pacientes, características tumorales variables, función hepática desigual y estrategias de tratamiento diversas. Por ello, cada sistema de estadificación se ajusta mejor a las características iniciales de cada paciente [72].

Los sistemas de estadificación más utilizados son los siguientes: TNM, sistema Okuda, puntuación del programa italiano de cáncer de hígado (*the Cancer of the Liver Italian Program*, CLIP), el sistema de estadificación francés del grupo de estudio y tratamiento del CHC (*Groupe d'Etude de Traitement du Carcinoma*, GRETCH), el sistema del grupo de cáncer de hígado del Hospital Clínico de Barcelona (*Barcelona Clinic Liver Cancer*, BCLC), el índice pronóstico de la Universidad de China (*Chinese University Prognostic Index*, CUPI), la estadificación integrada japonesa (*Japan Integrated Staging*, JIS) y el sistema de estadificación del grupo de cáncer de hígado de Hong Kong (*Hong Kong Liver Cancer*, HKLC).

1.7.1. Sistema de estadificación Tumor-node-metastasis

El Comité americano sobre cáncer (American Joint Committee on Cancer) publicó en 2016 la octava actualización de su sistema de estadificación TNM [99], que clasifica al tumor en función del número y ubicación de los nódulos tumorales, el tamaño del nódulo más grande y la presencia de invasión vascular o de órganos adyacentes (T), la afectación ganglionar (N) y la presencia de metástasis (M).

Tabla 3: 8ª edición Sistema de estadificación de AJCC para el CHC

	Primary tumor (T)	Regional lymph nodes (N)		Distant metastases (M)	
T1a	Solitary tumor ≤2 cm with/without vascular invasion	Nx	Regional lymph nodes cannot be assessed	M0	No distant metastasis
T1b	Solitary tumor >2 cm without vascular invasion	N0	No regional lymph node metastasis	M1	Distant metastasis
T2	Solitary tumor >2 cm with vascular invasion or multifocal tumors, none >5 cm	N1	Regional lymph node metastasis		
T3	Multifocal tumors at least one of which is >5 cm				
T4	Single tumor or multifocal tumors of any size involving a major branch of the portal vein or hepatic vein or tumor(s) with direct invasion of adjacent organs other than the gallbladder or with perforation of visceral peritoneum				
Stage					
Stage IA	T1a	N0	M0		
Stage IB	T1b	N0	M0		
Stage II	T2	N0	M0		
Stage IIIA	T3	N0	M0		
Stage IIIB	T4	N0	M0		
Stage IVA	Any T	N1	M0		
Stage IVB	Any T	Any N	M1		

En comparación con la edición previa, la diferencia fundamental con la última radica en una nueva definición para el parámetro "T". En primer lugar, el CHC precoz se clasifica según su tamaño y ausencia de invasión vascular en T1a (tumores solitarios ≤ 2 cm) y T1b (tumores solitarios > 2 cm sin invasión vascular), considerando de esta forma que la invasión vascular en tumores ≤ 2 cm no es un factor pronóstico. En segundo lugar, a aquellos hepatocarcinomas que presentan invasión vascular mayor (rama principal de la vena porta o de las venas hepáticas) se les otorga una mayor gradación que en la edición anterior, siendo esta T4 [100–102].

Las limitaciones que la EASL establece sobre este sistema de estadificación es que requiere información anatómo-patológica para evaluar la invasión microvascular, estando ésta disponible únicamente en pacientes tratados mediante cirugía; por otro lado, no aporta información sobre la función hepática o sobre el estado de salud del paciente (*Performance Status*) y su valor pronóstico es limitado en tumores no tempranos [57].

En relación a los inconvenientes que presenta esta última actualización TNM, diversos estudios coinciden en la limitación de la clasificación T2, pues en el estudio de Kamarajah et al. objetivaron que los tumores solitarios con invasión vascular presentan un pronóstico superior en comparación con los tumores múltiple ≤ 5 cm (SG a 5 años 45% y 32%, respectivamente, $p < 0.001$), sugiriendo que la distinción entre estos grupos (tumor solitario vs múltiple) puede estar justificada en nuevas revisiones de esta clasificación [100]. Así mismo lo refleja Zhang et al. en su estudio, encontrando diferencias en cuanto a la SG y la supervivencia causa-específica (SCE) dentro de la clasificación T2. Sin embargo, a diferencia del estudio anterior la supervivencia es peor en los tumores solitarios con invasión vascular con respecto a los tumores múltiples ≤ 5 cm (SG a 5 años 47.8% y 64.8%, respectivamente, $p < 0.001$; SCE a 5 años 54% y 74.5%, respectivamente, $p < 0.001$), pero encontrando un mejor pronóstico en los tumores solitarios cuando estos presentaban invasión vascular en comparación con los tumores múltiples sin invasión vascular (SG a 5 años 47.8% y 66.8%, respectivamente, $p < 0.001$; SCE a 5 años 54% y 75.3%, respectivamente, $p < 0.001$) [103]. Por otro lado, la invasión vascular supone un factor pronóstico no sólo para los tumores solitarios sino también para los tumores multifocales, y por esto debería incorporarse como tal al sistema de estadificación [100,103]. Así mismo, para los tumores solitarios ≤ 2 cm, tal como demuestra el estudio Park et al., resulta que tanto supervivencia libre de recurrencia (SLR) ($p = 0.037$) como SG ($p < 0.001$) son estadísticamente inferiores en el grupo con invasión vascular que en el de tumores solitarios ≤ 2 cm sin invasión vascular [102].

A pesar de ello, las principales mejoras consisten en cambiar el enfoque de la subclasificación del CHC temprano (T1), que es el más común y tiene más probabilidades de beneficiarse de nuevas terapias agresivas [100], así como la mo-

dificación de la categoría T4 que predice mejor el pronóstico de los tumores con una T más alta tal y como se objetiva en el estudio de Park et al., donde tumores que afectaban a una rama principal de la vena porta o hepática (T4 en la 8ª edición y T3b en la 7ª edición) mostraron una SLR ($p= 0.015$) y una SG ($p= 0.035$) más bajas que los tumores multifocales, siendo al menos uno de ellos > 5 cm (T3 en la 8ª edición y T3a en la 7ª edición) y apoyando el cambio introducido en la 8ª edición [102].

1.7.2. Sistema de estadificación Okuda

El sistema de estadificación Okuda es el más antiguo, publicado en 1985. Surge con el objetivo de analizar la relación entre la supervivencia y el tratamiento en pacientes con CHC. Clasifica a los pacientes en 3 estadios en función del tamaño tumoral (si la proporción de la suma de las áreas tumorales en su sección más grande en relación con la sección de corte más grande de todo el hígado es superior o inferior a 50%), de la presencia de ascitis, de la ictericia (valor de corte de bilirrubina 3 mg/dl) y de la albúmina sérica (valor de corte 3 g/dl). En este estudio, observaron que en 850 pacientes diagnosticados de CHC la media de supervivencia fue de 11.5 meses para pacientes en el estadio I, 3 meses para el estadio II, y 0.9 meses para el estadio III [104].

Esta puntuación clínica ha demostrado importancia pronóstica para seleccionar pacientes con insuficiencia hepática muy avanzada (Child-Pugh C) si bien tiene un valor limitado cuando se mide la reserva funcional hepática en etapas precoces, o cuando las opciones radicales, particularmente la resección quirúrgica, pueden estar indicadas [105].

1.7.3. Puntuación the Cancer of the Liver Italian Program

El sistema de estadificación CLIP fue formulado en 1998 con el propósito de diseñar un índice pronóstico más sensible que el sistema Okuda, que en ese momento era el más utilizado. Las variables incluidas en el modelo son: la escala Child-Pugh, la morfología tumoral que se obtiene combinando el tipo de tumor y su extensión, el valor de AFP y la presencia de trombosis portal, asignando una puntuación lineal (0/1/2) a las cuatro covariables. Cuanto menor es la puntuación CLIP, mayor es la mediana de supervivencia [106].

En comparación con el sistema de estadificación Okuda, la puntuación CLIP tiene un mayor número de categorías y una mejor caracterización de las categorías extremas, así como de los pacientes con el estadio Okuda-intermedio. De este modo, se establece un subgrupo de pacientes con pronóstico más favorable

que podrían ser candidatos a estrategias terapéuticas más agresivas, habiendo sido validado externamente en un ensayo clínico en el año 2000 [106,107]. Así mismo, sus autores realizan una crítica al sistema BCLC considerando que más que un modelo pronóstico, es la explicación del algoritmo de decisión de tratamiento que utilizan los autores del BCLC en su centro.

Las limitaciones que Liu et al. objetivan en la puntuación CLIP son que no incorpora el estado funcional ni las metástasis extrahepáticas en su sistema de estadificación, ya que éstos los identifican como factores independientes de mal pronóstico dentro de su serie de 3.182 pacientes diagnosticados de CHC. A pesar de ello, consideran que el sistema CLIP es el más homogéneo y con el menor AIC (Criterio de información de Akaike) y, por tanto, el más preciso [108].

1.7.4. Sistema de estadificación francés

El grupo de estudio del tratamiento del CHC francés, realizó un estudio en 1999 sobre 761 pacientes que presentaban CHC en 24 centros occidentales con el objetivo de idear un sistema de clasificación para predecir la supervivencia de estos pacientes. Los cinco factores pronósticos fueron: índice Karnofsky (punto de corte 80%), bilirrubina sérica (punto de corte 50 $\mu\text{mol/l}$), AFP (punto de corte 35 $\mu\text{g/l}$), fosfatasa alcalina (2 veces por encima del límite superior de la normalidad) y la presencia de obstrucción portal. A la presencia de estos factores se les dio una puntuación entre 0-3 y, según la puntuación obtenida, se clasificaron a los pacientes en función del riesgo de muerte en tres grupos: A (bajo riesgo de muerte, 0 puntos), B (riesgo intermedio, entre 1-5 puntos) y C (alto riesgo, ≥ 6 puntos). La tasa de supervivencia al año de estos tres grupos era de 72%, 34% y 7%, respectivamente. Esta clasificación presenta unas características más restrictivas en los grupos de bajo riesgo en comparación con la clasificación de Okuda [109].

1.7.5. Sistema Barcelona Clinic Liver Cancer

El BCLC propuesto en 1999 por Llovet et al. combina el estadio tumoral del CHC con parámetros de función hepática con el objetivo final de proporcionar una estratificación precisa de los pacientes que permita establecer su pronóstico y orientar la estrategia del tratamiento a través del algoritmo diseñado al efecto [105].

En su primera publicación, los pacientes se clasificaron en cuatro etapas:

- **Estadio A:** estadio temprano, incluye pacientes con tumores únicos o

con tres tumores menores de 3 cm a los que se les podía aplicar tratamientos radicales. Este estadio a su vez se dividía en cuatro subapartados en función de la presencia de hipertensión portal y de los valores de bilirrubina.

- **Estadio B:** estadio intermedio, pacientes asintomáticos con tumores multinodulares sin invasión vascular ni diseminación extrahepática.
- **Estadio C:** estadio avanzado, comprende pacientes con tumores sintomáticos (*Performance Status Test*, PST) = 1-2, síndrome constitucional) o con un patrón tumoral invasivo reflejado por la presencia de invasión vascular o diseminación extrahepática.
- **Estadio D:** estadio final, pacientes que presentan síntomas severos relacionados con su proceso tumoral, con un deterioro del estado general (PST= 3-4) o con tumores en el contexto de un deterioro funcional hepático muy avanzado.

Posteriormente, esta clasificación se ha ido actualizando, datando la última de 2022 (*Figura 1*) y en la que se distinguen cinco estadios. A diferencia de la clasificación inicial, incluye un estadio muy temprano (BCLC 0) comprendido por tumores únicos ≤ 2 cm con función hepática preservada y buen *Performance Status*. Así mismo, en cuanto a la valoración de la función hepática, ésta deberá evaluarse más allá de la clasificación Child-Pugh convencional o la puntuación del “Modelo de enfermedad hepática en etapa terminal” (MELD), pues ninguno de ellos sirve para medir adecuadamente la función hepática. Esta evaluación actualizada debe tener en cuenta los parámetros bioquímicos, así como el estado compensado o descompensado del paciente.

Los pacientes con un estadio BCLC 0/BCLC A pueden beneficiarse de la resección, el trasplante o la ablación, y para cada una de estas opciones, el pronóstico se puede refinar de acuerdo con diferentes parámetros: presencia de hipertensión portal, niveles séricos de bilirrubina, presencia de otras enfermedades asociadas. Los pacientes con un estadio BCLC B presentan tumores multifocales sin invasión vascular ni diseminación más allá del hígado y con buena función hepática. Estos últimos podrían ser candidatos, en caso de cumplir criterios extendidos para trasplante, a TH. En caso de no cumplirlos, y siendo el paciente elegible (nódulos bien definidos y flujo portal preservado), se podría plantear el tratamiento con quimioembolización transarterial (*transarterial chemoembolisation*, TACE o QETA) y, en aquellos casos más agresivos (CHC difuso, infiltrativo o con extensión bilobar), la utilización de terapia sistémica, proponiéndose el mismo esquema terapéutico que el de un estadio BCLC C. En el caso de estadio avanzado o estadio BCLC C, la terapia sistémica con inhibidores de tirosinas quinasas (Sorafenib, Regorafenib) es el único tratamiento que hasta el momento ha demostrado prolongar la supervivencia de estos pacientes. Por último, los pacientes con enfermedad

en etapa terminal o estadio BCLC D tienen un mal pronóstico y por tanto requerirán cuidados de soporte paliativo [110].

La capacidad pronóstica del sistema de estadificación BCLC ha sido validada en diferentes entornos clínicos [111,112], y está respaldado por la AASLD, la Asociación Americana de Gastroenterología (AGA), la EASL y la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC) [57,58].

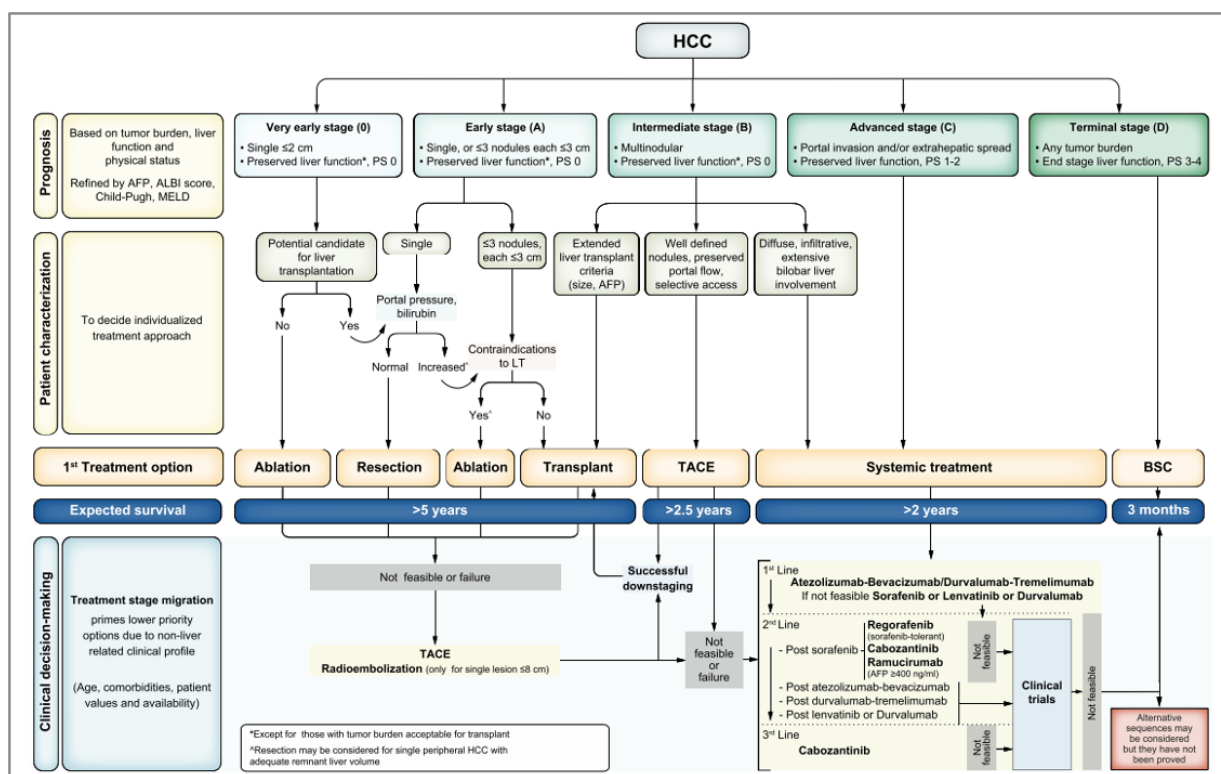


Figura 1: Algoritmo de estadificación y tratamiento BCLC

Esta nueva clasificación intenta subsanar las limitaciones terapéuticas objetivadas en la clasificación previa de 2018 [113] en relación a los estadios intermedios (BCLC- B), ya que comprende un grupo muy heterogéneo de pacientes. En el estudio multicéntrico de Torzilli et al. se recogieron un total de 2.046 pacientes diagnosticados de CHC a los que se les realizó resección hepática, 50% de los cuales clasificados como BCLC-B/BCLC-C. Tras el procedimiento quirúrgico, se objetivó una SG a 5 años de 61% para BCLC 0-A, 57% para BCLC-B y 38% para BCLC-C ($p < 0.005$), siendo estos resultados aceptables a corto y largo plazo en estadios intermedios/avanzados que de otra manera tendrían una limitación terapéutica según la clasificación BCLC previa de 2018 [114]. En este mismo sentido, Bolondi et al. propuso una subclasificación del estadio BCLC-B en función de parámetros relacionados con la carga tumoral (criterios Up-to-seven) y la función hepática (escala Child-Pugh) en asociación con diferentes opciones de tratamiento de primera línea como TACE, radioembolización transarterial (*transarterial ra-*

dioembolization, TARE) o cuidados de soporte y de varias alternativas adicionales (TH, ablación, Sorafenib y TACE) [115] que representa una variante a la clasificación BCLC propuesta en 2018 y que se contempla en la clasificación actual.

1.7.6. El índice pronóstico de la Universidad de China (CUPI)

El CUPI, publicado en 2002 a partir de una cohorte china homogénea diagnosticada de CHC con VHB, toma como factores pronósticos: el estadio TNM, la ausencia de clínica al diagnóstico, la presencia de ascitis, niveles de AFP \geq 500 ng/ml, la bilirrubina total sérica (valores de corte 34 y 52 μ mol/l) y niveles de fosfatasa alcalina \geq 200 IU/l. La suma de los puntos adjudicados a los seis factores es el resultado de la puntuación del índice pronóstico que oscila entre -7 a 12. En función de este, se clasifican a los pacientes en bajo riesgo (-7 a 1 punto, SG a los 3 meses de 85.7%), riesgo intermedio (2 a 7 puntos, SG a los 3 meses de 56.4%) y riesgo elevado (8 a 12 puntos, SG a los 3 meses de 20.2%) [116].

Este estudio compara además su índice con otros sistemas de estadificación como Okuda, CLIP y TNM, concluyendo que el sistema CUPI es más discriminante, al menos en los pacientes que presenten CHC con VHB [116].

1.7.7. El sistema de estadificación integrado japonés

Este sistema de estadificación japonés (JIS) propuesto en 2003 surge con la intención de cubrir los puntos no resueltos del sistema italiano CLIP en cuanto a la escasa discriminación de esta última clasificación en los pacientes con puntuaciones más elevadas. Esta estadificación combina el grado de Child-Pugh y la clasificación TNM por el grupo de estudio de cáncer de hígado de Japón (*Liver Cancer Study Group of Japan*, LCSGJ). En el estudio de Kudo et al., en el que se comparó la utilidad del sistema de puntuación JIS para evaluar el pronóstico de los pacientes japoneses diagnosticados de CHC con la del sistema de clasificación CLIP, se concluyó que el sistema japonés es más útil a la hora de estratificar a los pacientes, sobre todo en etapas más tempranas, pues la supervivencia acumulada a 10 años para una puntuación 0 en el sistema CLIP fue del 23% y para la puntuación 0 en el sistema JIS fue del 65% ($p < 0.01$). Por tanto, el sistema CLIP no es útil en la población japonesa, en la que la incidencia de CHC temprano es alta, siendo el sistema JIS el que mejor se adapta a esta situación [117].

1.7.8. Sistema de estadificación Hong Kong Liver Cancer

Este sistema de estadificación coreano (HKLC) surge en el año 2014 como el “BCLC” asiático, dado que el BCLC fue creado a partir de cohortes de pacientes con CHC temprano predominantemente infectados con VHC. Los autores del HKLC consideran que no es óptimo para la valoración de los pacientes asiáticos donde predomina la infección por VHB y en los que la función hepática suele estar más preservada, pudiendo beneficiarse en estos casos de tratamientos más agresivos tal y como abogan las guías de consenso asiáticas para estadios intermedios-avanzados [118]. Esta clasificación se establece en función de: la calidad de vida medido por la escala del Grupo Oncológico Cooperativo del Este (ECOG), estadio Child-Pugh, presencia de invasión vascular extrahepática y de metástasis, tamaño tumoral y número de nódulos tumorales; de esta manera, los pacientes se distribuyen en 5 etapas iniciales o 9 subetapas con distintos resultados de supervivencia [119].

Al comparar esta clasificación con el BCLC, los autores destacan una mejor estratificación de los pacientes en estadios intermedios y avanzados, con mejores resultados de supervivencia debido a recomendaciones de tratamiento más agresivas que las recomendadas en el algoritmo de tratamiento BCLC. En pacientes BCLC-B clasificados como HKLC-II, para quienes la estadificación BCLC recomienda TACE, la supervivencia con tratamientos curativos radicales sobre TACE fue del 52.1% frente al 18.7% a los 5 años ($p < 0.0001$); en los pacientes BCLC-C clasificados como HKLC-II, para quienes se recomienda la terapia sistémica, la supervivencia a 5 años con terapias curativas radicales fue del 48.6% frente al 0% ($p < 0.0001$); así mismo, los pacientes BCLC-C clasificados como HKLC-III la supervivencia alcanzada a 3 años con TACE sobre la terapia sistémica fue del 9.7% frente al 1.7% ($p < 0.001$) [119].

A pesar de ser un sistema de estadificación realizado sobre una población con VHB y origen asiático, existen diversos estudios retrospectivos que demuestran que es un sistema de estadificación válido en la población occidental, así como en sujetos con VHC, ofreciendo incluso un error de predicción más bajo y un poder discriminativo más alto que el BCLC [120,121].

1.8. TRATAMIENTOS

En función del grado de recomendación y de evidencia científica, las estrategias de tratamiento potencialmente eficaces para el CHC son las siguientes:

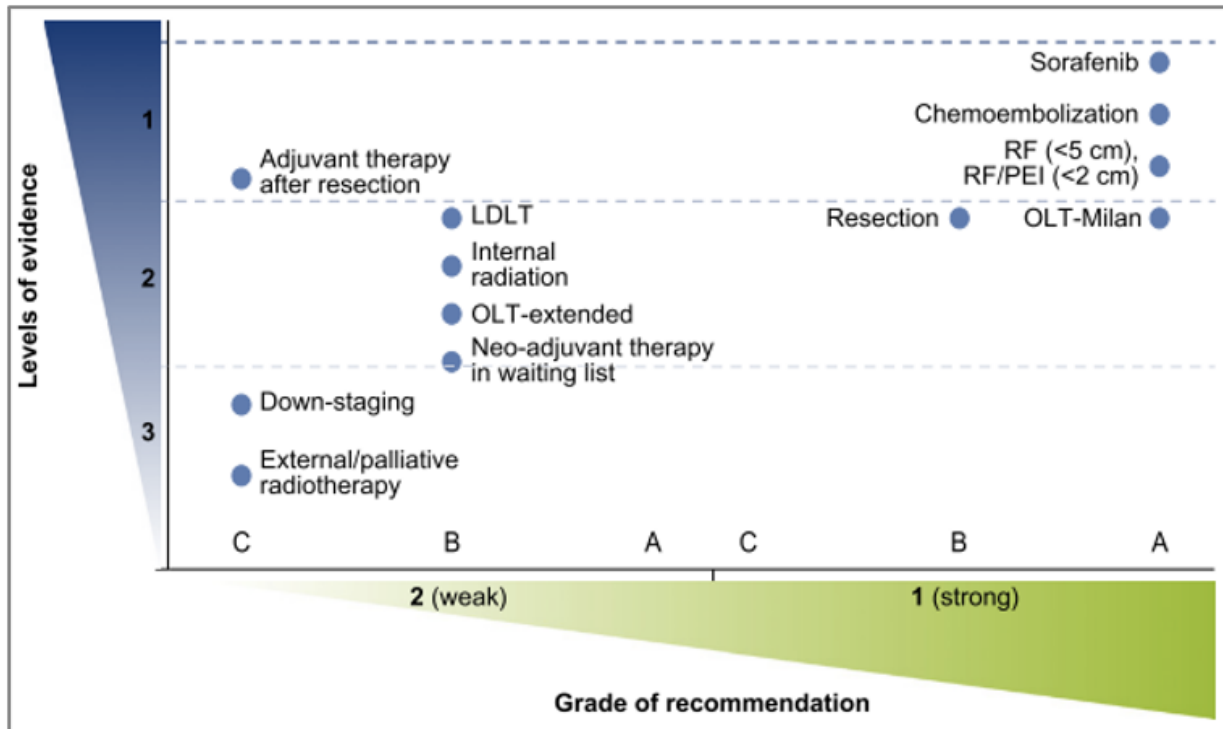


Figura 2: Tratamientos propuestos por la EASL-EORTC (guía 2012) en función del grado de recomendación y de evidencia científica.

OLT, Trasplante hepático ortotópico; LDLT, trasplante hepático de donante vivo.

Dada la complejidad de la enfermedad y el gran número de tratamientos potencialmente útiles, los pacientes diagnosticados de CHC deben ser remitidos a equipos multidisciplinares en los que participen médicos, cirujanos, radiólogos, anatomopatólogos y oncólogos [113].

1.8.1. Tratamientos curativos

La cirugía es el pilar del tratamiento del CHC, lo que genera los mejores resultados de cualquier tratamiento disponible en candidatos bien seleccionados (supervivencia a cinco años del 60-80%). La RH y el TH representan la primera opción en pacientes con tumores tempranos con intención de tratar. Las intervenciones quirúrgicas a menudo pueden extenderse a otras etapas del CHC, una vez que se logra una disminución eficaz del tumor por medios no quirúrgicos [57].

1.8.1.1. Resección hepática

La RH es actualmente el tratamiento de elección en los pacientes que presentan un diagnóstico de CHC sobre hígado no cirrótico [122]. La determinación de si una lesión es subsidiaria de resección quirúrgica o no debe basarse en consideraciones anatómicas, incluido el número y la ubicación de los tumores, además de garantizar una reserva hepática adecuada, que depende del volumen previsto de resección, así como de la función hepática subyacente [58].

Tanto la guía americana de la AASLD como la guía europea de la EASL recomiendan la RH en tumores únicos, de cualquier tamaño (en particular > 2 cm), con una función hepática preservada y sin evidencia de hipertensión portal (niveles de bilirrubina dentro de la normalidad y con un gradiente de presión venosa hepática < 10 mm Hg o un recuento de plaquetas >100.000/mcl), pues estas condiciones ofrecen una baja mortalidad perioperatoria y una tasa de supervivencia en torno al 70% a los 5 años [57,58]. No obstante, en los últimos años, algunos de estos criterios se han sobrepasado en centros con una alta experiencia en cirugía hepática, obteniendo resultados favorables con una mortalidad postoperatoria < 3% y una morbilidad posquirúrgica grave < 30%. Esto ha llevado a que en la última actualización de la EASL se introduzca la posibilidad de ampliarlos siempre y cuando haya un balance entre la evaluación de la función hepática, la hipertensión portal y la extensión de la hepatectomía o del abordaje quirúrgico empleado [57]. En función de esto, se ha propuesto un algoritmo que permite identificar el riesgo de descompensación hepática en el paciente cirrótico cuando se realiza un procedimiento quirúrgico (Figura 3). Este algoritmo está basado en el artículo de Citterio et al. que demuestra que el factor más importante asociado a la descompensación hepática que surge tras la RH por CHC, es la hipertensión portal (OR 2.20; IC 95% 1.13-4.30, p= 0.01) seguida de la extensión de la hepatectomía (OR 2.41; IC 95% 1.17-4.30, p= 0.01) y una puntuación MELD > 9 (OR 2.26; IC 95% 1.10-4.58, p= 0.02) [123].

En el estudio de Azoulay et al. se demuestra que la RH en pacientes seleccionados (índice de la Sociedad Americana de Anestesiología (ASA) < 2 puntos, puntuación media de MELD 8/ Child-Pugh A con biología tumoral favorable) y con un gradiente de presión venosa hepática media de 12 mm Hg, puede lograr resultados perioperatorios óptimos en estos pacientes cuya situación no tan ideal. Por otro lado, el abordaje laparoscópico fue el único predictor independiente para presentar a priori una evolución postoperatoria sin incidencias en esta serie de alto riesgo (OR 5.6; IC 95% 1.7-18.2, p= 0.004) [124].

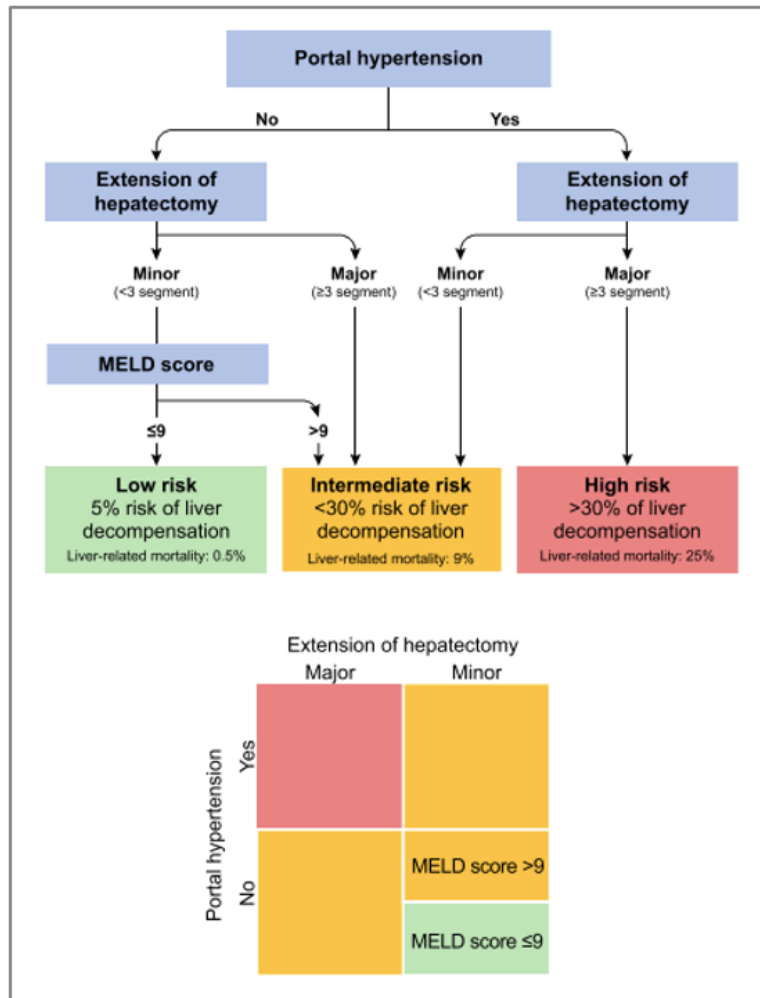


Figura 3: Algoritmo de valoración del riesgo de descompensación hepática después de una RH para hepatocarcinomas sobre cirrosis hepática, en función la hipertensión portal, la RH y la función hepática.

Riesgo alto (rojo), riesgo intermedio (amarillo), bajo riesgo (verde).

El riesgo de recidiva tras la RH es de hasta el 70% a los 5 años, siendo la invasión micro y macrovascular, la presencia de nódulos satélites, la cirrosis y la diferenciación tumoral los factores predictores independientes más importantes para determinar una supervivencia libre de enfermedad (SLE) desfavorable [125–128]. Actualmente, el tamaño tumoral no es un factor pronóstico independiente de recurrencia, tal y como indica el estudio de Truant et al.: un tamaño tumoral > 8 cm en hepatocarcinomas no cirróticos, que se presenten como una única lesión, sin invasión vascular ni fibrosis, presentan una SLE a 5 años del 85%, por lo que la RH en hepatocarcinomas grandes sin factores de mal pronóstico estaría justificada [129].

Teniendo en cuenta el alto riesgo de recidiva tumoral tras la RH y los factores de riesgo de recidiva descritos anteriormente, el estudio prospectivo de Ferrer-Fàbrega et al. propone que una vez detectados estos factores de riesgo histológicos, se plantee el TH a estos pacientes sin tener que esperar a la aparición de recidiva tumoral, estableciendo un tiempo de espera de al menos 6 meses entre la

resección y el alistamiento para el trasplante, con una SG a 5 años del 82.4% [130].

1.8.1.2. Trasplante hepático

El TH es la mejor opción de tratamiento ya que podría curar de forma simultánea el tumor y la cirrosis subyacente; la probabilidad de supervivencia del paciente tras el trasplante sigue siendo el criterio esencial para indicar este tipo de tratamiento [113].

Actualmente, tanto las guías de la AASLD como la de la EASL consideran que los criterios de Milán (tumor único ≤ 5 cm o tumores múltiples ≤ 3 nódulos ≤ 3 cm de tamaño, sin invasión vascular) son el punto de referencia para la selección de los pacientes con CHC que se beneficiarían del TH [57,58] con una supervivencia a 4 años del 75% y una tasa de SLE del 83% [131]. Sin embargo, estos criterios excluirían a un subgrupo importante de pacientes que podrían beneficiarse de este tratamiento; es por ello que varios grupos han desarrollado otros criterios extendidos más allá de los de Milán basados en parámetros morfométricos y/o biológicos (Tabla 4) [132]

Tabla 4: Criterios extendidos para el TH en el CHC

OS, supervivencia global; TTV, volumen tumoral total.

Criteria	Criteria Content	Survival
Extended morphometric criteria for hepatocellular carcinoma		
Milan Criteria	Solitary nodule ≤ 5 cm or up to 3 nodules, each ≤ 3 cm;	4-yr OS: 85%
Mazzaferro <i>et al.</i> 1996	Absence of macroscopic vascular invasion or distant disease	
UCSF Criteria	Single nodule ≤ 6.5 cm, or ≤ 3 nodules ≤ 4.5 cm each, with a	5-yr OS: 72.4%
Yao <i>et al.</i> 2001	total tumour diameter ≤ 8 cm	
Navarra Criteria	Single nodule ≤ 6 cm, or 2-3 nodules ≤ 5 cm each	5-yr OS: 79%
Herrero JI 2001		
Valencia Criteria	1-3 lesions ≤ 5 cm and total tumour diameter ≤ 10 cm	5-yr OS: 63%
Silva M <i>et al.</i> 2008		
Up-to-7 Criteria	Sum of the size of the largest tumour in cm and the total	5-yr OS: 71.2%
Mazzaferro <i>et al.</i> 2009	number of tumours ≤ 7 ; Absence of tumour microvascular invasion	
Tokyo Criteria	Nodule no larger than 5 cm and no more than 5 nodules (5-5 rule)	5-yr OS: 75%
Sugawara <i>et al.</i> 2007		
Shanghai Criteria	Solitary nodule ≤ 9 cm or ≤ 3 lesions with the largest ≤ 5 cm with a	5-yr OS: 78.1%
Fan J <i>et al.</i> 2009	total tumour diameter of ≤ 9 cm; Absence of macrovascular and lymph node invasion; Absence of extrahepatic metastasis	
Asan Criteria	Nodule ≤ 5 cm, ≤ 6 nodules and free of gross vascular invasion	5-yr OS: 81.6%
Lee SG <i>et al.</i> 2008		
Extended biologic criteria for hepatocellular carcinoma		
Hangzhou Criteria	Total tumour diameter ≤ 8 cm without macrovascular invasion or	5-yr OS: 78.3%
Zheng SS <i>et al.</i> 2008	if >8 cm, histology from tumour biopsy without poor differentiation (grade III) and AFP level ≤ 400 ng/ml	
Kyoto Criteria	≤ 10 nodules, all nodules ≤ 5 cm and a serum DCP ≤ 400 mAU/ml	5-yr OS: 86.7%
Ito T <i>et al.</i> 2007		
Extended Toronto Criteria	Biopsy of largest nodule is not poorly differentiated and no cancer-related	5-yr OS: 69%
Sapisochin G <i>et al.</i> 2008	symptoms	
LT French Study Group AFP Model	Points assigned base on tumour diameter, number of nodules (1-3 vs. ≥ 4), AFP	5-yr OS
Duvous C <i>et al.</i> 2012		low risk: 67.8%
		high risk: 47.5%
TTV/AFP	Total tumour volume ≤ 115 cm ³ and AFP ≤ 400 ng/ml	4-yr OS: 74.6%
Toso C <i>et al.</i> 2015		

La prioridad en la asignación de injertos hepáticos se realiza mediante la puntuación MELD y sigue el principio de asignar los órganos a los que tienen mayor riesgo de muerte mientras esperan a ser trasplantados. Este sistema tiene en cuenta la bilirrubina sérica, los niveles de creatinina, el índice internacional

normalizado (INR) y la etiología de la cirrosis [133]. No obstante, en el caso del CHC, la mayoría de los pacientes presentan una función hepática preservada, valores bajos de MELD y un mayor riesgo de salir de la lista de espera de trasplante antes por progresión tumoral que por insuficiencia hepática [134]. Para equilibrar estos criterios se otorgan puntos de excepción para los pacientes con CHC incluidos en la lista de espera de trasplante basándose en [57]:

- Carga y presentación tumoral.
- Progresión a lo largo del tiempo (con/sin límite y tiempo de espera antes de que otras categorías de CHC reciban puntos).
- Puntuación MELD o MELD-combinado como HCC-MELD, deMELD, MELD_{EQ}.
- Respuesta a terapias loco-regionales contra el tumor basadas en tratamiento puente o de reducción tumoral (*downstaging*).

El principal factor que limita la realización del TH es la escasez de órganos donados, con el problema adicional de equilibrar la distribución de los órganos disponibles entre las indicaciones oncológicas y no oncológicas [57]. Por ello, con el objetivo de ampliar la reserva de órganos disponibles se han desarrollado una serie de técnicas quirúrgicas que dan lugar al llamado “injerto marginal”, entre ellas: el TH de donante vivo, en el que se dona una parte del hígado dejando al donante un remanente hepático suficiente para tener una excelente calidad de vida a largo plazo, la donación tras muerte cardiocirculatoria (donación en asistolia) y el trasplante de hígado dividido (trasplante Split), en el que un órgano de una donación en muerte encefálica se divide para permitir su uso por dos receptores [134].

Por ello, debido a la limitada oferta de donantes fallecidos, o al riesgo potencial para un donante vivo, es imperativo minimizar la recurrencia, optimizar los resultados y maximizar los beneficios mediante una cuidadosa selección de los receptores adecuados [132].

1.8.1.3. Ablación

Existen diversas técnicas para la ablación térmica o química del tumor. Inicialmente se describió la inyección percutánea con alcohol (percutaneous ethanol injection, PEI) que inducía necrosis coagulativa de la lesión como resultado de la deshidratación celular, desnaturalización de proteínas y oclusión química de pequeños vasos tumorales. Posteriormente han surgido las terapias térmicas que se clasifican en tratamientos hipertérmicos (calentamiento del tejido a 60-100oC) incluyendo ablación por radiofrecuencia (*radiofrequency ablation*, RFA), por microondas (*microwave ablation*, MWA), o por láser así como en tratamientos crioablativos (congelamiento del tejido a -20 y -60oC) [60].

En el momento actual, la RFA constituye la técnica de referencia, su mecanismo para la destrucción celular se basa en el calor friccional generado por corriente alterna de alta frecuencia que produce necrosis coagulativa del tumor y que permite la extensión de la necrosis a un “anillo de seguridad” en el tejido peritumoral [57]. En comparación con PEI, el estudio de Pompili et al. mostró diferencias estadísticamente significativas entre las dos técnicas en pacientes con CHC único ≤ 2 cm sobre hígado cirrótico, tanto desde el punto de vista de la recidiva como de la tasa de progresión local del tumor, siendo mayor en los tratados con PEI (tasa de recidiva a 1, 3 y 5 años del 20.4%, 63.9% y 73.3%, respectivamente) que en los tratados con RFA (17.8%, 42.4% y 49%, respectivamente, $p=0.023$).

Cuando se compara la radiofrecuencia con la resección quirúrgica en hepatocarcinomas comprendidos entre 2-4 cm, el estudio de Lee et al. muestra que la SG entre ambos grupos es similar. No obstante, la SLE en el grupo de resección quirúrgica fue mayor que en el grupo de ablación: SLE a los 3 y 5 años del 66.7% y 44.4%, respectivamente, para resección quirúrgica y del 44.1% y 31.2%, respectivamente, para la radiofrecuencia ($\log\text{-rank}= 0.071$) [135]. Por otro lado, el estudio de Cuccchetti et al. señala que para los hepatocarcinomas < 2 cm la radiofrecuencia proporcionó una mejor esperanza de vida, y una mejor esperanza de vida ajustada a la calidad a un menor coste en comparación con la resección quirúrgica, siendo tanto la SG como la SLE muy similar entre los dos tratamientos ($p= 0.949$ y 0.263 , respectivamente) [136].

Otra de las técnicas ablativas es MWA. En este caso, su mecanismo de acción se basa en el uso de energía electromagnética que calienta el tejido siendo menos propensa al efecto disipador de calor, lo que significa que la eficacia del tratamiento se ve menos afectada por los vasos situados en la proximidad del tumor [57]. El estudio de Yu et al. compara RFA y MWA no encontrando diferencias entre ambas técnicas en cuanto a su eficacia y a la SG y SLE a 1, 3 y 5 años en hepatocarcinomas ≤ 5 cm; tampoco se encontraron diferencias en cuanto a su eficacia en localizaciones adyacentes a grandes vasos, tracto digestivo, vesícula biliar o diafragma [137].

En el momento actual, tanto la guía de la AASLD como la de la EASL establecen que la RFA es el tratamiento estándar para los pacientes con tumores BCLC-0 y A no aptos para la cirugía (evidencia alta, grado de recomendación fuerte) y que en fase muy temprana (BCLC-0) puede adoptarse como terapia de primera línea incluso en pacientes quirúrgicos (evidencia moderada, grado de recomendación fuerte) [57,58].

1.8.2. Tratamientos no curativos

1.8.2.1. Quimioembolización transarterial

La QETA tiene como objetivo inducir la necrosis tumoral y se basa en que el CHC presenta una vascularización predominantemente arterial en comparación con el parénquima hepático circundante. Este enfoque da lugar a un efecto citotóxico combinado con isquemia en el tejido tumoral mediante la infusión transarterial de agentes quimioterápicos y la posterior embolización de los vasos nutricios del tumor [57,138]. La revisión sistemática de ensayos clínicos randomizados llevada a cabo por Llovet et al. en 2003 mostró que la embolización arterial mejoraba la supervivencia a 2 años en comparación con los grupos control (OR 0.53; IC 95% 0.32-0.89, $p= 0.017$); en el 35% de los casos se obtuvieron respuestas objetivas que duraron entre 1 y 6 meses [139].

Existen dos técnicas, TACE convencional que utiliza Lipiodol (*conventional TACE, cTACE*) y TACE con perlas liberadoras de fármacos (*TACE with drug-eluting beads, DEB-TACE*). La primera consiste en la inyección intraarterial de un fármaco citotóxico, como doxorrubicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina C o cisplatino, que se emulsiona en el agente radiopaco aceitoso Lipiodol. La segunda técnica consiste en microesferas embólicas no reabsorbibles que pueden cargarse con agentes citotóxicos y fueron desarrolladas para lograr una liberación más sostenida del fármaco con la embolización concomitante. Sin embargo, no se ha demostrado la superioridad de la DEB-TACE sobre la cTACE en términos de supervivencia de los pacientes, respuesta del tumor y nivel de seguridad [138].

Actualmente, la recomendación que realizan tanto las guías de la AASLD como la de la EASL sobre el uso de TACE en el CHC se refiere a pacientes con BCLC-B (evidencia alta, grado de recomendación fuerte), no debiendo utilizarse en pacientes con enfermedad hepática descompensada, disfunción hepática y/o renal avanzada, invasión vascular macroscópica o diseminación extrahepática [57,58]. La revisión sistemática realizada por Lencioni et al. estima una SG en los pacientes tratados con TACE convencional de 19.4 meses de media (IC 95% 16.22-22.6), y una SG a 1, 2, 3 y 5 años del 70.3%, 51.8%, 40.4% y 32.4% respectivamente, obteniendo una respuesta parcial o completa del 52.5% (IC 95% 43.6-61.5) [140].

Otra recomendación para el uso de TACE es como tratamiento puente al TH. En estadios tempranos del CHC en pacientes candidatos a TH, cuando se prevé que el tiempo de espera es superior a 6 meses, el tratamiento puente con TACE permite reducir la salida de espera de TH por progresión tumoral, pasando de una estimación, según el estudio de Llovet et al., en pacientes no tratados del

15-36% [141] al 2.9-11% [142,143].

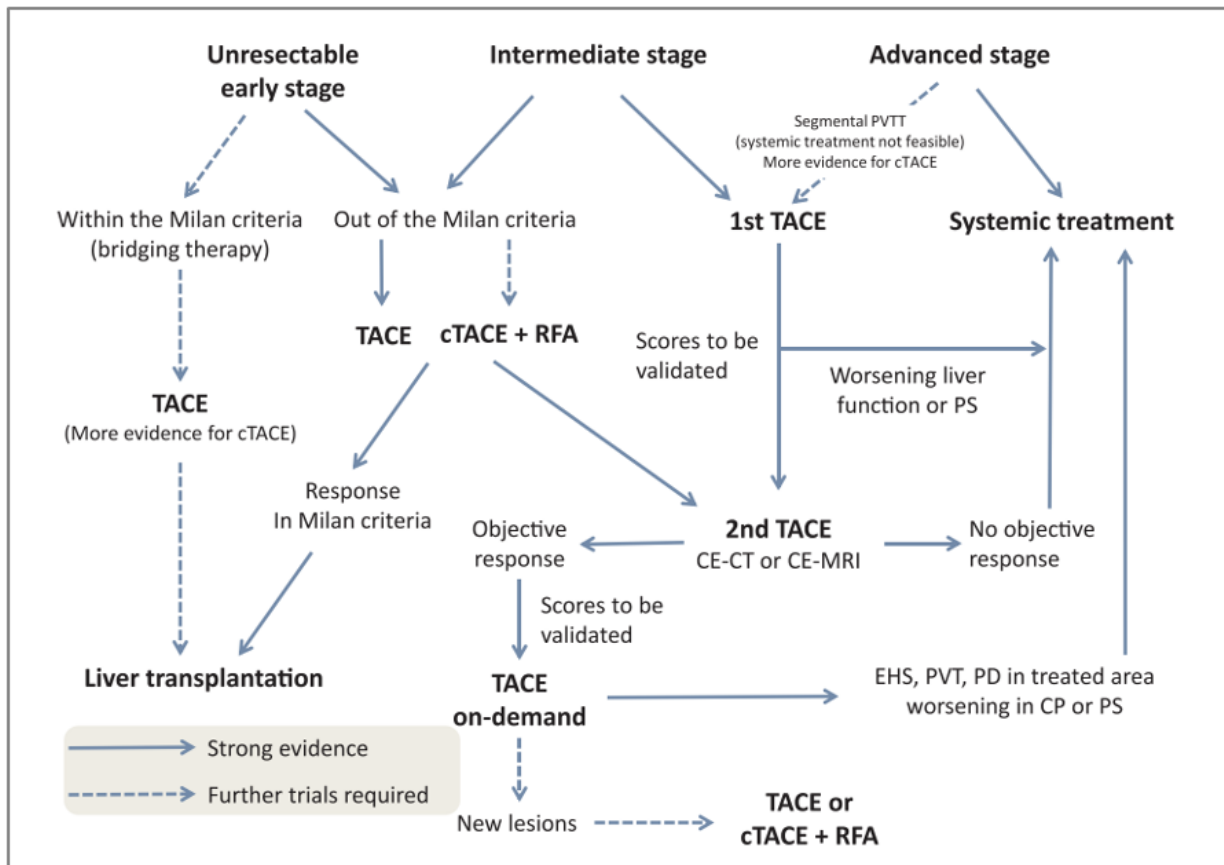


Figura 4: Algoritmo terapéutico con TACE para el manejo del CHC en estadio temprano, intermedio y avanzado

Seg PVTT: trombosis segmentaria portal; RF: radiofrecuencia; CE-CT: tomografía computarizada con contraste; CE-MRI: resonancia magnética con contraste; CP: Child-Pugh; EHS: diseminación extrahepática; PD: enfermedad en progreso; PS: Performans Status; PVT: trombosis portal.

Las recomendaciones generales aceptadas en el esquema de tratamiento del CHC con TACE, así como aquellas que precisan de más estudios para su validación se recogen en la Figura 4 [138].

1.8.2.2. Radioembolización

La TARE o radioterapia interna selectiva (*selective internal radiation therapy*, SIRT) es un procedimiento que consiste en la infusión de sustancias radioactivas como el Lipiodol marcado con Iodo-131, de microesferas que contienen Itrio-90 (Y90) o de agentes similares en la arteria hepática que migrarán vía intraarterial a la zona tumoral, emitiendo selectivamente radiación de alta energía y de baja penetración en el tumor [57].

La sustancia radioactiva más utilizada es el Itrio, emisor β puro con una vida media de 64.2 horas y una penetración tisular media de 2.5 mm. Por consi-

guiente, el 94% de la energía se emite en los primeros 11 días y no es necesario el aislamiento para la protección contra la radiación. Debido a su pequeño tamaño (25-45 μm), no producen ningún efecto isquémico significativo, a diferencia de las partículas de más de 100 μm utilizadas en el TACE [144]. Los diferentes mecanismos de acción entre TACE y TARE se exponen en la *Figura 5* [145].

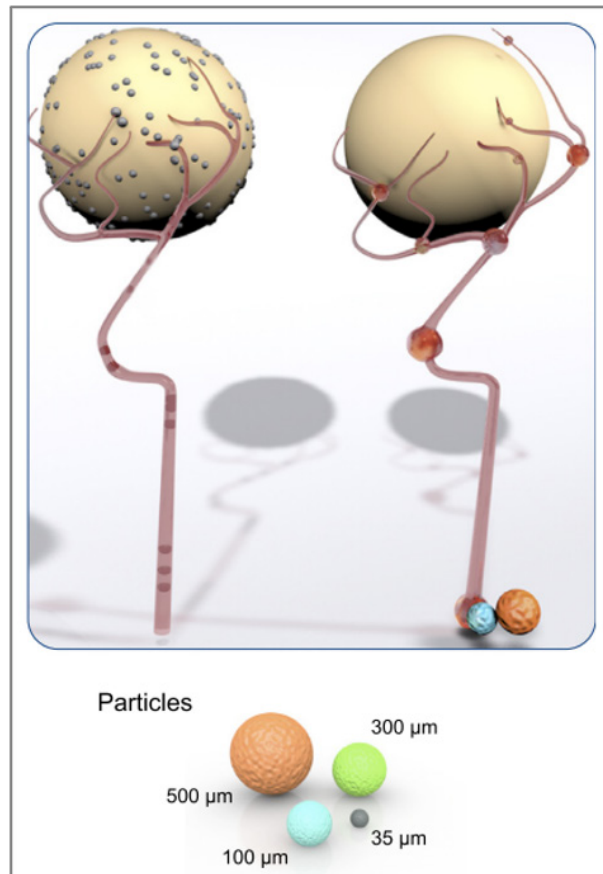


Figura 5: Mecanismos de acción entre TACE Y TARE

En la radioembolización las partículas pequeñas (35 μm) cargadas de isótopos se administran en los vasos sanguíneos intratumorales más pequeños con el objetivo de administrar una irradiación de corto alcance. En la quimioembolización las partículas medianas (100-500 μm) liberadoras de fármacos o simples se introducen en los vasos de tamaño medio que irrigan los nódulos tumorales con el objetivo de producir isquemia y, finalmente, exponer las células tumorales a altas concentraciones de agentes citotóxico

La radioembolización se ha comparado con TACE en varios estudios. En el estudio de Gardini et al. se realiza un metaanálisis de los ensayos clínicos randomizados publicados hasta 2017 comparando ambos procedimientos, encontrándose publicados únicamente tres de ellos [146–148]. No se encontraron diferencias en la SG a 1 año entre los dos procedimientos (OR= 1.31; IC 95% 0.56-3.04, $p= 0.53$) así como tampoco en la SLE a un año (OR= 0.23; IC 95% 0.02-2.45, $p= 0.22$). Así mismo, a una alta proporción de pacientes se les realizó TH en el grupo tratado con TARE (30% vs 20.8%), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (OR= 0.68; IC 95% 0.23-2.01, $p= 0.49$). Como estos autores indican, la principal limitación de este metaanálisis es que ninguno de los ensayos clínicos tenía la supervivencia como objetivo principal, las muestras eran pequeñas y presentaban una

alta heterogeneidad entre estudios en cuanto a la SLE (I^2 test= 76%); además, las poblaciones objetivo tampoco eran homogéneas en todos los ensayos [149].

En el momento actual, está pendiente de analizar los resultados del ensayo clínico TRACE cuyo objetivo principal es la progresión tumoral en los pacientes tratados con TACE y TARE en hepatocarcinomas en estadio intermedio [150].

Por otro lado, se ha comparado la TARE con el tratamiento sistémico en los pacientes con CHC en estadio avanzado. En el ensayo clínico SARA, realizado en población europea, se estudiaron aquellos pacientes diagnosticados de CHC BCLC-C con función hepática Child-Pugh A/B que no eran candidatos a tratamiento curativo o bien que hubieran sido tratados previamente con TACE y no hubiera sido efectiva; en este trabajo los pacientes fueron aleatorizados para recibir tratamiento con Sorafenib o con TARE. El estudio no mostró diferencias en cuanto a la SG entre TARE y Sorafenib: la media de supervivencia fue de 8 meses (IC 95% 6.7-9.9) en el grupo TARE vs 9.9 meses (IC 95% 8.7-11.4) en el grupo Sorafenib (HR 1.15; IC 95% 0.94-1.14, $p= 0.18$ para TARE vs Sorafenib). No obstante, la respuesta tumoral, la calidad de vida y la seguridad fue significativamente mejor en el grupo tratado con TARE [151]. El ensayo clínico SIRVENIB, realizado en población asiática y con un diseño semejante, mostró resultados similares al ensayo SARA, no obteniendo diferencias en cuanto a SG entre ambos tratamientos (SG media de 8.8 y 10 meses para pacientes tratados con TARE y Sorafenib respectivamente, HR 1.1; IC 95% 0.9-1.4, $p= 0.36$). Adicionalmente, la tasa de respuesta del tumor fue mejor para los pacientes que recibieron tratamiento con TARE con menores efectos adversos en comparación con los pacientes tratados con Sorafenib [152].

Por último, el ensayo clínico SORAMIC comparó el tratamiento combinado de TARE y Sorafenib con Sorafenib únicamente como tratamiento paliativo en el CHC. De forma general no se objetivaron diferencias a nivel de la SG entre ambos grupos. Sin embargo, el análisis por subgrupos de la población analizada por cada protocolo sugirió un beneficio de supervivencia en los pacientes ≤ 65 años tratados con Sorafenib + TARE (HR 0.65; IC 95% 0.43-1, $p= 0.046$), en pacientes no cirróticos (HR 0.46; IC 95% 0.25-0.86, $p= 0.013$) y en pacientes con CHC de etiología no alcohólica (HR 0.63; IC 95% 0.45-0.89, $p= 0.009$). Por otro lado, se objetivaron mayores efectos adversos de grado 3-4 de la escala CTCAE (Criterios de terminología común para eventos adversos, *Common Terminology Criteria for Adverse Events*) en el grupo de tratamiento combinado con respecto al grupo de tratamiento sistémico 64.8% vs 53.3%, respectivamente ($p= 0.036$) [153].

Con respecto a lo recogido en la última actualización de las guías americana y europea, éstas consideran que el tratamiento con TARE muestra un buen perfil de seguridad y un buen control local del tumor, pero no muestra un beneficio en la SG en comparación con Sorafenib en pacientes con CHC en estadio

avanzado. Además, señalan que son necesarios más estudios comparativos entre TACE y TARE en pacientes con CHC en estadio intermedio o en estadio temprano no candidatos para resección, trasplante o ablación, con el fin de establecer una recomendación [57,58].

1.8.2.3. Tratamiento sistémico

La quimioterapia sistémica no puede considerarse como tratamiento estándar en el CHC debido a la combinación de su escasa eficacia y alta toxicidad. La escasa eficacia podría deberse a la resistencia intrínseca causada por la sobreexpresión de genes de resistencia a múltiples fármacos que se observa en la mayoría de los tumores. Así mismo, la cirrosis subyacente aumenta el riesgo de efectos adversos graves ya que muchos fármacos quimioterápicos se metabolizan o eliminan a través del hígado. Finalmente, la posible reactivación viral en caso de cirrosis vírica debida a la inmunosupresión inducida por la quimioterapia, puede producir un efecto tóxico aditivo [154].

Es por ello que los avances en el conocimiento de las vías moleculares que se alteran en el CHC han permitido desarrollar tratamientos que actúen contra estas dianas. El ensayo clínico multicéntrico SHARP, que se llevó a cabo en pacientes diagnosticados de CHC en estadio avanzado, tuvo como objetivo estudiar la supervivencia de los pacientes a los que se les administró Sorafenib, un inhibidor multiquinasa que actúa sobre el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y el protooncogén Ser-Thr quinasa Raf-1 y B-Raf, los cuales están implicados en la patogénesis molecular del CHC. Los pacientes se asignaron de forma aleatoria a dos grupos de tratamiento Sorafenib vs placebo, objetivándose una supervivencia media mayor en aquellos pacientes tratados con Sorafenib, 10.7 meses vs 7.9 meses (HR 0.69; IC 95% 0.55-0.87, $p < 0.001$) y un mayor tiempo de progresión radiológica en los pacientes tratados con Sorafenib, 5.5 meses vs 2.8 meses ($p < 0.001$); no obstante, no se objetivó respuesta completa en ningún paciente. En el segundo análisis intermedio previsto, se produjeron 321 muertes con lo que el estudio se detuvo [155].

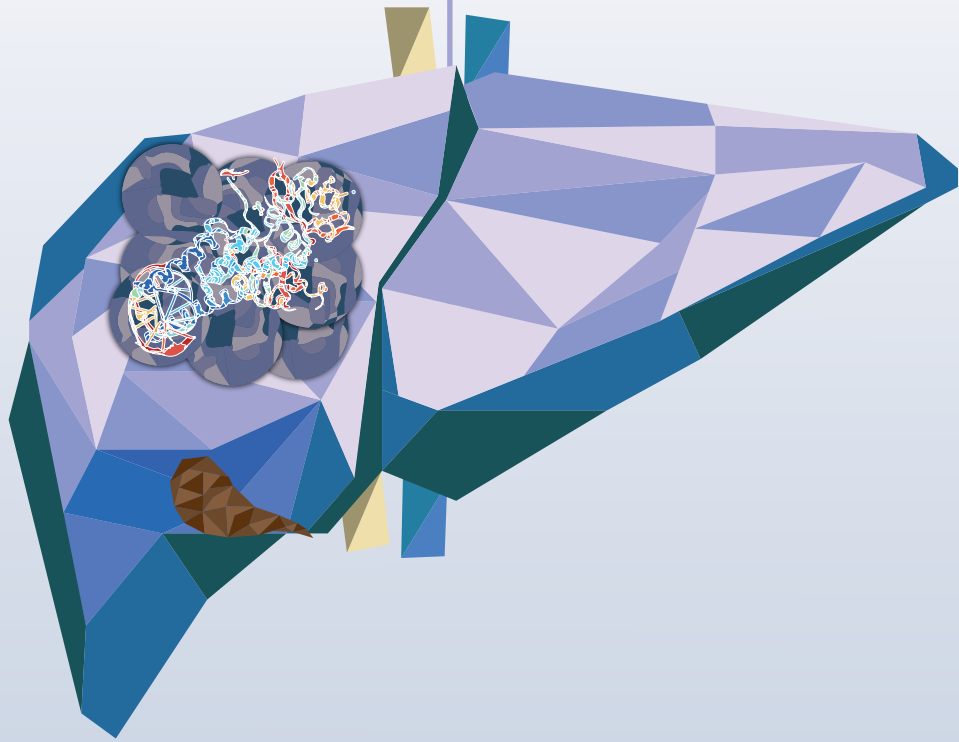
Otro de los tratamientos sistémicos con diana molecular de primera línea es el Lenvatinib, también se trata de un inhibidor multiquinasa que actúa sobre los receptores VEGF-R, receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGF-R), PDGFR, RET y KIT. El estudio de no inferioridad REFLECT llevado a cabo en pacientes con CHC no reseccable con una función hepática conservada (Child-Pugh A), demostró la no inferioridad de este tratamiento en comparación con Sorafenib: la media de SG fue de 13.6 meses vs 12.3 meses, respectivamente (HR 0.92; IC 95% 0.79-1.06). Así mismo, Lenvatinib demostró una mejora estadística y clínicamente significativa a nivel de la SLE de 7.4 meses vs 7.4 meses, respectivamente (HR 0.66;

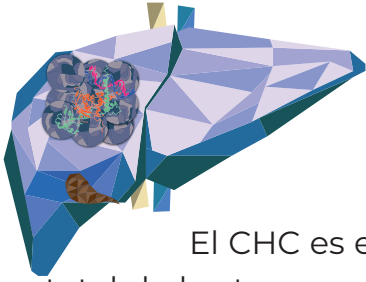
IC 95% 0.57-0.77, $p < 0.0001$) siendo el tiempo medio transcurrido hasta la progresión de 8.9 vs 3.7 meses, respectivamente (HR 0.63; IC 95% 0.53-0.73, $p < 0.0001$) y la tasa de respuesta objetiva (OR 3.13; IC 95% 2.15-4.56, $p < 0.001$) [156].

Como tratamiento de segunda línea en aquellos pacientes que progresan a pesar del tratamiento con Sorafenib, el ensayo clínico RESORCE mostró que en pacientes diagnosticados de CHC con función hepática preservada (Child-Pugh A) y con progresión radiológica con Sorafenib, el tratamiento con Regorafenib, inhibidor multiquinasa, en comparación con placebo produce un beneficio en la supervivencia de los pacientes, siendo la SG media de 10.6 meses en aquellos tratados con Regorafenib vs 7.8 meses los tratados con placebo (HR 0.63; IC 95% 0.50-0.79, $p < 0.0001$), así como una mejora significativa en la respuesta tumoral 11% vs 4%, $p = 0.0047$) y en el control de la enfermedad (65% vs 36%, $p < 0.0001$) [157].

Estos tratamientos están recogidos en las últimas actualizaciones de las guías americana y europea. El Sorafenib es considerado el tratamiento sistémico de primera línea estándar para el CHC tanto en pacientes con una función hepática bien conservada (Child-Pugh A) y con tumores avanzados (BCLC-C) como en estadios más tempranos que progresan o que no son aptos para terapias loco-regionales. Así mismo, el Lenvatinib también está considerado tratamiento de primera línea en aquellos pacientes con una función hepática conservada (Child-Pugh A), un buen *Performance Status* y con tumores avanzados (BCLC-C) sin invasión de la vena porta principal, o en aquellos tumores que progresan o no sean aptos para las terapias loco-regionales. Como tratamiento de segunda línea se propone el Regorafenib en aquellos pacientes que toleran y progresan con Sorafenib, que presentan una función hepática conservada (Child-Pugh A) y un buen *Performance Status* [57,58].

2. JUSTIFICACIÓN





JUSTIFICACIÓN

El CHC es el tumor hepático más frecuente, supone entre el 70-90% del total de los tumores primarios hepáticos en el mundo. Su desarrollo se relaciona con la exposición a virus hepatotropos, así como al alcohol, la presencia de enfermedad hepática no alcohólica y la cirrosis hepática entre otras causas.

Como marcadores pronósticos de la enfermedad se relacionan los valores séricos de AFP, así como factores inherentes al tumor como es el tamaño, el número de nódulos, la satelitosis, la invasión vascular, el grado de diferenciación tumoral y la presencia de enfermedad extrahepática. Sin embargo, a pesar de que existen actualmente varios sistemas de estadificación para predecir el pronóstico, sobre los cuales nos basamos para plantear el tratamiento óptimo y personalizado de estos pacientes, en la práctica clínica no disponemos de un sistema ideal que pueda ser aplicado a cada paciente para predecir la supervivencia. Esto nos lleva a pensar que existen variables no estudiadas hasta ahora que puedan influir en el comportamiento tumoral.

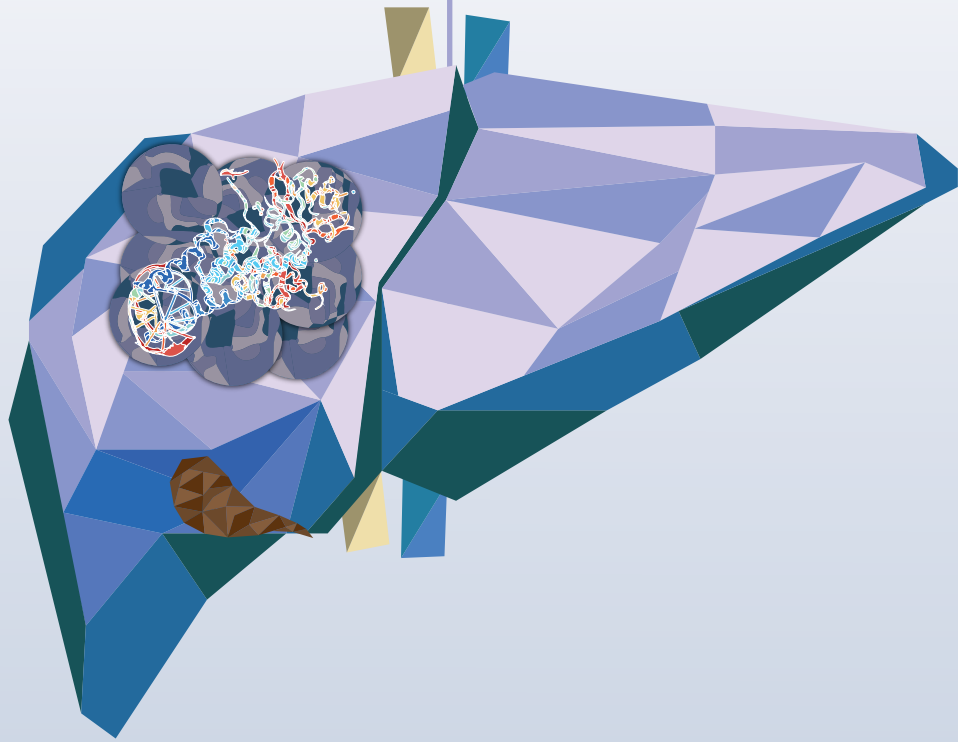
Por otro lado, el receptor de hidrocarburos de arilo/ receptor de dioxina (AhR) es un factor de transcripción que media los efectos tóxicos y carcinogénicos de un grupo de agentes químicos incluyendo los hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos polihalogenados y dioxinas (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, TCDD). AhR se expresa de manera constitutiva en una gran cantidad de tejidos de mamíferos, con las mayores cantidades de ARN mensajero (mARN) en hígado, riñón, pulmón, corazón, timo y placenta.

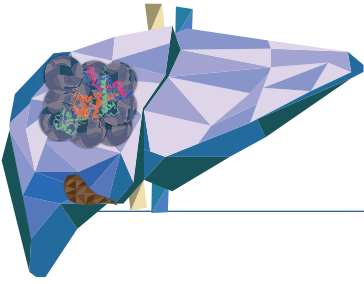
El hígado es un sitio importante para el metabolismo de los xenobióticos resultantes de la contaminación ambiental y de aquellos producidos a partir de la ingesta alimentaria. Muchos xenobióticos y sus metabolitos tienen efectos perjudiciales y carcinogénicos en los hepatocitos. Diferentes estudios han demostrado que, en los hepatocitos, la desregulación de AhR conduce a la esteatosis y al metabolismo aberrante del colesterol entre otros fenotipos. Sin embargo, los mecanismos patogénicos y el posible valor pronóstico de la expresión de AhR en el CHC aún no se han dilucidado. Además, en ratones nulos con AhR, la ablación de la expresión de AhR resulta en cambios pleiotrópicos que conducen a enfermedades cardiovasculares, fibrosis hepática, reducción del tamaño del hígado, deficiencia innata de células inmunes, fibrosis dérmica, acumulación de retinoides hepáticos y reducción de la esperanza de vida. Las evidencias hasta ahora publicadas sugieren, por tanto, que AhR regula no sólo la detoxificación xenobiótica, sino que

también podría tener funciones endógenas críticas. Sin embargo, las vías reguladoras que integran AhR en transducción de señales y en enfermedades humanas siguen siendo poco conocidas.

Es por todo ello que actualmente se hace indispensable plantear nuevas líneas de investigación y nuevas metodologías para conocer la expresión del CHC en el ser humano en función de los aportes moleculares y clínicos, que nos permitan establecer relaciones entre estos hallazgos para trazar el tratamiento y pronóstico de estos paciente de forma individualizada.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Existe una correlación entre los factores clínico-patológicos y la expresión molecular de determinadas proteínas de señalización celular como AhR, β -catenina, proteína asociada a Yes (YAP) y el coactivador transcripcional con unión al dominio PDZ (TAZ) en los pacientes con diagnóstico de CHC. Esta correlación influye tanto en la SG como en la SLE de los pacientes.

3.2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la literatura publicada sobre la expresión molecular y su relación con procesos cancerígenos, así como los factores actuales clínicos de mal pronóstico para el CHC, nos planteamos como objetivos del proyecto:

3.2.1. Objetivo principal

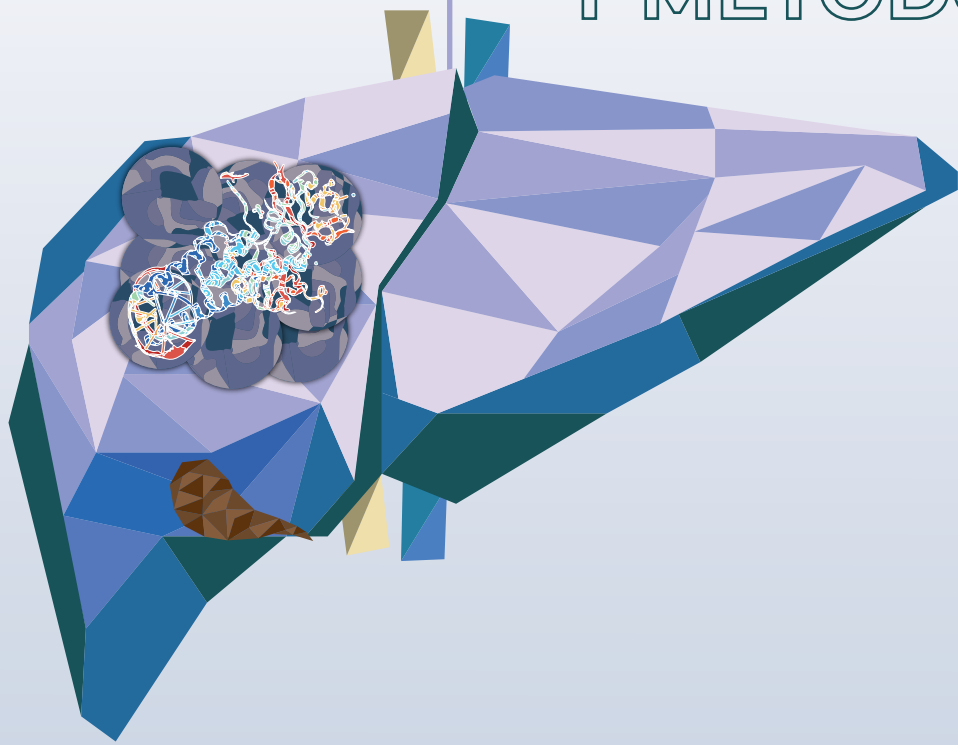
Establecer una correlación entre las propiedades clínicas del CHC y sus características moleculares analizando la expresión de proteínas con potencial valor en el manejo de este tipo de pacientes.

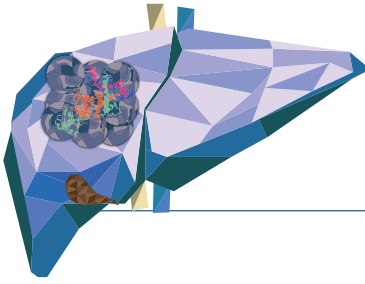
3.2.2. Objetivo secundarios

- Correlacionar la expresión molecular del receptor AhR con los hallazgos clínicos de los pacientes intervenidos de CHC.
- Correlacionar la expresión molecular del intermediario de señalización β -catenina con los hallazgos clínicos de los pacientes intervenidos de CHC.
- Correlacionar la expresión molecular del efector de la ruta Hippo YAP con los hallazgos clínicos de los pacientes intervenidos de CHC.
- Correlacionar la expresión molecular del efector de la ruta Hippo TAZ con los hallazgos clínicos de los pacientes intervenidos de CHC.
- Establecer un algoritmo diagnóstico o, alternativamente, identificar aquellas variables clínicas y moleculares que de ser localizadas durante el diagnóstico y el estudio de estos pacientes nos permitan seleccionar aquellos tumores

que presenten peor pronóstico.

4. MATERIAL Y MÉTODOS





MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de cohortes, observacional y prospectivo sobre la serie de pacientes adultos diagnosticados e intervenidos de CHC en el Servicio de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante Hepático del Hospital Universitario de Badajoz, a los que se les han tomado muestras de tejido hepático sano y tumoral intraoperatoriamente en el período comprendido entre el 1 de enero de 2015 hasta el 1 de enero de 2021.

4.2. PACIENTES

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores ≥ 18 años.
- Diagnóstico preoperatorio de CHC mediante prueba de imagen diagnóstica (Criterios BCLC, *Figura 6* [158]), no precisando de confirmación histológica mediante biopsia.
- Pacientes con indicación quirúrgica (TH, Resección o Ablación por abordaje quirúrgico abierto o laparoscópico).
- Firma del consentimiento informado para la intervención, así como para la toma de tejido hepático intraoperatoriamente.

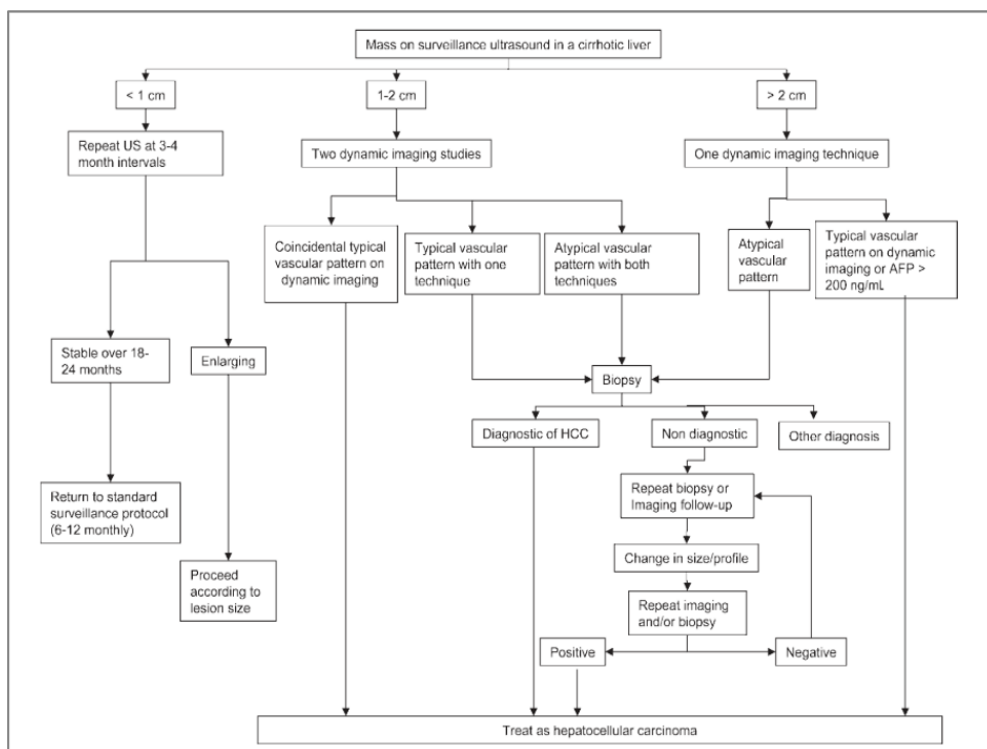


Figura 6: Algoritmo diagnóstico para el CHC propuesto por el grupo BCLC

Criterios de exclusión:

- Pacientes diagnosticados de CHC que presentan hepatocolangiocarcinoma en el estudio histológico de la pieza quirúrgica una vez intervenidos.
- Pacientes diagnosticados de CHC que presentan en el estudio histológico de la pieza quirúrgica otro diagnóstico que no sea CHC.

4.3. DEFINICIÓN DE VARIABLES OBJETO DE ESTUDIO

4.3.1. Definición de las variables dependientes

- Supervivencia libre de enfermedad (SLE): Se considera SLE al periodo de tiempo comprendido entre la fecha de la intervención quirúrgica y la fecha de la primera prueba de imagen diagnóstica de posible recidiva tumoral.
- Supervivencia global (SG): Se considera SG al periodo de tiempo transcurrido entre la fecha de la intervención quirúrgica y la fecha del último seguimiento o la fecha de exitus del paciente.

4.3.2. Definición de las variables independientes

Las variables independientes recogidas de los pacientes han sido divididas en seis bloques:

- Datos prequirúrgicos del paciente.
- Datos quirúrgicos.
- Datos del ingreso hospitalario.
- Seguimiento del paciente postratamiento.
- Resultados Anatomopatológicos del tumor.
- Resultados Biomoleculares del tumor.
- seguimiento o la fecha de exitus del paciente.

4.3.2.1. Datos prequirúrgicos del paciente

En este bloque se han incluido datos relacionados con el estado del paciente previo a la intervención quirúrgica.

- **Edad (años):** Se ha incluido la fecha de nacimiento del paciente y se

ha calculado la edad en años en el momento de la intervención quirúrgica.

- **Género (H/M):** Se ha considerado el género del paciente de forma binaria siendo las categorías Hombre y Mujer.
- Antecedentes previos de serología vírica positiva.
 - o **Infección por VHC (Sí/No):** Presencia de anticuerpos anti-HCV para el VHC en el momento de la intervención quirúrgica.
 - o **Infección activa por VHC (Sí/No):** Consideramos infección activa la presencia de ácido ribonucleico del VHC (RNA-VHC) positivo en el momento de la intervención quirúrgica.
 - o **Infección por VHB (Sí/No):** Presencia de antígeno HBsAg o anticuerpos contra la proteína core para el VHB (Anti-HBc) en el momento de la intervención quirúrgica.
 - o **Infección activa por VHB (Sí/No):** Consideramos infección activa la presencia de antígenos HBsAg y HBeAg, de anticuerpos Anti-HBc IgM o la presencia de carga viral positiva en el momento de la intervención quirúrgica.
 - o **Infección por VIH (Sí/No):** Presencia de anticuerpos contra el VIH en el momento de la intervención quirúrgica.
 - o **infección activa por VIH (Sí/No):** Consideramos infección activa la presencia de carga viral positiva en el momento de la intervención quirúrgica.
- Tratamientos previos del tumor: Se incluyen en este apartado todos aquellos tratamientos realizados sobre el tumor antes de la intervención quirúrgica.
 - o **QETA (Sí/No):** Se considera si se ha realizado este procedimiento como variable dicotómica con dos categorías: "sí" o "no". No se tiene en cuenta el número de sesiones ni el grado de respuesta al procedimiento.
 - o **Ablación (Sí/No):** Se considera si se ha realizado este procedimiento como variable dicotómica con dos categorías: "sí" o "no". No se tiene en cuenta el número de sesiones ni el grado de respuesta al procedimiento. Así mismo, tampoco hacemos distinción entre si el procedimiento realizado ha sido mediante Radiofrecuencia o Microondas. No se ha realizado alcoholización.
 - o **Tratamiento combinado QETA y Ablación (Sí/No):** Se considera si

se han realizado ambos procedimientos como variable dicotómica con dos categorías: “sí” o “no”. No se tiene en cuenta el número de sesiones ni el grado de respuesta al procedimiento, así como tampoco diferenciamos si el procedimiento se ha realizado mediante Radiofrecuencia o Microondas. No se ha realizado alcoholización.

• Determinación de valores analíticos previos a la intervención quirúrgica: Se recogen los valores analíticos hematológicos, de estudio de coagulación y bioquímicos según la analítica disponible en la fecha más próxima a la intervención y con un periodo máximo de tres meses anteriores a la misma.

o Hemograma

- **Hemoglobina (g/dl)**
- **Recuento de hematíes (millones/ μ l)**
- **Recuento leucocitario (miles/ μ l)**
- **Recuento de neutrófilos (miles/ μ l)**
- **Recuento de linfocitos (miles/ μ l)**
- **Recuento de plaquetas (miles/ μ l)**

o Coagulación

- **INR (International normalized ratio)**

o Bioquímica

- **Creatinina (mg/dl)**
- **Albúmina (mg/dl)**
- **Bilirrubina total (mg/dl)**
- **AFP (ng/ml)**

o **Índice Neutrófilos/Linfocitos (INL)**, cociente entre el número de neutrófilos absolutos y el número de linfocitos absolutos prequirúrgicos.

o **Índice Plaquetas/Linfocitos (IPL)**, cociente entre el número de neutrófilos absolutos y el número de linfocitos absolutos prequirúrgicos.

o **Índice de inmunidad-inflamación sistémica (IIS)**, para su cálculo se emplea la siguiente fórmula [159]:

$$\text{IIS} = \text{Plaquetas (miles/ μ l)} \times \text{Neutrófilos (miles/ μ l)} / \text{Linfocitos (miles/ μ l)}$$

• **Model for End-Stage Liver Diseases (MELD)** en el momento de la intervención quirúrgica. Indicador pronóstico en pacientes con enfermedad hepática crónica avanzada en general y en candidatos a trasplante de hígado en particular a partir de los valores séricos de bilirrubina, INR y creatinina; para su cálculo se emplea la siguiente fórmula [133]:

$3.8 * \text{Log}_e (\text{bilirrubina [mg/dl]}) + 11.2 * \text{Log}_e (\text{INR}) + 9.6 * \text{Log}_e (\text{creatinina [mg/dl]}) + 6.4$

4.3.2.2. Datos quirúrgicos

En este bloque se recogen los datos que corresponden al momento de la intervención quirúrgica propiamente dicha.

- Fecha de tratamiento quirúrgico (dd/mm/aaaa).
- Tipo de cirugía realizada

- o **Resección quirúrgica (Sí/No).** Variable dicotómica con dos categorías. No se realiza distinción entre cirugía abierta o laparoscópica.

- o **Trasplante (Sí/No).** Variable dicotómica con dos categorías. No se realiza distinción entre donante por muerte encefálica o donante en asistolia. No se ha realizado donante vivo.

- o **Ablación (Sí/No).** Variable dicotómica con dos categorías. No se realiza distinción entre RFA o Ablación. No se ha realizado alcoholización.

- o **Cirugía combinada resección + ablación (Sí/No).** Variable dicotómica con dos categorías, considerando si se han realizado ambos procedimientos. No se realiza distinción entre cirugía abierta o laparoscópica, así como tampoco entre RFA o Ablación. No se ha realizado alcoholización.

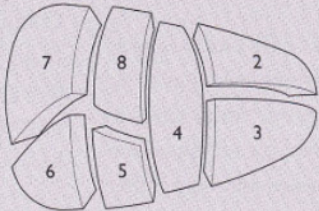
- Tipo de resección quirúrgica realizada: En el caso de que al paciente se le haya practicado una resección quirúrgica, se determina el tipo de resección en función de los segmentos de parénquima hepático extirpados, acorde con la segmentación hepática del consenso de Brisbane del año 2000 (*Figura 7*) [160].

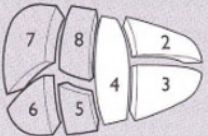
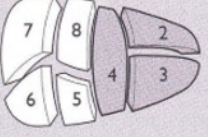
- o **Hepatectomía menor (Sí/No):** correspondiente a la resección de hasta 3 segmentos hepáticos.

- o **Hepatectomía mayor (Sí/No):** correspondiente a la resección del hemihígado derecho o izquierdo.

Table 1. First-order division

Schematic diagram of the segments for reference in the table (for purposes of clarity Sg1 is not shown)



Anatomical term	Couinaud segments referred to	Term for surgical resection	Diagram (pertinent area is in heavy black outline)
Right hemiliver OR Right liver	Sg5-8(+/-Sg1)	Right hepatectomy OR Right hemihepatectomy (stipulate +/- segment 1)	
Left hemiliver OR Left liver	Sg2-4 (+/-Sg1)	Left hepatectomy OR Left hemihepatectomy (stipulate +/- segment 1)	

Border or watershed:
The border or watershed of the first-order division which separates the two hemilivers is a plane that intersects the gallbladder fossa and the fossa for the IVC and is referred to as the *midplane of the liver*.

Figura 7: División hepática de primer orden según la "Terminología de anatomía y resecciones hepáticas" del consenso de Brisbane

- o **Resección únicamente de la lesión (Sí/No):** correspondiente a la resección local de la lesión con margen oncológico de seguridad, pero sin llegar a ser resección segmentaria.
- **Transfusiones recibidas intraoperatoriamente (Sí/No).** Se considera cualquier tipo de hemoderivado (Concentrado de hematíes, Plasma fresco o Plaquetas).
 - Necesidades transfusionales
 - o **Hematíes (número de concentrados):** Cada concentrado corresponde a 300 ml de hematíes.
 - o **Plaquetas (número de pool):** Cada pool de plaquetas tiene un rendimiento de 30.000 plaquetas.
 - o **Plasma (número de unidades):** Una unidad de plasma corresponde a 300 ml de plasma.

4.3.2.3. Datos hospitalarios

En este apartado se recogen aquellos datos correspondientes al tiempo perioperatorio desde que el paciente ingresa para ser intervenido hasta que es dado de alta hospitalaria.

- **Tiempo de hospitalización (días):** Período de tiempo comprendido entre la fecha de ingreso hospitalario y la fecha de alta hospitalaria. En el caso de exitus durante el período de hospitalización, la fecha límite será la fecha de exitus del paciente. Hay que tener en cuenta que, en nuestro protocolo de hospitalización para intervención quirúrgica programada, al paciente se le realiza el estudio preoperatorio y la consulta con el médico especialista en Anestesiología de forma ambulatoria, de manera que ingresa la tarde del día anterior a la intervención quirúrgica.
- **Complicaciones postquirúrgicas (Sí/No):** Se recoge la presencia o ausencia de alteraciones en el curso clínico normal intrahospitalario del paciente que se hayan producido desde la fecha de la intervención quirúrgica hasta pasados 90 días de la misma.
- **Clasificación de la complicación quirúrgica:** Se clasifica la complicación aparecida tras la intervención quirúrgica en función de la clasificación Clavien- Dindo (*Tabla 5*) [161].

Tabla 5: Clasificación de complicaciones quirúrgicas Clavien- Dindo

Grado	Definición
I	Cualquier desviación del postoperatorio normal sin la necesidad de tratamiento farmacológico o que precisen intervención quirúrgica, endoscópica o radiológica. Los tratamientos permitidos son: fármacos del tipo antieméticos, antipiréticos, analgésicos, diuréticos, electrolitos y fisioterapia. Este grado también incluye apertura de infección de herida a pie de cama.
II	Requiere tratamiento farmacológico con fármacos distintos a los permitidos para las complicaciones grado I. Se incluyen las transfusiones de sangre y la nutrición parenteral total.
III	Requiere intervención quirúrgica, endoscópica o radiológica.
IIIa	Intervenciones que no requieren anestesia general
IIIb	Intervenciones bajo anestesia general
IV	Complicaciones que amenazan la vida (incluidas complicaciones SNC)* que requieren manejo en UCIM/UCI
IVa	Disfunción de un único órgano (incluyendo diálisis)
IVb	Disfunción multiorgánica
V	Muerte del paciente
Sufijo "d"	Si el paciente padece complicaciones durante el periodo de alta hospitalaria, el sufijo "d" (discapacidad) se añade al correspondiente grado de complicación. Esta etiqueta indica la necesidad de seguimiento para evaluar completamente las complicaciones.
	*Hemorragia cerebral, accidente cerebrovascular isquémico, sangrado subaracnoideo, se excluyen accidente isquémico transitorio. SNC, sistema nervioso central; UCMI, unidad de cuidados intermedios; UCI, unidad de cuidados intensivos.

4.3.2.4. Seguimiento del paciente postratamiento

En este bloque se recogen los datos procedentes al tiempo comprendido desde que el paciente es dado de alta hospitalaria hasta la fecha de finalización de este estudio o bien hasta el día del exitus si se produce durante el seguimiento.

- **Exitus (Sí/No):** Se consideran vivos a los pacientes que permanecen vivos al final del seguimiento y muertos a aquellos que han fallecido durante el mismo, independientemente de que la causa del fallecimiento esté relacionada o no con el tumor.

- **Tiempo de seguimiento (meses):** Período de tiempo comprendido entre la fecha en la que se lleva a cabo el tratamiento quirúrgico sobre el CHC y la fecha del último día de seguimiento del estudio o la fecha de exitus del paciente.

- **Tiempo libre de enfermedad (meses):** Período de tiempo comprendido entre la fecha en la que se lleva a cabo el tratamiento quirúrgico sobre el CHC y la fecha en la que se produce la recidiva. En aquellos pacientes en los que no se produce recidiva, la fecha límite será la del último día de seguimiento del estudio. En los pacientes que fallecen sin recidiva, la fecha límite será la fecha de exitus.

- **Presencia de recidiva tumoral del paciente (Sí/No):** El diagnóstico de recidiva se realiza por la presencia de imagen sospechosa en las pruebas de imagen (ecografía, TC tórax, TC abdominal, RM de abdomen, gammagrafía ósea, etc.) no precisando, generalmente, de confirmación histológica mediante biopsia.

- **Valor de AFP en el momento de la recidiva (ng/ml).**

- Tratamiento realizado ante la recidiva tumoral: Se describen los tratamientos realizados tras la evidencia de recidiva tumoral.

- Sorafenib (Sí/No)
- Ablación (Sí/No)
- Radioembolización (Sí/No)
- QETA (Sí/No)
- Trasplante hepático (Sí/No)
- Resección quirúrgica (Sí/No)
- Otros tratamientos (Sí/No)

4.3.2.5. Resultados anatomopatológicos del tumor

En este apartado se recogen los datos correspondientes al análisis histopatológico del tumor en el caso de que se haya hecho una extirpación del mismo, bien mediante resección o TH.

- **Presencia de cirrosis hepática (Sí/No)**
- **Número de nódulos en la pieza quirúrgica**
- **Tamaño del nódulo mayor en la pieza quirúrgica (mm)**
- Grado de diferenciación tumoral: Variable que hace referencia al grado de diferenciación histológica del tumor según el sistema de Edmonson y Steiner [162].
 - **G1 bien diferenciado**
 - **G2 moderadamente diferenciado**
 - **G3 pobremente diferenciado**
 - **G4 indiferenciado**
- **Invasión vascular del tumor (Sí/No)**
- **Invasión perineural del tumor (Sí/No)**
- **Presencia de satelitosis (Sí/No)**
- **Estadificación TNM** según la 8ª edición (*Tabla 6*) [163].

Tabla 6: 8ª edición Sistema de estratificación de AJCC para el CHCv

Tumor primario (T)		Ganglios linfáticos regionales (N)		Metástasis a distancia (M)	
T1a	Tumor solitario ≤ 2 cm con/sin invasión vascular	Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales	M0	Sin metástasis a distancia
T1b	Tumor solitario >2 cm sin invasión vascular	N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales	M1	Metástasis a distancia
T2	Tumor solitario >2 cm con invasión vascular o tumores multifocales, ninguno > 5 cm	N1	Metástasis en ganglios linfáticos regionales		
T3	Tumores multifocales, al menos uno de ellos > 5 cm				
T4	Tumor único o tumores multifocales de cualquier tamaño que afecte a una rama principal de la vena porta o a una vena suprahepática o tumor/es con invasión directa de órganos adyacentes, diferentes a la vesícula biliar, o con perforación del peritoneo visceral				
Estadificación					
IA	T1a	N0		M0	
IB	T1b	N0		M0	
II	T2	N0		M0	
IIIA	T3	N0		M0	
IIIB	T4	N0		M0	
IVA	Cualquier T	N1		M0	
IVB	Cualquier T	Cualquier N		M1	

4.3.2.6. Resultados biomoleculares del tumor y del tejido no tumoral

En este apartado se recogen los datos procedentes del análisis de los niveles proteicos del tejido del CHC y del tejido no tumoral.

- **AhR (Sobreexpresado/Reprimido/No varía)**
- **Beta-catenina (Sobreexpresado/Reprimida/No varía)**
- **YAP (Sobreexpresado/Reprimido/No varía)**
- **TAZ (Sobreexpresado/Reprimido/No varía)**

4.4. EXTRACCIÓN, CONSERVACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

4.4.1. Extracción de muestras biológicas

Durante el acto operatorio se llevó a cabo la extracción de muestras biológicas. Una vez resecada la pieza quirúrgica, con la ayuda de una hoja de bisturí, se tomó una muestra de aproximadamente 1 cc de tejido tumoral y 1 cc de tejido no tumoral y se sumergieron de forma independiente en 5 ml de RNA later^{®1} depositado en recipiente para muestras con tapón de rosca de poliestireno, EURO-TUBO DELTALAB[®] de 30 ml (*Imagen 1 y 2*).

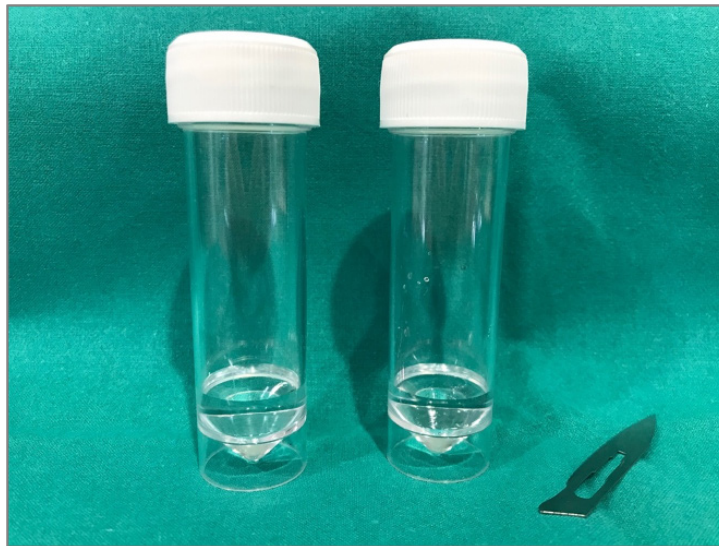


Figura 8: Material utilizado para la recogida de muestras biológicas. Recipientes de poliestireno con RNA later y hoja de bisturí nº36

En el caso de que el procedimiento quirúrgico que se llevase a cabo fuese un tratamiento ablativo, antes de realizar dicha técnica, se procedía a la toma de las muestras mediante el mismo procedimiento anteriormente descrito, pero en lugar de sobre la pieza quirúrgica, in situ en el paciente.

¹ Reactivo de estabilización del ARN, conservación a temperatura ambiente (15-20oC). Proveedor QIAGEN.

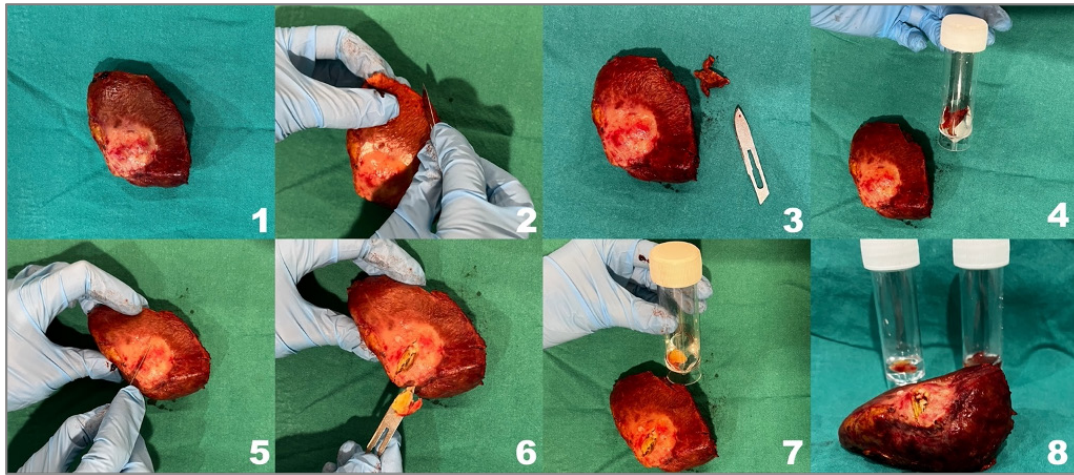


Figura 9: Secuencia de extracción de muestras biológicas de la pieza quirúrgica

1. Pieza quirúrgica con lesión, 2. Resección muestra de tejido no tumoral, 3. Muestra de 1 cc de tejido no tumoral, 4. Conservación muestra no tumoral en recipiente RNA later, 5. Resección muestra de tejido tumoral, 6. Muestra de 1cc de tejido tumoral, 7. Conservación muestra tumoral en recipiente RNA later, 8. Recipientes con muestras biológicas y pieza quirúrgica.

4.4.2. Conservación de muestras biológicas

Tras la extracción de las muestras de tejido, los recipientes de poliestireno se conservaron a una temperatura de 4°C en el depósito de material biológico del hospital denominado Biobanco. En caso de que la extracción se realizara durante el fin de semana, las muestras permanecieron igualmente a una temperatura de 4°C en el refrigerador localizado en el área de quirófano hasta poder ser trasladadas al Biobanco.

Una vez en el Biobanco, el tejido humano se extrae del recipiente donde se encontraba sumergido en el reactivo de estabilización del RNA, y mediante hoja de bisturí, se fraccionó en secciones de 0.2 g y se depositó en criotubos con tapón de rosca codificados de polipropileno astiK's® de 1.8 ml. A continuación, fueron numerados y almacenados a -80°C hasta la preparación de los extractos proteicos.

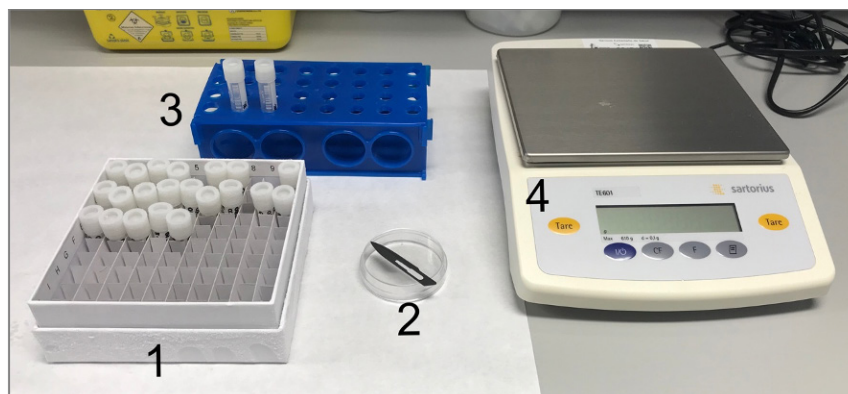


Figura 10: Material utilizado para la conservación de muestras biológicas

1. Recipiente donde se depositan los criotubos ya con las muestras seccionadas para ser almacenados a -80°C; 2. Hoja de bisturí para fraccionar las muestras nº36; 3 Gradilla con criotubos codificados donde se depositarán las muestras seccionadas; 4. Balanza.

4.4.3. Análisis de niveles proteicos mediante inmunoblotting (Western-blotting)

4.4.3.1. Preparación de los extractos proteicos

La preparación de los extractos proteicos se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, Institutos Universitarios de Investigación de la Universidad de Extremadura que se localiza a 1.0 km del Hospital Universitario de Badajoz. El transporte de las muestras se realizó en un contenedor de poliestireno expandido en el que se sumergieron los criotubos en hielo seco, manteniendo así el estado de congelación de las muestras.

Para la preparación de los extractos proteicos, se tomaron los criotubos donde teníamos depositado de forma independiente el tejido de los hepatocarcinomas humanos así como el tejido no tumoral. El tejido congelado se disgregó mecánicamente utilizando un mortero y posteriormente un homogeneizador eléctrico. El homogeneizado resultante se lavó dos veces con tampón fosfato salino (PBS) frío, centrifugándose a 2000 x g durante 2 minutos. A continuación, el pellet de tejido se resuspendió en 400 µl de tampón de lisis² durante 40 minutos a 4°C con agitación constante y posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 x g y 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes con los extractos proteicos y se almacenaron congelados a -20°C hasta su uso.

4.4.3.2. Medida de la concentración de proteína

La concentración de proteína de los extractos celulares se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando el reactivo *Coomassie plus protein assay reagent (Pierce)* y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Tras desarrollar la reacción colorimétrica, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm en el lector PlateReader AF2200 (Eppendorf). Los valores obtenidos se interpolaron en una recta patrón construida con cantidades conocidas de BSA.

4.4.3.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa

Para la realización de electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida se ha utilizado el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli [164]. Alícuotas conteniendo 30 µg de los correspondientes extractos proteicos se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de carga para pro-

² **Tampón de lisis para extractos proteicos totales:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, sacarosa 270 mM, β-glicerol-fosfato 10 mM, pirofosfato sódico 5 mM, fluoruro sódico 50 mM, Tritón X-100 1%, ortovanadato sódico 0.1 mM, β-mercaptoetanol 1%, inhibidor de proteasas COMPLETE 4 µg/µl.

teínas³ y se desnaturalizaron por incubación a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas se separaron en función de su peso molecular sometiénolas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes por la presencia del detergente iónico dodecil sulfato de sodio (SDS) (SDS-PAGE⁴). Se emplearon geles de poliacrilamida a concentraciones finales del 7.5% y 8%, dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Bio-Rad Laboratories*) mediante la aplicación de un campo eléctrico en una cubeta conteniendo una solución de transferencia de composición iónica definida⁵. La transferencia se realizó a 4°C durante 3 horas a 300 mA/h. Después de la transferencia, las membranas fueron teñidas con el colorante reversible Ponceau S⁶, el cual permite comprobar la eficacia del proceso, así como la homogeneidad de carga para las diferentes muestras. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo para Western blot⁷ sin detergente e incubadas con el correspondiente anticuerpo primario empleando la dilución y las condiciones indicadas en el *Anexo I: Tabla de Anticuerpos Primarios*. Tras 4 lavados de 10 minutos cada uno en TBS-T⁸, las membranas se hibridaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario fluorescente empleando la dilución y las condiciones indicadas en el *Anexo II: Tabla de Anticuerpos Secundarios*. A continuación, las membranas fueron sometidas a 5 lavados adicionales de 10 minutos cada uno en TBS-T y a un lavado final de 5 minutos en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM). Las membranas se revelaron utilizando el sistema de adquisición de imágenes para Western Blot basado en la Fluorescencia del Infrarrojo Cercano (NIR) Odyssey CLx (*LI-COR Biosciences*). Finalmente, las membranas fueron escaneadas para su análisis por densitometría de fluorescencia mediante el software Image Studio 5.0.

³ **5 x tampón de carga para proteínas:** Tris-HCl 62.2 mM pH 6.8, SDS 10% (p/v), glicerol 50% (v/v), azul de bromofenol 0.025% (p/v), β -ME 20% (v/v)

⁴ **Tampón de electroforesis:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1% (p/v)

⁵ **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% (v/v)

⁶ **Ponceau S:** Ponceau S 0.5% (p/v), ácido acético 5% (v/v)

⁷ **Solución de bloqueo para Western blot:** leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en TBS

⁸ **TBS-T:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM, Tween-20 0.2% (v/v)

4.5. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

La recogida de datos fue procesada por un sistema informático de datos clínicos prefijado y validado (SSPS).

4.5.1. Análisis estadístico de los datos

Las variables cuantitativas se han descrito con medidas de centralización y de dispersión, por la media y la desviación estándar si siguen una distribución normal o por la mediana y el rango intercuartílico si no tienen una distribución normal tras la aplicación de pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro Wilk.

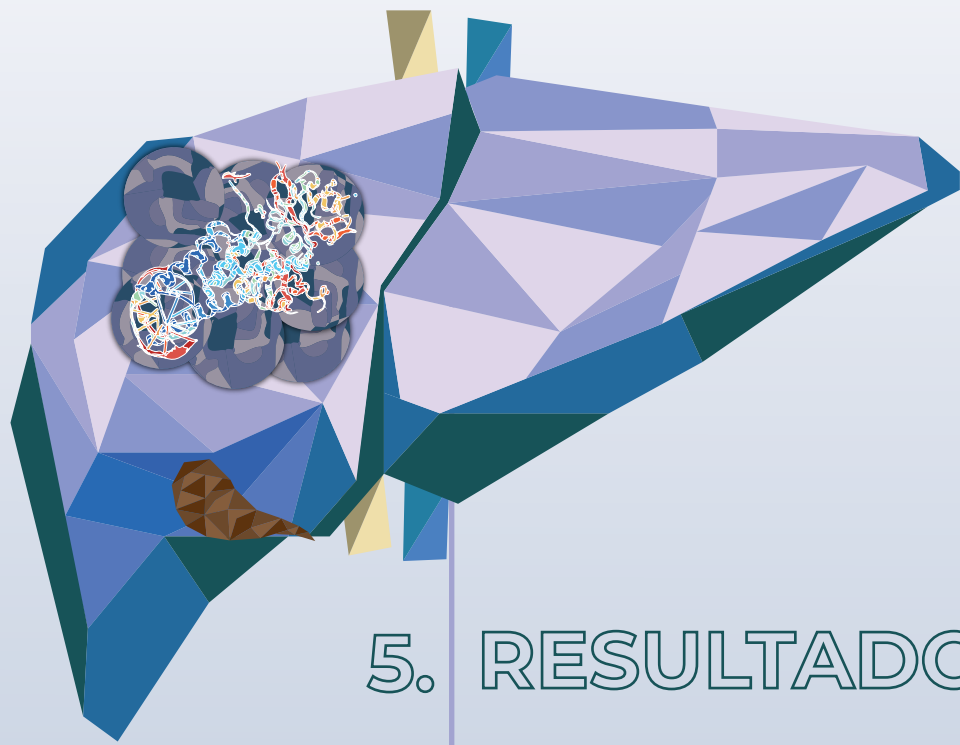
Las variables categóricas, se representan mediante su frecuencia en cada categoría y el porcentaje con respecto al total.

La distribución Chi-cuadrado o el test de Student se utilizaron para comparar variables categóricas o continuas, respectivamente. Se utilizó el test ANOVA para comparación de medias entre variables cuantitativas y categóricas de más de dos categorías. En el caso de que la distribución no fuese homogénea tras la aplicación del test de Levene, se utilizó una prueba no paramétrica para el cálculo del p-valor.

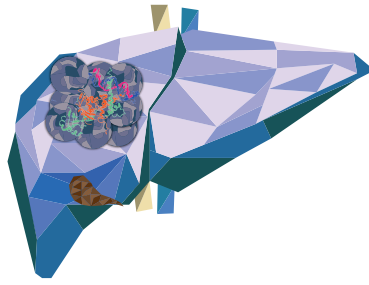
Para el cálculo de la supervivencia sólo se tuvieron en cuenta aquellos pacientes que presentaban como mínimo un período de seguimiento superior a 6 meses. La supervivencia de los pacientes se determinó mediante las curvas de Kaplan-Meier y se compararon mediante la prueba de Log-Rank. Los factores que presentaron durante el análisis univariante una significación estadística con un nivel de $p \leq 0.2$ se introdujeron en el análisis multivariante de riesgos proporcionales de Cox. En los análisis multivariantes, un valor de $p \leq 0.05$ se consideró evidencia estadísticamente significativa independiente.

La curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) se realizó con el índice de Youden [máximo (sensibilidad + especificidad - 1)] para calcular el punto de corte óptimo para INL.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el software IBM SPSS Statistics 21.0.



5. RESULTADOS



RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GENERAL DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

5.1.1. Estudio de variables clínico- epidemiológicas preoperatorias

Entre enero de 2015 y marzo de 2021 se han recogido un total de 81 muestras, de las cuales cumplen criterios de inclusión 48 muestras (*Figura 11*), que corresponden a 48 pacientes intervenidos en el Servicio de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante Hepático del Complejo Hospitalario de Badajoz.

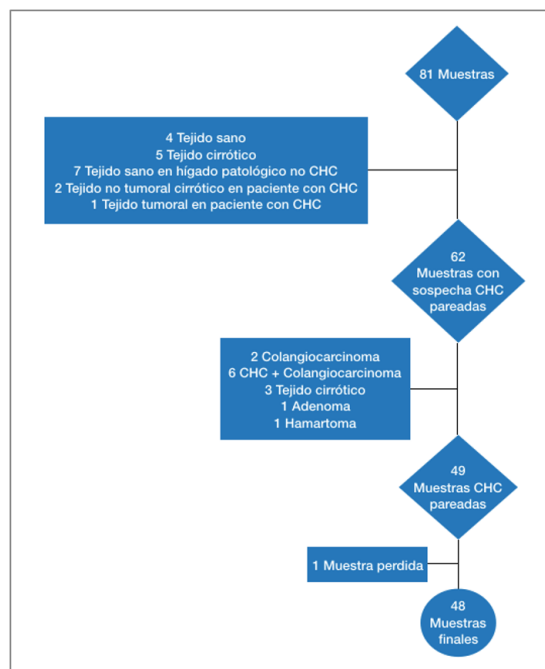


Figura 11: Diagrama de flujo del estudio

La muestra se dividió en pacientes con diagnóstico de CHC sobre hígado cirrótico (T/NTC) correspondiendo a 31 pacientes (64.6%) y pacientes con diagnóstico de CHC sobre hígado no cirrótico (T/NT) correspondiendo a 17 pacientes (35.4%).

La edad media de los pacientes de la muestra fue de 67.29 ± 7.94 años. En cuanto a la distribución por sexo, la población a estudio está formada por 41 hombres (85.4%) y 7 mujeres (14.6%) (*Figura 12*).

Distribución por Sexos

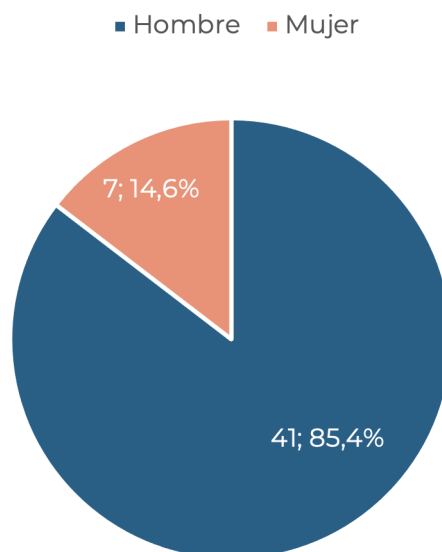


Figura 12: Distribución por sexos de los pacientes del estudio

Con respecto a las serologías virales de los pacientes presentaron: infección por VHC 18 pacientes (37.5%), encontrándose activa en el momento de la intervención quirúrgica en 9 pacientes (50%); infección por VHB 8 pacientes (16.7%), siendo activa en 1 paciente (10%); infección por VIH en 1 paciente (2.1%) encontrándose con carga viral activa en el momento de la cirugía (Figura 13).

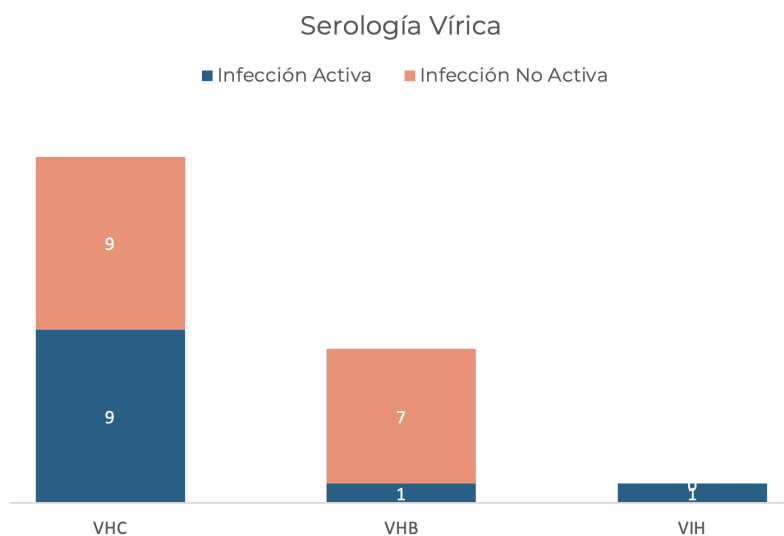


Figura 13: Serología vírica presente en los pacientes del estudio

En cuanto a los valores analíticos, los pacientes presentaron un valor de AFP de mediana 7.7 ng/ml [3-30.11], un INL de mediana 2.12 [1.64-2.58], un IPL de media 94.52 ± 47.59 , IIS de mediana 305271.55 [206000-492710.194].

En cuanto al cálculo del MELD presentó una mediana de 8 [7- 9].

Los pacientes que recibieron tratamiento de las lesiones previo a la intervención quirúrgica fueron 5 (10.4%), todos ellos tratados con QETA.

5.1.2. Estudio de variables operatorias y postoperatorias

La RH fue el tratamiento quirúrgico realizado con mayor frecuencia, empleado en 26 pacientes (54.2%) y combinándose con técnicas de ablación en 4 pacientes (8.3%). El segundo procedimiento quirúrgico en frecuencia fue el TH ortotópico realizado en 14 pacientes (29.2%), seguido de procedimientos ablativos únicamente en 4 de ellos (8.3%) y procedimientos combinados de ablación y resección en 4 pacientes (8.3%) (*Figura 14*).

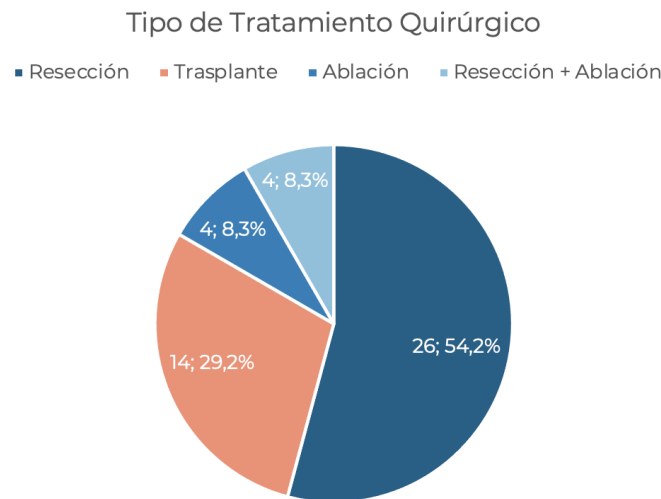


Figura 14: Tipo de tratamiento quirúrgico

De los 30 pacientes a los que se les realizó resección hepática, 19 (63.3%) fueron hepatectomías menores, hepatectomías mayores tuvieron lugar en 6 casos (20%) y resección únicamente de la lesión se realizó en 5 casos (16.7%) (*Figura 15*).

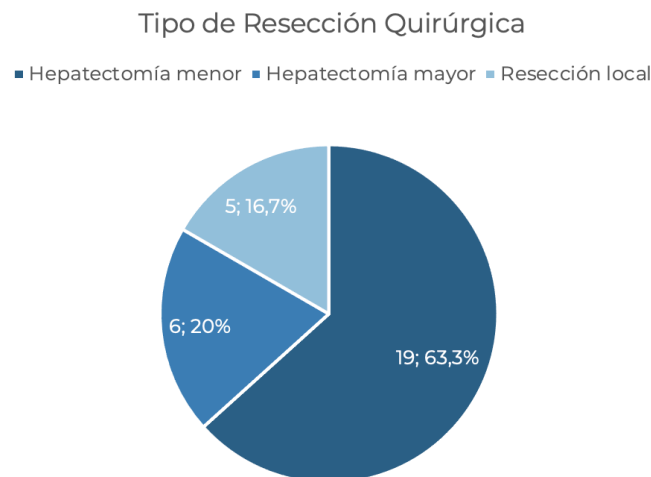


Figura 15: Tipo de resección quirúrgica

En cuanto a la necesidad de transfusiones durante la cirugía, se requirió la transfusión de hemoderivados en 9 pacientes (18.8%), siendo el producto transfundido con más frecuencia el concentrado de hematíes con una media de 2.67 concentrados \pm 1.5 (*Figura 16*).

Transfusiones Hemoderivados

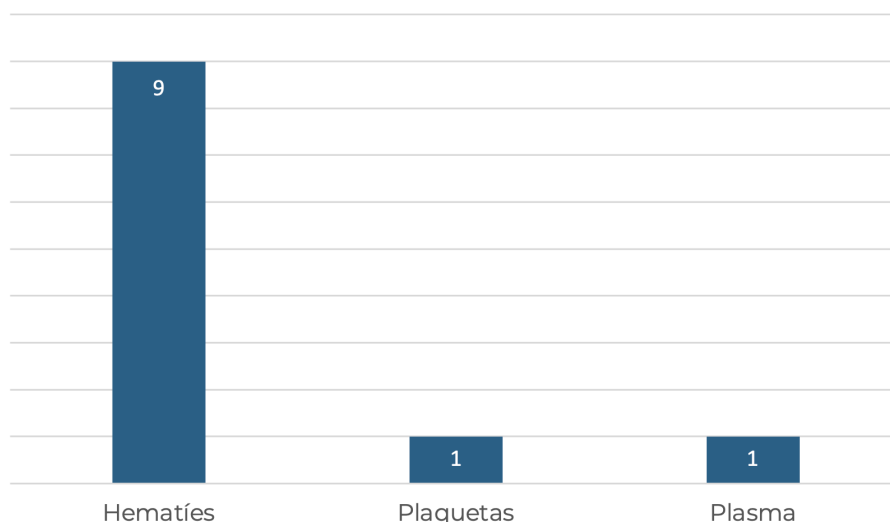


Figura 16: Pacientes que han precisado transfusión de hemoderivados

En relación a la evolución postoperatoria de los pacientes, estos presentaron una mediana en el tiempo de hospitalización de 7.5 días [5-15.75]. Se presentaron complicaciones postquirúrgicas 27 pacientes (56.3%), correspondiéndose con complicaciones mayores, aquellas con un Clavien- Dindo mayor o igual a IIIa, con 9 pacientes (33.4%) (Figura 17).

Complicaciones Postquirúrgicas

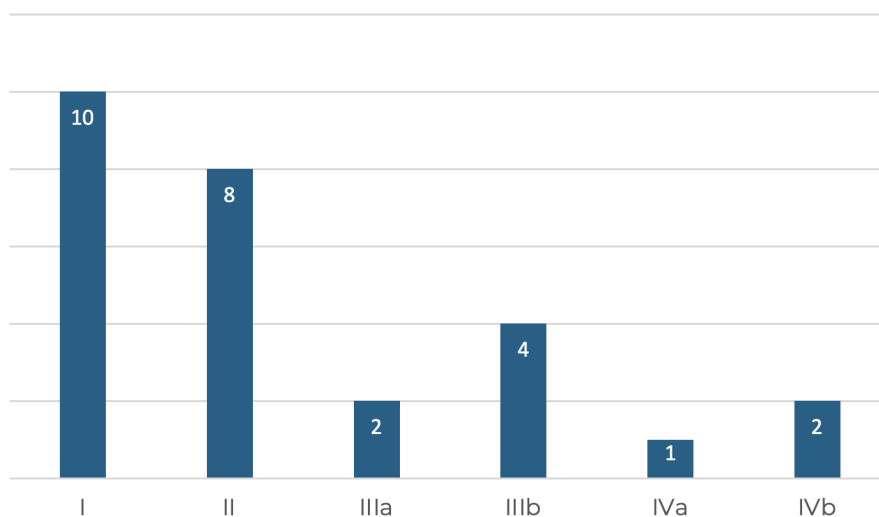


Figura 17: Tipo de complicaciones postquirúrgicas (Clasificación Clavien- Dindo)

5.1.2.1. Estudio de variables anatomopatológicas

En relación con las características tumorales, los pacientes presentaron un número de nódulos de mediana 1 [1-2], un tamaño del nódulo mayor de mediana 30 mm [22-54.5] y una suma de tamaños de los nódulos de mediana 45 mm [28-70].

El grado de diferenciación tumoral que presentaron los hepatocarcinomas resecados de nuestro estudio fueron: bien diferenciado 1 paciente (2.3%), moderadamente diferenciado 26 pacientes (59.1%), pobremente diferenciado 13 pacientes (29.5%) e indiferenciado 4 pacientes (9.1%) (*Figura 18*).

Grado de Diferenciación Tumoral

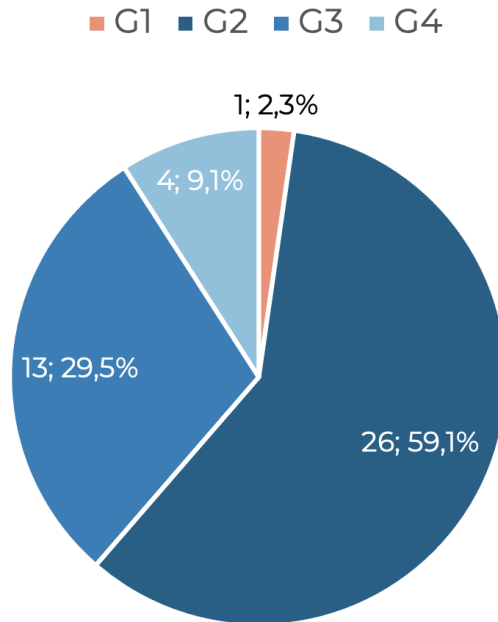


Figura 18: Grado de diferenciación tumoral de los hepatocarcinomas resecados

G1, bien diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pobremente diferenciado; G4, indiferenciado.

Basándonos en la 8ª edición del sistema de estadificación TNM, los hepatocarcinomas resecados presentaron la siguiente clasificación en relación a T: T1a 7 pacientes (15.9%), T1b 10 pacientes (22.7%), T2 22 pacientes (50%), T3 5 pacientes (11.4%).

La presencia de satelitosis en los hepatocarcinomas resecados se evidenció únicamente en 1 paciente (2.3%). En el caso de la presencia de invasión vascular fue descrita en 23 pacientes (52.3%) (*Figura 19*). La invasión perineural no fue descrita en ningún caso.

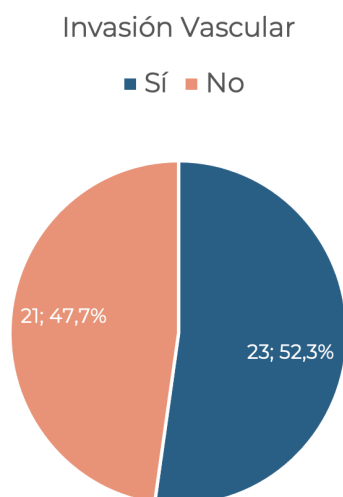


Figura 19: Invasión vascular en los hepatocarcinomas resecados

5.1.3. Estudio de variables de seguimiento

El tiempo medio de seguimiento de los pacientes fue de 26.90 ± 20.40 meses. Durante el seguimiento de los mismos, presentaron recidiva tumoral 13 pacientes (27.1%), con un valor medio de SLE de 42.63 meses [IC 95% 33.89-51.37] (Figura 20). El valor de la AFP en el momento de la recidiva fue de mediana 3.37 ng/ml [1.92-232.25].

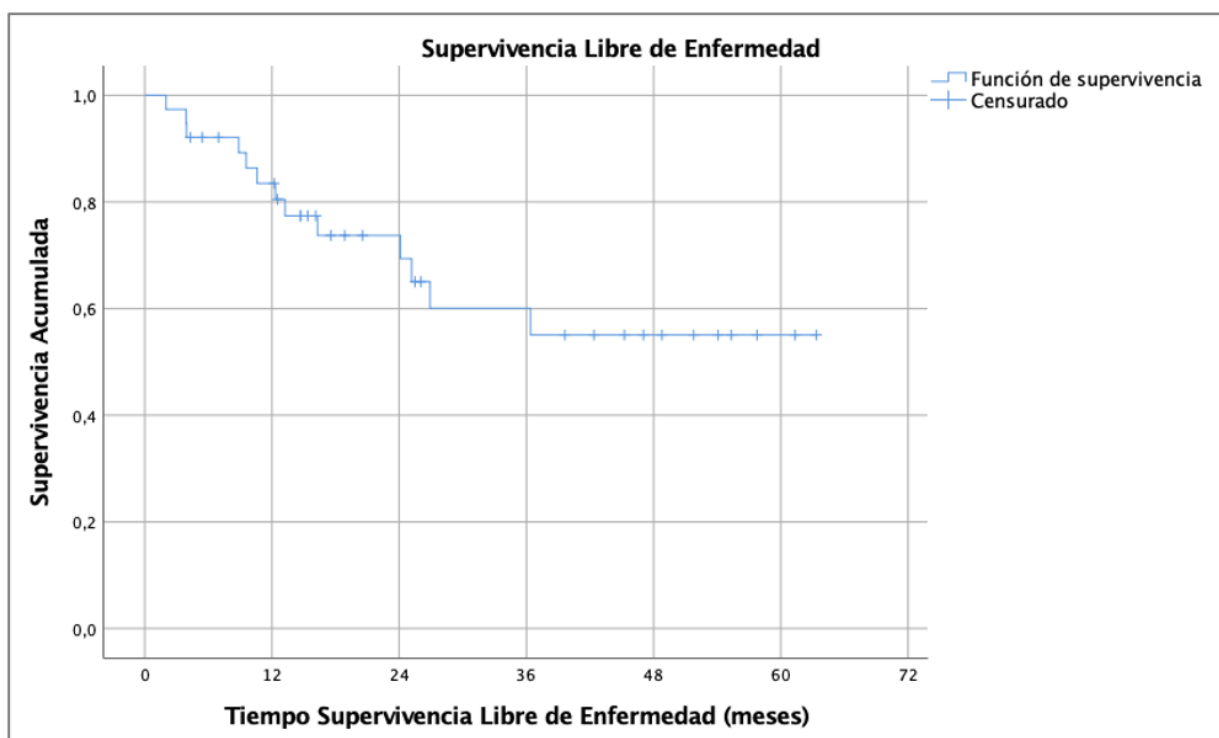


Figura 20: Curva Kaplan- Meier de la SLE de los pacientes del estudio

En relación a la localización de la recidiva, 8 pacientes (61.5%) presentaron únicamente recidiva a nivel hepático, 2 pacientes presentaron aparte de la recidiva hepática recidiva a nivel pulmonar (1 paciente, 7.7%) y a nivel óseo (1 paciente, 7.7%). Por último, 3 pacientes presentaron recidiva extrahepática. A nivel de la pared abdominal 2 pacientes (15.4%), y de forma combinada a nivel de pulmón y pared abdominal 1 paciente (7.7%) (Figura 21).

Localización Recidiva Tumoral

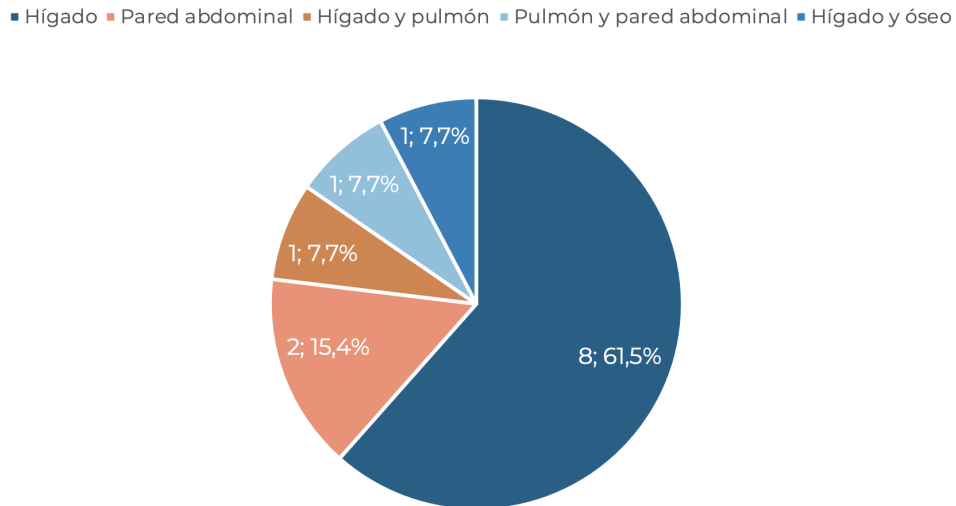


Figura 21: Localización de la recidiva tumoral

La recidiva hepática fue tratada en 9 pacientes (90%) de los 10 pacientes afectados. El tratamiento empleado con más frecuencia fue la QETA, que se utilizó en 4 pacientes (44.4%). El tratamiento sistémico con Sorafenib se empleó en 2 pacientes (22.2%). En 1 paciente (11.1%) el tratamiento sistémico (inicialmente Sorafenib y posteriormente Regorafenib) se combinó con radioembolización. En cuanto a los tratamientos quirúrgicos, la resección quirúrgica se llevó a cabo en 1 paciente (11.1%) y se empleó técnica de ablación en otro caso (11.1%) (Figura 22).

Tratamiento Recidiva Hepática

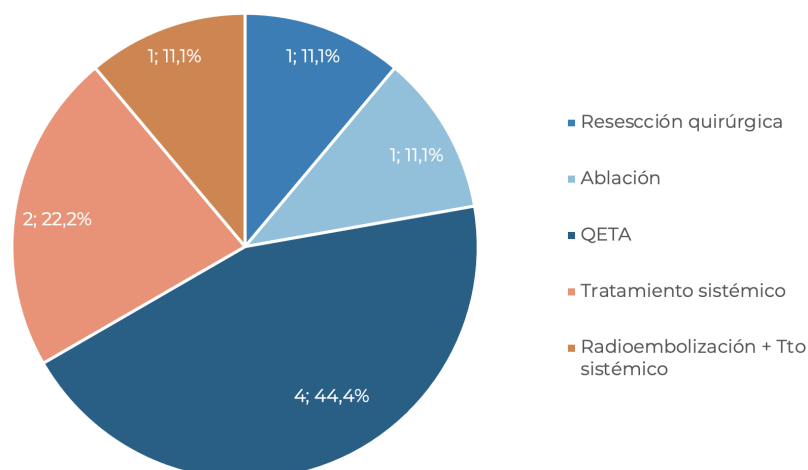


Figura 22: Tratamiento empleado en los casos con recidiva hepática

Durante el seguimiento, 5 pacientes (10.4%) presentaron tumores de novo; de estos, 2 pacientes (40%) habían sido intervenidos previamente mediante resección quirúrgica y 3 de ellos (60%) habían recibido TH ortotópico. Los tumores de novo, en aquellos pacientes tratados previamente mediante resección quirúrgica, fueron: carcinoma de células claras renales en uno de ellos y adenocarcinoma de colon ascendente con metástasis hepáticas y uterinas en el otro. En el caso de los pacientes a los que se les realizó TH ortotópico los tumores de novo que se presentaron fueron: adenocarcinoma de próstata, carcinoma epidermoide orofaríngeo y teratoma con endometrioma asociado de útero.

La SG media de los pacientes de nuestro estudio fue de 51.30 meses [IC 95% 44.46-58.13].

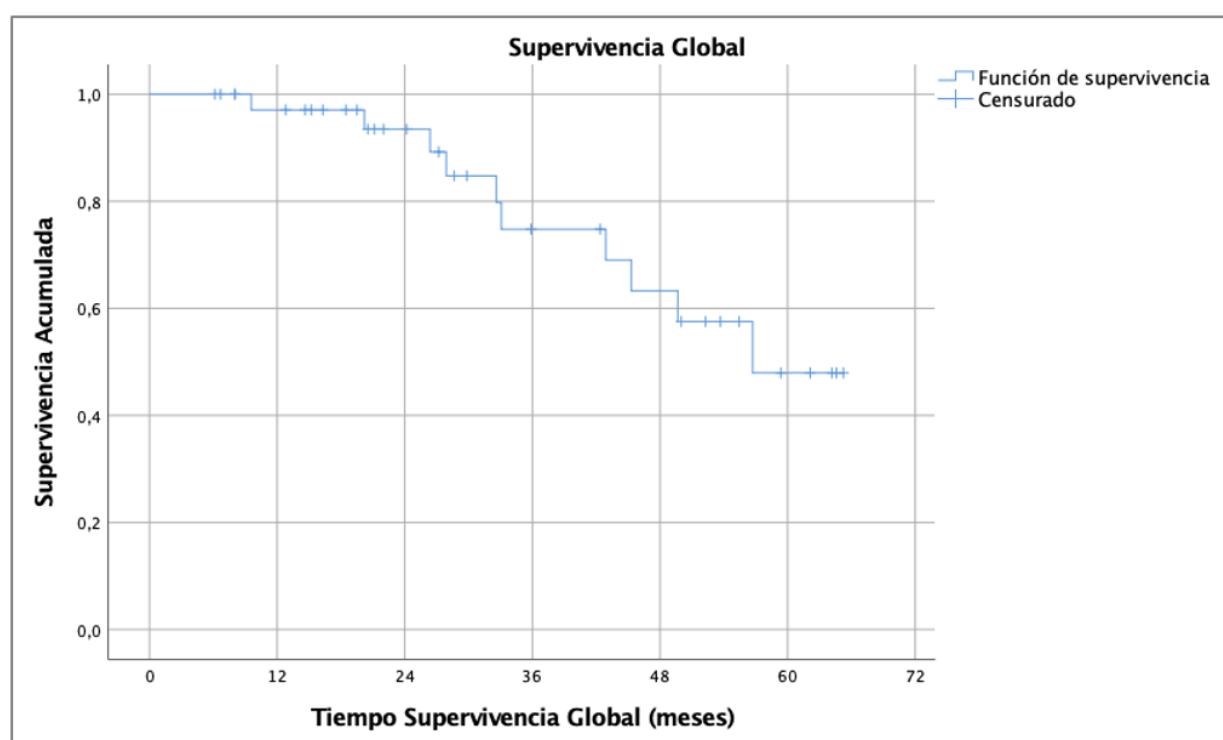


Figura 23: Curva Kaplan- Meier de la SG de los pacientes del estudio

5.1.4. Estudio de variables moleculares

A continuación, describiremos la expresión general de los marcadores moleculares analizados en nuestro estudio: receptor AhR, β -catenina y los efectores de la ruta Hippo YAP y TAZ (Figura 24, Tabla 7).

AhR se encontró sobreexpresado en 31 (64.6%) de los hepatocarcinomas analizados, reprimido en 15 casos (31.3%) y no se identificó variación significativa en 2 casos (4.2%).

β -catenina se sobreexpresó en 22 (45.8%) de los hepatocarcinomas estudiados, estuvo reprimido en 23 casos (47.9%) y no se identificó variación significativa en 3 casos (6.3%).

YAP se sobreexpresó en 27 casos (56.3%), se encontró reprimido en 16 casos (33.3%), no existiendo variación significativa en 5 casos (10.4%).

TAZ se encontró sobreexpresado en 12 de los hepatocarcinomas analizados (25%), su expresión estuvo reprimida en 31 casos (64.6%) mientras que no varió en 5 casos (10.4%).

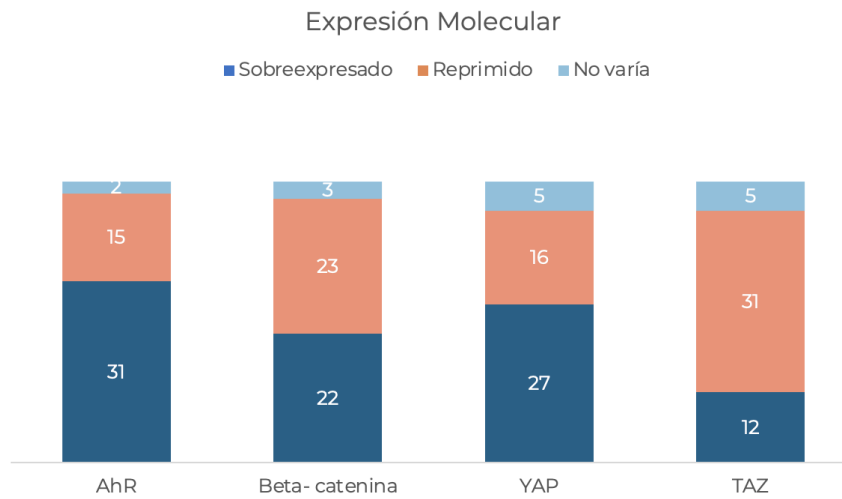


Figura 24: Expresión de los marcadores moleculares en los hepatocarcinomas del estudio

Tabla 7: Expresión de los marcadores moleculares en los hepatocarcinomas del estudio

	AhR	Beta-catenina	YAP	TAZ
Sobreexpresado	31 (64.6%)	22 (45.8%)	27 (56.3%)	12 (25%)
Reprimido	15 (31.3%)	23 (47.9%)	16 (33.3%)	31 (64.6%)
No varía	2 (4.2%)	3 (6.3%)	5 (10.4%)	5 (10.4%)

5.2. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN MOLECULAR DE AHR

Para realizar el análisis comparativo en función de la sobreexpresión molecular se han realizado dos grupos. Por un lado, aquellos que sobreexpresen los marcadores moleculares AhR, β -catenina, YAP o TAZ y, por otro lado, aquellos que repriman o que no varíen la expresión de los marcadores anteriormente mencionados.

5.2.1. Estudio de variables clínico- epidemiológicas preoperatorias

La edad de los pacientes que presentaron sobreexpresión de AhR (S-AhR) y los que no presentaron sobreexpresión de este receptor (NS-AhR) fue similar: 65.59 ± 7.50 años en el grupo S-AhR y 68.16 ± 8.34 años en el grupo NS-AhR ($p=0.351$).

En cuanto a la distribución por sexos, el grupo S-AhR presentó 25 hombres (80.6%) y 6 mujeres (19.4%), en comparación con el grupo NS-AhR en que se incluyeron 16 hombres (94.1%) y 1 mujer (5.9%) ($p=0.396$).

Con respecto a la infección vírica previa al tratamiento quirúrgico, esta estuvo presente en el grupo S-AhR en 19 pacientes (61.3%) y en el grupo NS-AhR en 5 pacientes (29.4%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.035$). La infección vírica estuvo activa en el momento de la intervención quirúrgica en 9 pacientes (29%) del grupo S-AhR y en 2 pacientes (11.8%) del grupo NS-AhR ($p=0.284$).

La presencia de cirrosis se evidenció en el grupo S-AhR en 20 pacientes (66.7%) y en el grupo NS-AhR en 9 pacientes (56.3%) ($p=0.486$).

Tabla 8: Variables clínico- epidemiológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de AhR

Factores	S- AhR	NS- AhR	p
Edad (media\pm DS)			
	65.59 \pm 7.50	68.16 \pm 8.34	0.351
Sexo			
Hombre [n (%)]	25(80.6%)	16 (94.1%)	0.396
Mujer [n (%)]	6 (19.4%)	1 (5.9%)	
Infección vírica [n (%)]			
	19 (61.3%)	5 (29.4%)	0.035
Infección vírica activa [n (%)]			
	9 (29%)	2 (11.8%)	0.284
Cirrosis [n (%)]			
	20 (66.7%)	9 (56.3%)	0.486

En relación a los valores analíticos, el grupo S-AhR presentó un valor de AFP de mediana 8.78 ng/ml [3.625-36.42] frente a 3.5 ng/ml [2-22.97] del grupo NS-AhR ($p=0.743$); un INL de mediana 1.95 [1.48-2.38] en el grupo S-AhR, teniendo en el grupo NS-AhR un valor de media 2.55 ± 0.83 ($p=0.144$); un IPL de media 85.46 \pm 36.14 en el grupo S-AhR con respecto a 99.37 [82.05-120] en el grupo NS-AhR ($p=0.053$); y, por último, un IIS de mediana 291030.37 [160634.61-484290.64] en el grupo S-AhR y de media 394375.77 \pm 260033.32 en el grupo NS-AhR ($p=0.206$).

Tabla 9: Valores analíticos relacionados con la sobreexpresión molecular de AhR

S- AhR	NS- AhR	p
AFP (mediana [P25- P75])		
8.78 [3.625- 36.42]	3.5 [2- 22.97]	0.743
INL (mediana [P25- P75], media \pm DS)		
1.95 [1.48- 2.38]	2.55 \pm 0.83	0.144
IPL (media \pm DS, mediana [P25- P75])		
85.46 \pm 36.14	99.37 [82.05- 120]	0.053
IIS (mediana [P25- P75], media \pm DS)		
291030.37 [160634.61- 484290.64]	394375.77 \pm 260033.32	0.206

Se realizó tratamiento de las lesiones hepáticas previo a la cirugía en 2 pacientes (6.5%) del grupo S-AhR y en 3 pacientes (17.6%) del grupo NS-AhR ($p=0.331$).

5.2.2. Estudio de variables anatomopatológicas

En relación a las características tumorales, los pacientes del grupo S-AhR presentaron el mismo número de nódulos 1 [1-2] con respecto a los pacientes del grupo NS-AhR ($p=0.458$).

Con respecto al tamaño del nódulo mayor, el grupo S-AhR presentaba una mediana de 30 mm [21.25-54], muy similar al tamaño correspondiente al grupo NS-AhR con una mediana de 33.50 mm [22.75-65.25] ($p= 0.214$). Así mismo, la suma de tamaños de los nódulos en el grupo S-AhR presentó una media de 49.96 mm \pm 30.12, similar a la suma de tamaños de los nódulos del grupo NS-AhR, de mediana 44.50 [24-72] ($p=0.413$).

Con respecto al grado de diferenciación tumoral que presentaron los hepatocarcinomas resecaados, en el grupo S-AhR fueron: bien diferenciado 1 paciente (3.4%), moderadamente diferenciado 13 pacientes (44.8%), pobremente diferenciado 11 pacientes (37.9%) e indiferenciado 4 pacientes (13.8%). En el grupo NS-AhR, el grado de diferenciación se distribuyó de la siguiente manera: moderadamente diferenciado 13 pacientes (86.7%) y pobremente diferenciado 2 pacientes (13.3%).

Las diferencias objetivadas entre ambos grupos en el análisis univariante fueron estadísticamente significativas ($p=0.048$).

La presencia de satelitosis en los hepatocarcinomas resecados en el grupo NS-AhR se evidenció únicamente en 1 paciente (6.7%), a diferencia del grupo S-AhR donde no se objetivó presencia de satelitosis en ningún paciente ($p=0.341$).

La presencia de invasión vascular fue descrita en 14 pacientes (48.3%) en el grupo S-AhR y en 9 pacientes (60%) en el grupo NS-AhR ($p=0.460$).

Tabla 10: Variables anatomopatológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de AhR.

* Grado de diferenciación tumoral: G1, bien diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pobremente diferenciado; G4, indiferenciado.

Factores	S- AhR	NS- AhR	p
Número de nódulos (mediana [P25- P75])			
	1 [1- 2]	1 [1- 2]	0.458
Tamaño nódulo mayor (mediana [P25- P75])			
	30 [21.25- 54]	33.50 [22.75- 65.25]	0.214
Suma de tamaños de los nódulos (media± DS, mediana [P25- P75])			
	49.96 ± 30.12	44.50 [24- 72]	0.053
Grado de diferenciación tumoral*			
G1 [n (%)]	1 (3.4%)	0 (0%)	0.048
G2 [n (%)]	13 (44.8%)	13 (86.7%)	
G3 [n (%)]	11 (37.9%)	2 (13.3%)	
G4 [n (%)]	4 (13.8%)	0 (0%)	
Satelitosis [n (%)]			
	0 (0%)	1 (6.7%)	0.341
Invasión vascular [n (%)]			
	14 (48.3%)	9 (60%)	0.460

5.2.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la sobreexpresión molecular de AhR

Para realizar el análisis multivariante hemos incluido todas las variables que tras el análisis univariante han presentado $p \leq 0.2$, estas han sido: antecedentes de infección vírica previa, el INL, el IPL y el grado de diferenciación tumoral (categoría de referencia: bien diferenciado). Tras el análisis multivariante, el único factor restante es el grado de diferenciación tumoral; no obstante, con un resultado no

estadísticamente significativo ($p=0.272$).

Ante este resultado, procedimos a recodificar la variable “grado de diferenciación tumoral” en dos categorías combinadas: bien/moderadamente diferenciado y pobremente/indiferenciado. La recodificación de esta variable con respecto al grupo S-AhR produjo los siguientes resultados: 14 pacientes (48.3%) bien/moderadamente diferenciado y 15 pacientes (51.7%) pobremente/indiferenciado. En el grupo NS-AhR esta nueva variable se distribuyó de la siguiente manera: 13 pacientes (86.7%) bien/moderadamente diferenciado y 2 pacientes (13.3%) pobremente/indiferenciado. Las diferencias evidenciadas en estos dos grupos fueron ahora estadísticamente significativas ($p=0.013$).

Tabla 11: Variable grado de diferenciación combinada en relación con la sobreexpresión molecular de AhR

* Grado de diferenciación tumoral: G1, bien diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pobremente diferenciado; G4, indiferenciado.

Factores	S- AhR	NS- AhR	p
Grado de diferenciación tumoral*			
G1 + G2 [n (%)]	14 (48.3%)	13 (86.7%)	0.013
G3 + G4 [n (%)]	15 (51.7%)	2 (13.3%)	

Tras obtener estos resultados, procedimos a realizar nuevamente el análisis multivariante incluyendo las variables anteriormente mencionadas (antecedentes de infección vírica previa, el INL y el IPL) así como esta nueva variable recodificada (categoría de referencia: bien/moderadamente diferenciado). Tras este nuevo análisis multivariante, el único factor restante es el grado de diferenciación tumoral, el cual presentó un resultado estadísticamente significativo ($p=0.022$; HR 6.964, IC 95% 1.328-36.529). Es decir, el riesgo de presentar un grado de diferenciación tumoral pobremente/indiferenciado en los pacientes con sobreexpresión molecular de AhR con es de 6.964 veces con respecto a los que presentan un grado de diferenciación bien/moderadamente diferenciado.

5.3. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE β -CATENINA

5.3.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias

La edad de los pacientes que presentaron sobreexpresión de β -catenina (S- β c) y de los que no presentaron sobreexpresión de este marcador (NS- β c) fue similar, 66.89 ± 8.33 años en el grupo S- β c y 66.27 ± 7.60 años en el grupo NS- β c ($p=0.341$).

En cuanto a la distribución por sexos, el grupo S- β c presentó 18 hombres (81.8%) y 4 mujeres (18.2%), en comparación con el grupo NS- β c que contó con 23 hombres (88.5%) y 3 mujeres (11.5%) ($p=0.687$).

Tabla 12: Variables clínico-epidemiológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de β -catenina

Factores	S- β c	NS- β c	p
Edad (media \pm DS)			
	66.89 \pm 8.33	66.27 \pm 7.60	0.341
Sexo			
Hombre [n (%)]	18 (81.8%)	23 (88.5%)	0.687
Mujer [n (%)]	4 (18.2%)	3 (11.5%)	
Infección vírica [n (%)]			
	13 (59.1%)	11 (42.3%)	0.247
Infección vírica activa [n (%)]			
	8 (36.4%)	3 (11.5%)	0.041
Cirrosis [n (%)]			
	12 (57.1%)	17 (68%)	0.477

Con respecto a la infección vírica previa al tratamiento quirúrgico, esta estuvo presente en el grupo S- β c en 13 pacientes (59.1%) y en el grupo NS- β c en 11 pacientes (42.3%) ($p=0.247$). La infección vírica estuvo activa en el momento de la intervención quirúrgica en 8 pacientes (36.4%) del grupo S- β c y en 3 pacientes (11.5%) del grupo NS- β c, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.041$).

La presencia de cirrosis se evidenció en el grupo S- β c en 12 pacientes (57.1%) y en el grupo NS- β c en 17 pacientes (68%) ($p=0.477$).

En relación a los valores analíticos, el grupo S- β c presentó un valor de AFP de mediana 10.95 ng/ml [4.37-49.42] frente a 4.85 ng/ml [2-16.66] del grupo NS- β c ($p=0.251$); un INL de media 1.84 ± 0.55 en el grupo S- β c, siendo en el grupo NS- β c de 2.66 ± 1.28 ($p=0.019$); un IPL de media 99.58 ± 56.09 en el grupo S- β c, con respecto a 89.73 ± 40.93 en el grupo NS- β c ($p=0.454$); y, por último, un IIS de media 350499.85 ± 254064.72 en el grupo S- β c y de 366538.03 ± 233042.28 en el grupo NS- β c ($p=0.984$).

Tabla 13: Valores analíticos relacionadas con la sobreexpresión molecular de β -catenina

S- β c	NS- β c	p
AFP (mediana [P25- P75])		
10.95 [4.37- 49.42]	4.85 [2- 16.66]	0.251
INL (media\pm DS)		
1.84 ± 0.55	2.66 ± 1.28	0.019
IPL (media\pm DS)		
99.58 ± 56.09	89.73 ± 40.93	0.454
IIS (media\pm DS)		
350499.85 ± 254064.72	366538.03 ± 233042.28	0.984

Únicamente se realizó tratamiento de las lesiones hepáticas previo a la cirugía en 5 pacientes (19.2%) del grupo NS- β c, no recibiendo tratamiento los pacientes del grupo S- β c ($p=0.054$).

5.3.2. Estudio de variables anatomopatológicas

En relación a las características tumorales, los pacientes del grupo S- β c presentaron el mismo número de nódulos 1 [1-2] con respecto a los pacientes del grupo NS- β c ($p=0.835$).

Con respecto al tamaño del nódulo mayor, el grupo S- β c presentó una mediana de 31.50 mm [20.75-70.50], muy similar al tamaño correspondiente al del grupo NS- β c con una mediana de 30 mm [21.75-41.25] ($p=0.167$). Así mismo, la suma de tamaños de los nódulos en el grupo S- β c presentó una media de $55.50 \text{ mm} \pm 35.40$, similar a la suma de tamaños de los nódulos del grupo NS- β c de media $48.04 \text{ mm} \pm 28.15$ ($p=0.40$).

Tabla 14: Variables anatomopatológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de β -catenina.

* Grado de diferenciación tumoral: G1, bien diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pobremente diferenciado; G4, indiferenciado

Factores	S- β c	NS- β c	p
Número de nódulos (mediana [P25- P75])			
	1 [1- 2]	1 [1- 2]	0.835
Tamaño nódulo mayor (mediana [P25- P75])			
	31.50 [20.75- 70.50]	30 [21.75- 41.25]	0.167
Suma de tamaños de los nódulos (media\pm DS)			
	55.50 \pm 35.40	48.04 \pm 28.15	0.40
Grado de diferenciación tumoral*			
G1 [n (%)]	0 (0%)	1 (4.3%)	0.477
G2 [n (%)]	12 (57.1%)	14 (60.9%)	
G3 [n (%)]	8 (38.1%)	5 (21.7%)	
G4 [n (%)]	1 (4.8%)	3 (13%)	
Satelitosis [n (%)]			
	1 (4.8%)	0 (0%)	0.477
Invasión vascular [n (%)]			
	12 (57.1%)	11 (47.8%)	0.537

En cuanto al grado de diferenciación tumoral que presentaron los hepatocarcinomas resecados en el grupo S- β c fueron: moderadamente diferenciado 12 pacientes (57.1%), pobremente diferenciado 8 pacientes (38.1%) e indiferenciado 1 paciente (4.8%). En el grupo NS- β c, el grado de diferenciación se distribuyó de la siguiente manera: bien diferenciado 1 paciente (4.3%), moderadamente diferenciado 14 pacientes (60.9%), pobremente diferenciado 5 pacientes (21.7%) e indiferenciado 3 pacientes (13%) ($p=0.453$).

La presencia de satelitosis en los hepatocarcinomas resecados en el grupo S- β c se evidenció únicamente en 1 paciente (4.8%), a diferencia del grupo NS- β c donde no se objetivó presencia de satelitosis en ninguno de ellos ($p=0.477$).

La presencia de invasión vascular fue descrita en el grupo S- β c en 12 pacientes (57.1%) y en 11 pacientes (47.8%) en el grupo NS- β c ($p=0.537$).

5.3.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la sobreexpresión molecular de β -catenina

Para realizar el análisis multivariante hemos incluido todas las variables que tras el análisis univariante han presentado $p \leq 0.2$, las cuales han sido: presentar infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica, el INL, el

haber recibido tratamiento previo del tumor y el tamaño del nódulo mayor. Tras el análisis multivariante, los factores relacionados de forma independiente con la sobreexpresión molecular de β -catenina fueron: presentar infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica, el INL y el tamaño del nódulo mayor.

El presentar infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica se relacionó de forma independiente con la sobreexpresión molecular de β -catenina, siendo el riesgo de presentar dicha sobreexpresión en los pacientes con infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica de 8.069, con respecto a los que no la presentaron ($p=0.024$; HR 8.069, IC 95% 1.311-49.663).

El INL se relacionó de forma independiente con la sobreexpresión molecular de β -catenina ($p=0.021$; HR 0.306, IC 95% 0.112-0.837). Por tanto, los pacientes con sobreexpresión de este marcador presentaron un menor riesgo de poseer valores más altos del INL.

El tamaño del nódulo mayor se relacionó de forma independiente con la sobreexpresión molecular de β -catenina ($p=0.026$; HR 1.032, IC 95% 1.004-1.061). Consecuentemente, los pacientes con sobreexpresión molecular de β -catenina tuvieron un mayor riesgo de desarrollar nódulos tumorales de mayor tamaño.

5.4. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE YAP

5.4.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias

En relación a la edad de los pacientes, no se objetivaron diferencias entre los que presentaron sobreexpresión de YAP (S-YAP) y los que no presentaron sobreexpresión de YAP (NS-YAP), 66.70 ± 7.63 años en el grupo S-YAP y 66 ± 8.17 años en el grupo NS-YAP ($p=0.329$).

Con respecto a la distribución por sexos, el grupo S-YAP presentó 24 hombres (88.9%) y 3 mujeres (11.1%), en comparación con el grupo NS-YAP que estuvo formado por 17 hombres (81%) y 4 mujeres (19%) ($p=0.683$).

Tabla 15: Variables clínico- epidemiológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de YAP

Factores	S- YAP	NS- YAP	p
Edad (media± DS)			
	66.70 ± 7.63	66 ± 8.17	0.329
Sexo			
Hombre [n (%)]	24 (88.9%)	17 (81%)	0.683
Mujer [n (%)]	3 (11.1%)	4 (19%)	
Infección vírica [n (%)]			
	15 (55.6%)	9 (42.9%)	0.383
Infección vírica activa [n (%)]			
	6 (22.2%)	5 (23.8%)	0.897
Cirrosis [n (%)]			
	17 (68%)	12 (57.1%)	0.477

La infección vírica previa al tratamiento quirúrgico estuvo presente en el grupo S-YAP en 15 pacientes (55.6%) y en el grupo NS-YAP en 9 pacientes (42.9%) ($p=0.383$). La infección vírica estuvo activa en el momento de la intervención quirúrgica en 6 pacientes (22.2%) del grupo S-YAP y en 5 pacientes (23.8%) del grupo NS-YAP ($p=0.897$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de ambas categorías.

Así mismo, no se objetivaron diferencias en cuanto a la existencia de cirrosis, la cual estuvo presente en el grupo S-YAP en 17 pacientes (68%) y en el grupo NS-YAP en 12 pacientes (57.1%) ($p=0.447$).

En relación a los valores analíticos, el grupo S-YAP presentó un valor de AFP de mediana 9.9 ng/ml [4-36.18] frente a 3.6 ng/ml [2-33.37] del grupo NS-YAP ($p=0.456$); un INL de mediana 2.08 [1.6-2.48] en el grupo S-YAP, siendo en el grupo NS-YAP de media 2.36 ± 0.88 ($p=0.874$); un IPL de media 85.93 ± 34.96 en el grupo S-YAP, en comparación con el grupo NS-YAP de mediana 93.86 [71.23-115.96] ($p=0.321$); y, por último, un IIS de media 339449.12 ± 219761.06 en el grupo S-YAP y de 382459.83 ± 262201.17 en el grupo NS-YAP ($p=0.685$).

Tabla 16: Valores analíticos relacionadas con la sobreexpresión molecular de YAP

Factores	S- YAP	NS- YAP	p
Número de nódulos (mediana [P25- P75])			
	1 [1- 2]	1 [1- 2]	0.7
Tamaño nódulo mayor (mediana [P25- P75])			
	30 [25- 65]	30 [21- 69]	0.543
Suma de tamaños de los nódulos (media \pm DS, mediana [P25- P75])			
	46.96 ± 20.65	44 [21- 104]	0.466
Grado de diferenciación tumoral*			

Por otro lado, el tratamiento de las lesiones hepáticas previo a la cirugía se realizó en 2 pacientes (7.4%) del grupo S-YAP y en 3 pacientes (14.3%) del grupo NS-YAP ($p=0.641$).

5.4.2. Estudio de variables anatomopatológicas

En relación a las características tumorales, los pacientes del grupo S-YAP presentaron el mismo número de nódulos 1 [1-2] con respecto a los pacientes del grupo NS-YAP ($p=0.7$).

En cuanto al tamaño del nódulo mayor, el grupo S-YAP presentó una mediana de 30 mm [25-65], prácticamente igual al tamaño correspondiente al del grupo NS-YAP con una mediana de 30 mm [21-69] ($p=0.543$). Así mismo, la suma de tamaños de los nódulos en el grupo S-YAP presentó una media de $46.96 \text{ mm} \pm 20.65$, en comparación a con suma de tamaños de los nódulos del grupo NS-YAP de mediana 44 mm [21-104] ($p=0.466$).

Tabla 17: Variables anatomopatológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de YAP.

* Grado de diferenciación tumoral: G1, bien diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pobremente diferenciado; G4, indiferenciado.

Factores	S- YAP	NS- YAP	p
Número de nódulos (mediana [P25- P75])			
	1 [1- 2]	1 [1- 2]	0.7
Tamaño nódulo mayor (mediana [P25- P75])			
	30 [25- 65]	30 [21- 69]	0.543
Suma de tamaños de los nódulos (media± DS, mediana [P25- P75])			
	46.96 ± 20.65	44 [21- 104]	0.466
Grado de diferenciación tumoral*			
G1 [n (%)]	1 (4.2%)	0 (0%)	0.898
G2 [n (%)]	15 (62.5%)	11 (55%)	
G3 [n (%)]	6 (25%)	7 (35%)	
G4 [n (%)]	2 (8.3%)	2 (10%)	
Satelitosis [n (%)]			
	0 (0%)	1 (5%)	0.455
Invasión vascular [n (%)]			
	14 (58.3%)	9 (45%)	0.378

Con respecto al grado de diferenciación tumoral que presentaron los hepatocarcinomas resecados en el grupo S-YAP fueron: bien diferenciado 1 paciente (4.2%), moderadamente diferenciado 15 pacientes (62.5%), pobremente diferenciado 6 pacientes (25%) e indiferenciado 2 pacientes (8.3%). En el grupo NS-YAP, el grado de diferenciación se distribuyó de la siguiente manera: moderadamente diferenciado 11 pacientes (55%), pobremente diferenciado 7 pacientes (35%) e indiferenciado 2 pacientes (10%) (p=0.898).

La presencia de satelitosis en los hepatocarcinomas resecados en el grupo NS-YAP se evidenció únicamente en 1 paciente (5%), a diferencia del grupo S-YAP donde no se objetivó presencia de satelitosis en ningún paciente (p=0.455).

La presencia de invasión vascular fue descrita en el grupo S-YAP en 14 pacientes (58.3%) y en 9 pacientes (45%) en el grupo NS-YAP (p=0.378).

5.4.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la sobreexpresión molecular de YAP

Tras el análisis univariante realizado empleando las variables previamente descritas (Tablas 15-17), no se objetivó en ninguna de ellas un valor de $p \leq 0.2$, por lo que no se ha realizado análisis multivariante. Por tanto, no se objetivan diferencias entre los pacientes con presencia o ausencia de sobreexpresión molecular de YAP.

5.5. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE TAZ

5.5.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias

En relación a la edad de los pacientes, aquellos con sobreexpresión de TAZ (S-TAZ) presentaron una edad media de 61.99 ± 7.20 años frente a los que no presentaron sobreexpresión de TAZ (NS-TAZ), cuya edad fue de 67.86 ± 7.58 años ($p=0.143$).

Con respecto a la distribución por sexos, el grupo S-TAZ presentó 10 hombres (83.3%) y 2 mujeres (16.7%), en comparación con el grupo NS-TAZ en el que se incluyeron 31 hombres (86.1%) y 5 mujeres (13.9%) ($p=1,00$).

Tabla 18: Variables clínico- epidemiológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de TAZ

Factores	S- YAP	NS- YAP	p
Número de nódulos (mediana [P25- P75])			
	1 [1- 2]	1 [1- 2]	0.7
Tamaño nódulo mayor (mediana [P25- P75])			
	30 [25- 65]	30 [21- 69]	0.543
Suma de tamaños de los nódulos (media\pm DS, mediana [P25- P75])			
	46.96 \pm 20.65	44 [21- 104]	0.466
Grado de diferenciación tumoral*			
G1 [n (%)]	1 (4.2%)	0 (0%)	0.898
G2 [n (%)]	15 (62.5%)	11 (55%)	
G3 [n (%)]	6 (25%)	7 (35%)	
G4 [n (%)]	2 (8.3%)	2 (10%)	
Satelitosis [n (%)]			
	0 (0%)	1 (5%)	0.455
Invasión vascular [n (%)]			
	14 (58.3%)	9 (45%)	0.378

La infección vírica previa al tratamiento quirúrgico estuvo presente en el grupo S-TAZ en 5 pacientes (41.7%) y en el grupo NS-TAZ en 19 pacientes (52.8%) ($p=0.505$). La infección vírica estuvo activa en el momento de la intervención quirúrgica en 4 pacientes (33.3%) del grupo S-TAZ y en 7 pacientes (19.4%) del grupo NS-TAZ ($p=0.430$).

Por otro lado, la cirrosis estuvo presente en el grupo S-YAP en 9 pacientes (81.8%) y en el grupo NS-YAP en 20 pacientes (57.1%) ($p=0.172$).

En relación a los valores analíticos, el grupo S-TAZ presentó un valor de AFP de mediana 8.78 ng/ml [5.05-18.93] en comparación al grupo NS-TAZ de mediana 5.85 ng/ml [2.75-36.26] ($p=0.226$); un INL de media 1.63 ± 0.63 en el grupo S-TAZ, siendo en el grupo NS-TAZ de mediana 2.29 [1.82-3.08] ($p=0.014$); un IPL de media 61.21 ± 33.52 en el grupo S-TAZ, en comparación con el grupo NS-TAZ de mediana 92.22 [68.98-121.54] ($p=0.018$); y, por último, un IIS de media 177341.37 ± 113704.61 en el grupo S-TAZ y de 413693.31 ± 240565.19 en el grupo NS-TAZ ($p<0.05$).

Tabla 19: Valores analíticos relacionadas con la sobreexpresión molecular de TAZ

S- TAZ	NS- TAZ	p
AFP (mediana [P25- P75])		
8.78 [5.05- 18.93]	5.85 [2.75- 36.26]	0.226
INL (media\pm DS, mediana [P25- P75])		
1.63 ± 0.63	2.29 [1.82- 3.08]	0.014
IPL (media\pm DS, mediana [P25- P75])		
61.21 ± 33.52	92.22 [68.98- 121.54]	0.018
IIS (media\pm DS)		
177341.37 ± 113704.61	413693.31 ± 240565.19	< 0.05

Por otro lado, el tratamiento de las lesiones hepáticas previo a la cirugía se realizó únicamente en el grupo NS-TAZ, tratándose 5 pacientes (13.9%) ($p=0.312$).

5.5.2. Estudio de variables anatomopatológicas

En relación a las características tumorales, el número de nódulos evidenciado en los pacientes del grupo S-TAZ fue de mediana 1.5 [1-2], en comparación con el grupo NS-TAZ de mediana 1 [1-2] ($p=0.912$).

En cuanto al tamaño del nódulo mayor, el grupo S-TAZ presentó una mediana de 29.50 mm [23.5-31.25], con respecto al grupo NS-TAZ con una mediana de 31 mm [21-60.5], siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.02$). Así mismo, la suma de tamaños de los nódulos en el grupo S-TAZ presentó una media de $42.4 \text{ mm} \pm 14.9$, en el caso del grupo NS-TAZ la suma de tamaños de los nódulos fue de mediana 45 mm [24.75-72] ($p=0.046$).

Con respecto al grado de diferenciación tumoral que presentaron los hepatocarcinomas resecaados en el grupo S-TAZ fueron: bien diferenciado 1 paciente (8.3%), moderadamente diferenciado 7 pacientes (58.3%), pobremente diferenciado 3 pacientes (25%) e indiferenciado 1 paciente (8.3%). En el grupo NS-TAZ, el grado de diferenciación se distribuyó de la siguiente manera: moderadamente

diferenciado 19 pacientes (59.4%), pobremente diferenciado 10 pacientes (31.3%) e indiferenciado 3 pacientes (9.4%) ($p=0.488$).

La presencia de satelitosis en los hepatocarcinomas resecados en el grupo NS-TAZ se evidenció únicamente en 1 paciente (3.1%), a diferencia del grupo S-TAZ donde no se objetivó presencia de satelitosis en ningún paciente ($p=1$).

La presencia de invasión vascular fue descrita en el grupo S-TAZ en 4 pacientes (33.3%) y en 19 pacientes (59.4%) en el grupo NS-TAZ ($p=0.124$).

Tabla 20: Variables anatomopatológicas relacionadas con la sobreexpresión molecular de TAZ.

* Grado de diferenciación tumoral: G1, bien diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pobremente diferenciado; G4, indiferenciado.

Factores	S- TAZ	NS- TAZ	p
Número de nódulos (mediana [P25- P75])			
	1.5 [1- 2]	1 [1- 2]	0.912
Tamaño nódulo mayor (mediana [P25- P75])			
	29.50 [23.5- 31.25]	31 [21- 60.5]	0.02
Suma de tamaños de los nódulos (media± DS, mediana [P25- P75])			
	42.4 ± 14.91	45 [24.75- 72]	0.046
Grado de diferenciación tumoral*			
G1 [n (%)]	1 (8.3%)	0 (0%)	0.488
G2 [n (%)]	7 (58.3%)	19 (59.4%)	
G3 [n (%)]	3 (25%)	10 (31.3%)	
G4 [n (%)]	1 (8.3%)	3 (9.4%)	
Satelitosis [n (%)]			
	0 (0%)	1 (3.1%)	1
Invasión vascular [n (%)]			
	4 (33.3%)	19 (59.4%)	0.124

5.5.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la sobreexpresión molecular de TAZ

En la realización del análisis multivariante hemos incluido todas las variables que tras el análisis univariante han presentado $p \leq 0.2$, las cuales han sido: edad de los pacientes en el momento de la cirugía, la presencia de cirrosis, el INL, el IPL, el IIS, el tamaño del nódulo mayor, la suma de los tamaños de los nódulos y la invasión vascular.

Tras el análisis multivariante, el único factor relacionado con la sobreexpresión molecular de TAZ fue el IIS ($p=0.01$; HR 1, IC 95% 1-1). Sin embargo, ante un valor de HR igual a 1, la diferencia de riesgo no es estadísticamente significativa, por lo que un IIS elevado no supone un mayor riesgo de sobreexpresión molecular

de TAZ en nuestro estudio.

5.6. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA REPRESIÓN MOLECULAR DE AHR

5.6.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias

En relación a la edad, los pacientes que presentaron represión de AhR (R-AhR) tuvieron una edad de media 68.08 ± 8.85 años, en comparación con los que no presentaron represión de AhR (NR-AhR) de media 65.90 ± 7.34 años ($p=0.396$).

En cuanto a la distribución por sexos, el grupo R-AhR presentó 15 hombres (100%) y ninguna mujer, a diferencia del grupo NR-AhR con 26 hombres (78.8%) y 7 mujeres (21.2%) ($p=0.082$).

Tabla 21: Variables clínico-epidemiológicas relacionadas con la represión molecular de AhR

Factores	R- AhR	NR- AhR	p
Edad (media± DS)			
	68.08 ± 8.85	65.90 ± 7.34	0.396
Sexo			
Hombre [n (%)]	15 (100%)	26 (78.8%)	0.082
Mujer [n (%)]	0 (0%)	7 (21.2%)	
Infección vírica [n (%)]			
	4 (26.7%)	20 (60.6%)	0.029
Infección vírica activa [n (%)]			
	1 (6.7%)	10 (30.3%)	0.136
Cirrosis [n (%)]			
	8 (57.1%)	21 (65.6%)	0.583

Con respecto a la infección vírica previa al tratamiento quirúrgico, esta estuvo presente en el grupo R-AhR en 4 pacientes (26.7%) y en el grupo NR-AhR en 20 pacientes (60.6%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.029$). La infección vírica estuvo activa en el momento de la intervención quirúrgica en 1 paciente (6.7%) del grupo R-AhR y en 10 pacientes (30.3%) del grupo NR-AhR ($p=0.136$).

La presencia de cirrosis se evidenció en el grupo R-AhR en 8 pacientes (57.1%) y en el grupo NR-AhR en 21 pacientes (65.6%) ($p=0.583$).

Con respecto a los valores analíticos, el grupo R-AhR presentó un valor de AFP de mediana 3.5 ng/ml [2-27.40] frente a 8.78 ng/ml [3.52-36.36] del grupo NR-AhR ($p=0.832$); un INL de mediana 2.33 [2.10-2.85] en el grupo R-AhR, siendo

en el grupo NR-AhR de 1.95 [1.44-2.42] ($p=0.129$); un IPL de media 110.41 ± 65.19 en el grupo R-AhR, en comparación con 85.99 ± 34.96 en el grupo NR-AhR ($p=0.115$); y por último, un IIS de media 398739.55 ± 273586.09 en el grupo R-AhR y de mediana 291030.38 [185903.85-492119.77] en el grupo NR-AhR ($p=0.190$).

Tabla 22: Valores analíticos relacionadas con la represión molecular de AhR

R- AhR	NR- AhR	p
AFP (mediana [P25- P75])		
3.5 [2- 27.40]	8.78 [3.52- 36.36]	0.832
INL (mediana [P25- P75])		
2.33 [2.10- 2.85]	1.95 [1.44- 2.42]	0.129
IPL (media\pm DS)		
110.41 \pm 65.19	85.99 \pm 34.96	0.115
IIS (media\pm DS, mediana [P25- P75])		
398739.55 \pm 273586.09	291030.38 [185903.85-492119.77]	0.190

Se realizó tratamiento de las lesiones hepáticas previo a la cirugía en 3 pacientes (20%) del grupo R-AhR y en 2 pacientes (6.1%) del grupo NR-AhR ($p=0.307$).

5.6.2. Estudio de variables anatomopatológicas

En cuanto a las características tumorales, el número de nódulos que se objetivó en los pacientes del grupo R-AhR presentó una mediana de 1.5 [1-2], en el caso del grupo NR-AhR la mediana fue de 1 [1-2] ($p=0.243$).

Con respecto al tamaño del nódulo mayor, el grupo R-AhR presentó una mediana de 33.5 mm [26.25-51.75], con respecto al grupo NR-AhR con una mediana de 30 mm [20.75-56.25] ($p=0.454$). La suma de tamaños de los nódulos en el grupo R-AhR presentó una mediana de 44.5 mm [30-72], en el caso del grupo NR-AhR la suma de tamaños de los nódulos fue de media $51.3 \text{ mm} \pm 32.29$ ($p=0.628$).

Tabla 23: Variables anatomopatológicas relacionadas con la represión molecular de AhR.

*Grado de diferenciación tumoral: G1, bien diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pobremente diferenciado; G4, indiferenciado.

Factores	R- AhR	NR- AhR	p
Número de nódulos (mediana [P25- P75])			
	1.5 [1- 2]	1 [1- 2]	0.243
Tamaño nódulo mayor (mediana [P25- P75])			
	33.5 [26.25- 51.75]	30 [20.75- 56.25]	0.454
Suma de tamaños de los nódulos (mediana [P25- P75], media± DS)			
	44.5 [30- 72]	51.3 ± 32.29	0.628
Grado de diferenciación tumoral*			
G1 [n (%)]	0 (0%)	1 (3.2%)	0.154
G2 [n (%)]	11 (84.6%)	15 (48.4%)	
G3 [n (%)]	2 (15.4%)	11 (35.5%)	
G4 [n (%)]	0 (0%)	4 (12.9%)	
Satelitosis [n (%)]			
	1 (100%)	0 (0%)	0.295
Invasión vascular [n (%)]			
	9 (69.2%)	14 (45.2%)	0.145

El grado de diferenciación tumoral que presentaron los hepatocarcinomas resecados de nuestro estudio en el grupo R-AhR fueron: moderadamente diferenciado 11 pacientes (84.6%) y pobremente diferenciado 2 pacientes (15.4%). En el grupo NR-AhR, el grado de diferenciación se distribuyó de la siguiente manera: bien diferenciado 1 paciente (3.2%), moderadamente diferenciado 15 pacientes (48.4%), pobremente diferenciado 11 pacientes (35.5%) e indiferenciado 4 pacientes (12.9%) (p=0.154).

La presencia de satelitosis en los hepatocarcinomas resecados se evidenció únicamente en el grupo R-AhR en 1 paciente (100%) (p=0.295).

La presencia de invasión vascular fue descrita en el grupo R-AhR en 9 pacientes (69.2%) y en 14 pacientes (45.2%) en el grupo NR-AhR (p=0.145).

5.6.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la represión molecular de AhR

Para realizar el análisis multivariante hemos incluido todas las variables que tras el análisis univariante han presentado $p \leq 0.2$, las cuales han sido: el sexo de los pacientes, antecedentes de infección vírica previa, presencia de infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica, el INL, el IPL, el IIS, el grado de diferenciación tumoral (categoría de referencia: bien diferenciado) y la

presencia de invasión vascular.

Tras la realización del análisis multivariante, los factores relacionados con la represión molecular de AhR fueron: la presencia de infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica y el IPL.

La presencia de infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica se relacionó de forma independiente con la represión molecular de AhR ($p=0.092$; HR 0.149, IC 95% 0.016-1.367), no obstante, los resultados no son estadísticamente significativos. Por tanto, podemos objetivar una tendencia en los pacientes con represión molecular de AhR a mostrar menor riesgo de infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica.

El IPL se relacionó de forma independiente con la represión molecular de AhR ($p=0.063$; HR 1.015, IC 95% 0.999-1.030), sin embargo, los resultados no son estadísticamente significativos. Se objetiva una tendencia en los pacientes con represión molecular de AhR a mostrar un mayor riesgo a valores más altos del IPL.

5.7. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA REPRESIÓN MOLECULAR DE β -CATENINA

5.7.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias

La edad de los pacientes que presentaron represión de β -catenina (R- β c) y los que no presentaron represión de este marcador (NR- β c) fue similar, 66.57 ± 7.40 años en el grupo R- β c y 66.47 ± 8.44 años en el grupo NR- β c ($p=0.557$).

En cuanto a la distribución por sexos, el grupo R- β c presentó 20 hombres (87%) y 3 mujeres (13%), en comparación con el grupo NR- β c que estuvo formado por 21 hombres (84%) y 4 mujeres (16%) ($p=1,00$).

Tabla 24: Variables clínico-epidemiológicas relacionadas con la represión molecular de β -catenina

Factores	R- β c	NR- β c	p
Edad (media \pm DS)			
	66.57 \pm 7.40	66.47 \pm 8.44	0.557
Sexo			
Hombre [n (%)]	20 (87%)	21 (84%)	1
Mujer [n (%)]	3 (13%)	4 (16%)	
Infección vírica [n (%)]			
	8 (34.8%)	16 (64%)	0.043
Infección vírica activa [n (%)]			
	2 (8.7%)	9 (36%)	0.025
Cirrosis [n (%)]			
	14 (63.6%)	15 (62.5%)	0.936

Con respecto a la infección vírica previa al tratamiento quirúrgico, esta estuvo presente en el grupo R- β c en 8 pacientes (34.8%) y en el grupo NR- β c en 16 pacientes (64%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.043$). La infección vírica estuvo activa en el momento de la intervención quirúrgica en 2 pacientes (8.7%) del grupo R- β c y en 9 pacientes (36%) del grupo NR- β c, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.025$).

La presencia de cirrosis se evidenció en el grupo R- β c en 14 pacientes (63.6%) y en el grupo NR- β c en 15 pacientes (62.5%) ($p=0.936$).

En relación a los valores analíticos, el grupo R- β c presentó un valor de AFP de mediana 4 ng/ml [2-24.04] frente a 10.7 ng/ml [4.15-36.34] del grupo NR- β c ($p=0.242$); un INL de media 2.79 ± 1.30 en el grupo R- β c, siendo en el grupo NR- β c de 1.81 ± 0.53 ($p=0.007$); un IPL de media 92.64 ± 42.61 en el grupo R- β c, en com-

paración con 94.99 ± 53.09 en el grupo NR- β c ($p=0.796$); y, por último, un IIS de media 3847515.12 ± 240923.74 en el grupo R- β c y de mediana 294923.08 [173269.23-414229.58] en el grupo NR- β c ($p=0.616$).

Tabla 25: Valores analíticos relacionadas con la represión molecular de β -catenina

R- β c	NR- β c	p
AFP (mediana [P25- P75])		
4 [2- 24.04]	10.7 [4.15- 36.34]	0.242
INL (media\pm DS)		
2.79 \pm 1.30	1.81 \pm 0.53	0.007
IPL (media\pm DS)		
92.64 \pm 42.61	94.99 \pm 53.09	0.796
IIS (media\pm DS, mediana [P25- P75])		
3847515.12 \pm 240923.74	294923.08 [173269.23- 414229.58]	0.616

El tratamiento de las lesiones hepáticas previo a la cirugía se realizó únicamente en el grupo R- β c, tratándose 5 pacientes (21.7%) y siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.02$).

5.7.2. Estudio de variables anatomopatológicas

En relación a las características tumorales, los pacientes del grupo R- β c presentaron el mismo número de nódulos 1 [1-2] con respecto a los pacientes del grupo NR- β c ($p=1,00$).

Con respecto al tamaño del nódulo mayor, los pacientes del grupo R- β c presentaron un tamaño similar al del grupo NR- β c, de mediana 30 mm [21-45] en el grupo R- β c y de 30 mm [21.5-66] en el grupo NR- β c ($p=0.258$). Así mismo, la suma de tamaños de los nódulos en el grupo R- β c presentó una media de 52.29 mm \pm 33.67 , con respecto al grupo NR- β c cuya media fue de 50 mm \pm 29.363 ($p=0.741$).

Tabla 26: Variables anatomopatológicas relacionadas con la represión molecular de β - catenina

*Grado de diferenciación tumoral: G1, bien diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pobremente diferenciado; G4, indiferenciado.

Factores	R- β c	NR- β c	p
Número de nódulos (mediana [P25- P75])			
	1 [1- 2]	1 [1- 2]	1
Tamaño nódulo mayor (mediana [P25- P75])			
	30 [21- 45]	30 [21.5- 66]	0.258
Suma de tamaños de los nódulos (media \pm DS)			
	52.29 \pm 33.67	50 \pm 29.363	0.741
Grado de diferenciación tumoral*			
G1 [n (%)]	1 (4.8%)	0 (0%)	0.264
G2 [n (%)]	13 (61.9%)	13 (56.5%)	
G3 [n (%)]	4 (19%)	9 (39.1%)	
G4 [n (%)]	3 (14.3%)	1 (4.3%)	
Satelitosis [n (%)]			
	0 (0%)	1 (4.3%)	1
Invasión vascular [n (%)]			
	10 (47.6%)	13 (56.5%)	0.555

El grado de diferenciación tumoral que presentaron los hepatocarcinomas resecados de nuestro estudio en el grupo R- β c fueron: bien diferenciado 1 paciente (4.8%), moderadamente diferenciado 13 pacientes (61.9%), pobremente diferenciado 4 pacientes (19%) e indiferenciado 3 pacientes (14.3%). En el grupo NR- β c, el grado de diferenciación se distribuyó de la siguiente manera: moderadamente diferenciado 13 pacientes (56.5%), pobremente diferenciado 9 pacientes (39.1%) e indiferenciado 1 paciente (4.3%) ($p= 0.264$).

La presencia de satelitosis en los hepatocarcinomas resecados se presentó únicamente en el grupo NR- β c en 1 paciente (4.3%) ($p=1,00$).

La presencia de invasión vascular fue descrita en el grupo R- β c en 10 pacientes (47.6%) y en 13 pacientes (56.5%) en el grupo NR- β c ($p=0.555$).

5.7.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la represión molecular de Beta- catenina

Hemos realizado el análisis multivariante incluyendo todas las variables que tras el análisis univariante han presentado $p \leq 0.2$, las cuales han sido: haber recibido tratamiento del tumor previo a la cirugía, antecedentes de infección vírica previa, presencia de infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica y el INL. Los factores restantes tras la realización del análisis multivariante son: haber recibido previo a la cirugía tratamiento del tumor, presencia de infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica y el INL. De estos

factores, únicamente la presencia de infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica y el INL han sido estadísticamente significativos.

Con respecto a la presencia de infección vírica activa en el momento de la cirugía, esta se relacionó de forma independiente con la represión molecular de β -catenina ($p=0.09$; HR 0.205, IC 95% 0.033-1.279) con unos resultados no estadísticamente significativos. No obstante, la represión molecular de β -catenina podría suponer un factor protector frente a la presencia de infección vírica activa en el momento de la cirugía.

El INL se relacionó también de forma independiente con la represión molecular de β -catenina ($p=0.02$; HR 0.02, IC 95% 1.192-7.444). Los pacientes con represión de este marcador presentaron menor riesgo de desarrollar valores elevados del INL.

5.8. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA REPRESIÓN MOLECULAR DE YAP

5.8.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias

La edad de los pacientes que presentaron represión de YAP (R-YAP) y los que no presentaron represión de YAP (NR-YAP) fue similar, 66.42 ± 8.34 años en el grupo R-YAP y 66.58 ± 7.66 años en el grupo NR-YAP ($p=0.597$).

Con respecto a la distribución por sexos, el grupo R-YAP presentó 12 hombres (75%) y 4 mujeres (25%), en comparación con el grupo NR-YAP que incluyó 29 hombres (90.6%) y 3 mujeres (9.4%) ($p=0.201$).

Tabla 27: Variables clínico-epidemiológicas relacionadas con la represión molecular de YAP

Factores	R- YAP	NR- YAP	p
Edad (media± DS)			
	66.42 ± 8.34	66.58 ± 7.66	0.597
Sexo			
Hombre [n (%)]	12 (75%)	29 (90.6%)	0.201
Mujer [n (%)]	4 (25%)	3 (9.4%)	
Infección vírica [n (%)]			
	7 (43.8%)	17 (53.1%)	0.540
Infección vírica activa [n (%)]			
	4 (25%)	7 (21.9%)	1
Cirrosis [n (%)]			
	10 (62.5%)	19 (63.3%)	0.956

En cuanto a la infección vírica previa al tratamiento quirúrgico, esta estuvo presente en el grupo R-YAP en 7 pacientes (43.8%) y en el grupo NR-YAP en 17 pacientes (53.1%) ($p=0.540$). La infección vírica estuvo activa en el momento de la intervención quirúrgica en 4 pacientes (25%) del grupo R-YAP y en 7 pacientes (21.9%) del grupo NR-YAP ($p=1,00$).

La presencia de cirrosis se evidenció en el grupo R-YAP en 10 pacientes (62.5%) y en el grupo NR-YAP en 19 pacientes (63.3%) ($p=0.956$).

En relación a los valores analíticos, el grupo R-YAP presentó un valor de AFP de mediana 3 ng/ml [2-40.19] frente a 9.73 ng/ml [4.42-33.14] del grupo NR-YAP ($p=0.415$); un INL de media 2.32 ± 0.79 en el grupo R-YAP, siendo en el grupo NR-YAP de mediana 2.15 [1.63-2.57] ($p=0.963$); un IPL de mediana 95.26 [75.50-121.26] en el grupo R-YAP, en comparación con 85.41 ± 33.19 en el grupo NR-YAP

($p=0.156$); y por último, un IIS de media 388012.37 ± 284474.98 en el grupo R-YAP y de 343956.73 ± 212927.78 en el grupo NR-YAP ($p=0.664$).

Tabla 28: Valores analíticos relacionadas con la represión molecular de YAP

R- YAP	NR- YAP	p
AFP (mediana [P25- P75])		
3 [2- 40.19]	9.73 [4.42- 33.14]	0.415
INL (media \pm DS, mediana [P25- P75])		
2.32 ± 0.79	2.15 [1.63- 2.57]	0.963
IPL (mediana [P25- P75], media \pm DS)		
95.26 [75.50- 121.26]	85.41 ± 33.19	0.156
IIS (media \pm DS)		
388012.37 ± 284474.98	343956.73 ± 212927.78	0.664

El tratamiento de las lesiones hepáticas previo a la cirugía se realizó en el grupo R-YAP en 3 pacientes (18.8%), y en el grupo NR-YAP en 2 pacientes (6.3%) ($p=0.316$).

5.8.2. Estudio de variables anatomopatológicas

En relación a las características tumorales, los pacientes del grupo R-YAP presentaron una mediana de número de nódulos 1 [1-2.75], en comparación con el grupo NR-YAP con una mediana de 1 [1-2] ($p=0.145$).

Con respecto al tamaño del nódulo mayor, los pacientes del grupo R-YAP presentaron un tamaño de mediana 27 mm [20.25-40], en relación al grupo NR-YAP de mediana 30 mm [26-58.75] ($p=0.701$). Así mismo, la suma de tamaños de los nódulos en el grupo R-YAP presentó una media de $49.94 \text{ mm} \pm 37.67$, con respecto al grupo NR-YAP cuya media fue de $51.75 \text{ mm} \pm 27.48$ ($p=0.801$).

Tabla 29: Variables anatomopatológicas relacionadas con la represión molecular de YAP

*Grado de diferenciación tumoral: G1, bien diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pobremente diferenciado; G4, indiferenciado.

Factores	R- YAP	NR- YAP	p
Número de nódulos (mediana [P25- P75])			
	1 [1- 2.75]	1 [1- 2]	0.145
Tamaño nódulo mayor (mediana [P25- P75])			
	27 [20.25- 40]	30 [26- 58.75]	0.701
Suma de tamaños de los nódulos (media± DS)			
	49.94 ± 37.67	51.75 ± 27.48	0.801
Grado de diferenciación tumoral*			
G1 [n (%)]	0 (0%)	1 (3.6%)	0.876
G2 [n (%)]	10 (62.5%)	16 (57.1%)	
G3 [n (%)]	4 (25%)	9 (32.1%)	
G4 [n (%)]	2 (12.5%)	2 (7.1%)	
Satelitosis [n (%)]			
	1 (6.3%)	0 (0%)	0.364
Invasión vascular [n (%)]			
	7 (43.8%)	16 (57.1%)	0.392

El grado de diferenciación tumoral que presentaron los hepatocarcinomas resecados en el grupo R-YAP fueron: moderadamente diferenciado 10 pacientes (62.5%), pobremente diferenciado 4 pacientes (25%) e indiferenciado 2 pacientes (12.5%). En el grupo NR-YAP, el grado de diferenciación se distribuyó de la siguiente manera: bien diferenciado 1 paciente (3.6%), moderadamente diferenciado 16 pacientes (57.1%), pobremente diferenciado 9 pacientes (32.1%) e indiferenciado 2 pacientes (7.1%) (p=0.876).

La presencia de satelitosis en los hepatocarcinomas resecados se evidenció únicamente en el grupo R-YAP en 1 paciente (6.3%) (p=0.364).

La presencia de invasión vascular fue descrita en el grupo R-YAP en 7 pacientes (43.8%) y en 16 pacientes (57.1%) en el grupo NR-YAP (p=0.392).

5.8.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la represión molecular de YAP

Se ha realizado el análisis multivariante incluyendo todas las variables que tras el análisis univariante han presentado $p \leq 0.2$, las cuales han sido: el IPL y el número de nódulos. Tras la realización del análisis multivariante, únicamente el número de nódulos se presentó como un factor relacionado con la represión molecular de YAP.

El número de nódulos objetivado en la pieza quirúrgica se relacionó de

forma independiente con la represión molecular de YAP. El riesgo de represión molecular de YAP en relación a un mayor número de nódulos fue de 2.076, sin embargo, estos hallazgos no fueron estadísticamente significativos ($p=0.086$; HR 2.076, IC 95% 0.901-4.785).

5.9. ANÁLISIS COMPARATIVO EN FUNCIÓN DE LA REPRESIÓN MOLECULAR DE TAZ

5.9.1. Estudio de variables clínico-epidemiológicas preoperatorias

En relación a la edad de los pacientes, el grupo que presentó represión de TAZ (R-TAZ) tuvo una edad media de 67.94 ± 7.14 años, en relación al grupo que no manifestó represión de TAZ (NR-TAZ) cuya media de edad fue de 63.78 ± 8.58 años ($p=0.225$).

Con respecto a la distribución por sexos, el grupo R-TAZ presentó 27 hombres (87.1%) y 4 mujeres (12.9%), en comparación con el grupo NR-TAZ que estuvo formado por 14 hombres (82.4%) y 3 mujeres (17.6%) ($p=0.686$).

Tabla 30: Variables clínico- epidemiológicas relacionadas con la represión molecular de TAZ

Factores	R- TAZ	NR- TAZ	p
Edad (media\pm DS)			
	67.94 \pm 7.14	63.78 \pm 8.58	0.225
Sexo			
Hombre [n (%)]	27 (87.1%)	14 (82.4%)	0.686
Mujer [n (%)]	4 (12.9%)	3 (17.6%)	
Infección vírica [n (%)]			
	17 (54.8%)	7 (41.2%)	0.365
Infección vírica activa [n (%)]			
	6 (19.4%)	5 (29.4%)	0.486
Cirrosis [n (%)]			
	17 (56.7%)	12 (75%)	0.220

En cuanto a la infección vírica previa al tratamiento quirúrgico, esta estuvo presente en el grupo R-TAZ en 17 pacientes (54.8%) y en el grupo NR-TAZ en 7 pacientes (41.2%) ($p=0.365$). La infección vírica estuvo activa en el momento de la intervención quirúrgica en 6 pacientes (19.4%) del grupo R-TAZ y en 5 pacientes (29.4%) del grupo NR-TAZ ($p=0.486$).

La presencia de cirrosis se evidenció en el grupo R-TAZ en 17 pacientes (56.7%) y en el grupo NR-TAZ en 12 pacientes (75%) ($p=0.220$).

En relación a los valores analíticos, el grupo R-TAZ presentó un valor de AFP de mediana 5.85 ng/ml [2.75-36.26] frente a 9.56 ng/ml [4.6-14.2] del grupo NR-TAZ ($p=0.214$); un INL de mediana 2.29 [1.82-3.08] en el grupo R-TAZ, siendo en el grupo NR-TAZ de media 1.81 ± 0.74 ($p=0.016$); un IPL de mediana 96.31 [68.98-

121.54] en el grupo R-TAZ, en comparación con 69.47 ± 34.70 en el grupo NR-TAZ ($p=0.016$); y, por último, un IIS de media 408914.06 ± 245556.79 en el grupo R-TAZ y de 251544.31 ± 186320.01 en el grupo NR-TAZ ($p=0.02$).

Tabla 31: Valores analíticos relacionadas con la represión molecular de TAZ

R- TAZ	NR- TAZ	p
AFP (mediana [P25- P75])		
5.85 [2.75- 36.26]	9.56 [4.6- 14.2]	0.214
INL (mediana [P25- P75], media± DS)		
2.29 [1.82- 3.08]	1.81 ± 0.74	0.016
IPL (mediana [P25- P75], media± DS)		
96.31 [68.98- 121.54]	69.47 ± 34.70	0.016
IIS (media± DS)		
408914.06 ± 245556.79	251544.31 ± 186320.01	0.02

El tratamiento de las lesiones hepáticas previo a la cirugía se realizó únicamente en el grupo R-TAZ en 5 pacientes (16.1%).

5.9.2. Estudio de variables anatomopatológicas

En relación a las características tumorales, tanto los pacientes del grupo R-TAZ como los del grupo NR-TAZ presentaron una mediana de número de nódulos igual 1 [1-2] ($p= 0.954$).

Con respecto al tamaño del nódulo mayor, los pacientes del grupo R-TAZ presentaron un tamaño de mediana 32 mm [21.5-61], en relación al grupo NR-TAZ de 29 mm [21-35] ($p=0.021$). Así mismo, la suma de tamaños de los nódulos en el grupo R-TAZ presentó una media de $56.31 \text{ mm} \pm 35.61$, con respecto al grupo NR-TAZ cuya media fue de 41 ± 16.65 ($p=0.021$).

Tabla 32: Variables anatomopatológicas relacionadas con la represión molecular de TAZ

*Grado de diferenciación tumoral: G1, bien diferenciado; G2, moderadamente diferenciado; G3, pobremente diferenciado; G4, indiferenciado.

Factores	R- TAZ	NR- TAZ	p
Número de nódulos (mediana [P25- P75])			
	1 [1- 2]	1 [1- 2]	0.954
Tamaño nódulo mayor (mediana [P25- P75])			
	32 [21.5- 61]	29 [21- 35]	0.021
Suma de tamaños de los nódulos (media± DS)			
	56.31 ± 35.61	41 ± 16.65	0.021
Grado de diferenciación tumoral*			
G1 [n (%)]	0 (0%)	1 (5.9%)	0.654
G2 [n (%)]	17 (63%)	9 (52.9%)	
G3 [n (%)]	8 (29.6%)	5 (29.4%)	
G4 [n (%)]	2 (7.4%)	2 (11.8%)	
Satelitosis [n (%)]			
	1 (3.7%)	0 (0%)	1
Invasión vascular [n (%)]			
	15 (55.6%)	8 (47.1%)	0.583

El grado de diferenciación tumoral que presentaron los hepatocarcinomas resecados de nuestro estudio en el grupo R-TAZ fueron: moderadamente diferenciado 17 pacientes (63%), pobremente diferenciado 8 pacientes (29.6%) e indiferenciado 2 pacientes (7.4%). En el grupo NR-TAZ, el grado de diferenciación se distribuyó de la siguiente manera: bien diferenciado 1 paciente (5.9%), moderadamente diferenciado 9 pacientes (52.9%), pobremente diferenciado 5 pacientes (29.4%) e indiferenciado 2 pacientes (11.8%) (p=0.654).

La presencia de satelitosis en los hepatocarcinomas resecados se evidenció únicamente en el grupo R-TAZ en 1 paciente (3.7%) (p=1,00).

La presencia de invasión vascular fue descrita en el grupo R-TAZ en 15 pacientes (55.6%) y en 8 pacientes (47.1%) en el grupo NR-TAZ (p=0.583).

5.9.3. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos y anatomopatológicos que influyen en la represión molecular de TAZ

Hemos realizado el análisis multivariante incluyendo todas las variables que tras el análisis univariante han presentado $p \leq 0.2$, las cuales han sido: el INL, el IPL, el IIS, el haber recibido tratamiento previo del tumor, el tamaño del nódulo mayor y la suma de tamaños de los nódulos. Tras la realización del análisis mul-

tivariante, únicamente el IPL y el haber recibido tratamiento previo del tumor se presentaron como factores relacionados con la represión molecular de TAZ, no obstante, de ellos, el haber recibido tratamiento previo del tumor no presentó un valor estadísticamente significativo ($p=0.999$).

El IPL se relacionó de forma independiente con la represión molecular de TAZ. El riesgo de represión molecular de TAZ en relación a un mayor IPL fue de 1.025 ($p=0.024$; HR 1.025, IC 95% 1.003-1.047).

Tabla 33: Tabla resumen de la expresión molecular en relación con las variables estudiadas tras el análisis multivariante

	S-AhR	S- β c	S-TAZ	R-AhR	R- β c	R-YAP	R-TAZ
Infección vírica activa		p= 0.024 HR 8.069, IC 95% 1.311- 49.663		p= 0.092 HR 0.149, IC 95% 0.016- 1.367	p= 0.09 HR 0.205, IC 95% 0.033- 1.279		
INL		p= 0.021 HR 0.306, IC 95% 0.112- 0.837			p= 0.02 HR 0.02, IC 95% 1.192- 7.444		
IPL				p= 0.063 HR 1.015, IC 95% 0.999- 1.030			p= 0.024 HR 1.025, IC 95% 1.003- 1.047
IIS			p= 0.01 HR 1, IC 95% 1-1				
Número de nódulos						p= 0.086 HR 2.076, IC 95% 0.901- 4.785	
Tamaño nódulo mayor		p= 0.026 HR 1.032, IC 95% 1.004- 1.061					
Grado de diferenciación tumoral	p= 0.022 HR 6.964, IC 95% 1.328- 36.529						

5.10. ANÁLISIS DE FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

Hemos realizado un análisis para identificar aquellos factores clínico-epidemiológicos, anatomopatológicos y moleculares que pudieran estar relacionados con la SG de los pacientes.

Tras la realización inicial del análisis univariante de todas las variables previamente mencionadas seleccionamos aquellas que han presentado $p \leq 0.2$ para realizar el análisis multivariante, estas han sido: la presencia de cirrosis, el INL, el IPL, el IIS, el tamaño del nódulo mayor, la satelitosis, la invasión vascular y la represión molecular de β -catenina. Tras la realización del análisis multivariante, no se ha objetivado ninguna variable que estadísticamente significativa asociada a la SG.

5.11. ANÁLISIS DE FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

5.11.1. Análisis multivariante de los factores clínico-epidemiológicos, anatomopatológicos y moleculares que influyen en la Supervivencia Libre de Enfermedad

Hemos realizado un análisis para identificar aquellos factores clínico-epidemiológicos, anatomopatológicos y moleculares que pudieran estar relacionados con la SLE de los pacientes.

Tras la realización inicial del análisis univariante de todas las variables previamente mencionadas seleccionamos aquellas que han presentado $p \leq 0.2$ para realizar el análisis multivariante, las cuales han sido: edad de los pacientes en el momento de la cirugía, la presencia de infección vírica activa en el momento de la cirugía, el INL, el IPL, el tamaño del nódulo mayor, la satelitosis y la expresión de β -catenina. Tras la realización del análisis multivariante hemos objetivado que el INL y el IPL presentan una relación estadísticamente significativa con la SLE de los pacientes.

El INL se relacionó de forma independiente con la SLE ($p=0.019$; HR 0.333, IC 95% 0.132-0.838). Por tanto, valores altos del INL representan un riesgo de 0.019 para la SLE de los pacientes.

El IPL se relacionó de forma independiente con la SLE ($p=0.004$; HR 1.018, IC 95% 1.006-1.030). En este caso, valores altos del IPL suponen un factor de riesgo para una peor SLE.

A continuación, realizamos un nuevo análisis incluyendo las mismas variables previas, pero en el caso de la variable "expresión molecular de β -catenina" hemos considerado los casos de su sobreexpresión. Tras la realización del análisis multivariante, objetivamos que la sobreexpresión molecular de β -catenina es el único factor que se relaciona de forma independiente con la SLE de los pacientes ($p=0.023$; HR 3.938, IC 95% 1.207-12.845). Por tanto, la sobreexpresión molecular de β -catenina presenta un riesgo de 3.938 veces de recidiva tumoral con respecto a la no sobreexpresión de la misma en los pacientes que presentan CHC (*Figura 25*).

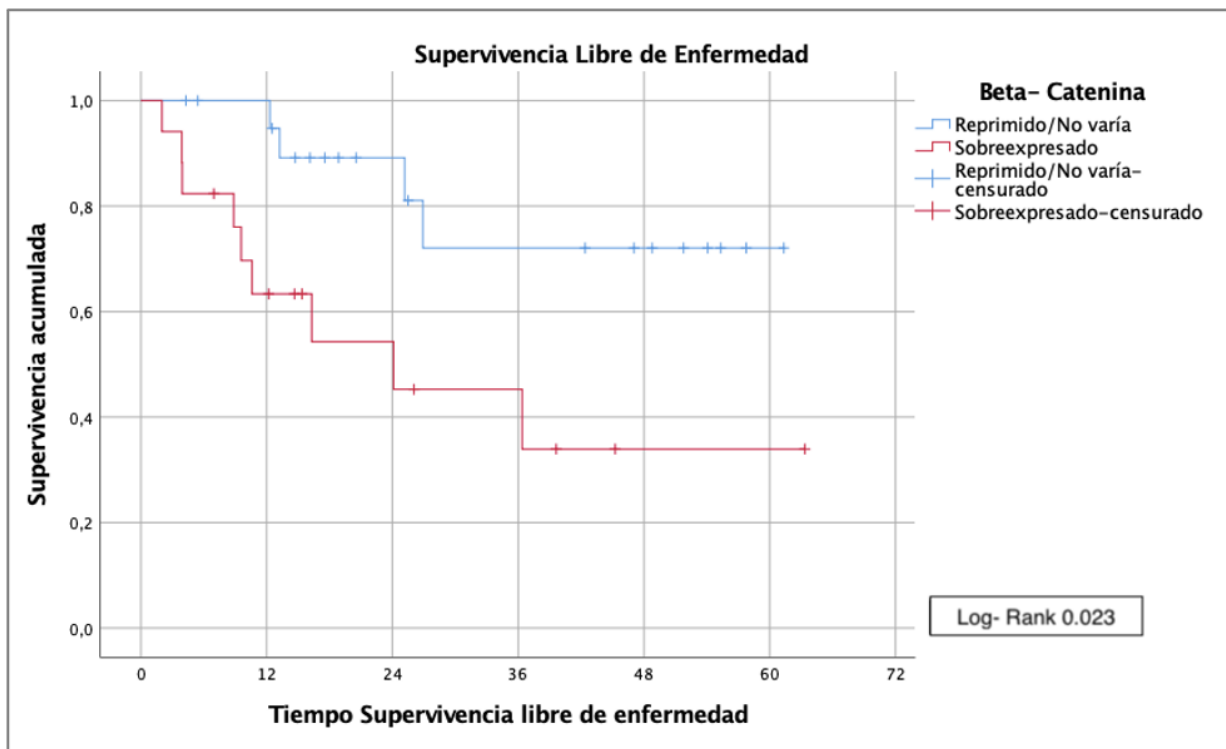


Figura 25: Curva Kaplan- Meier de la SLE con respecto a la sobreexpresión molecular de β -catenina

5.11.2. Análisis combinado del índice Neutrófilos/Linfocitos y la sobreexpresión de β -catenina con respecto a la Supervivencia Libre de Enfermedad

Tras los resultados expuestos previamente, en los que la sobreexpresión molecular de β -catenina y el INL se relacionaron de forma independiente con la SLE, y teniendo en cuenta que tanto la sobreexpresión como la represión molecular de β -catenina se relacionan de forma independiente con el INL (Tabla 33), consideramos oportuno la combinación de estos dos factores para analizar su comportamiento con respecto a la SLE.

Para ello, inicialmente calculamos un punto de corte para recodificar la variable INL en mayor y menor. Este punto es el de mayor sensibilidad y especificidad para este índice con respecto a la SLE; el cálculo se realizó con el índice de Youden mediante curvas ROC. Con un área bajo la curva de 0.351, el valor con una sensibilidad de 0.308 y un valor de especificidad de 0.68 es de 2.3625.

A continuación, creamos una nueva variable considerando $INL < 2.3625$ e $INL \geq 2.3625$. Esta nueva variable la combinamos con la variable sobreexpresión molecular de β -catenina, obteniendo así una variable con cuatro grupos: sobreexpresión molecular de β -catenina + $INL < 2.3625$ (SBC + INL menor), sobreexpresión molecular de β -catenina + $INL \geq 2.3625$ (SBC + INL mayor), reprimido/no varía β -catenina + $INL < 2.3625$ (NSBC + INL menor) y reprimido/no varía β -catenina + $INL \geq 2.3625$ (NSBC + INL mayor).

Seguidamente, calculamos la SLE con respecto a esta variable, objetivando una peor SLE en aquellos pacientes con sobreexpresión molecular de β -catenina y un INL mayor (Log-Rank 0.001); así mismo objetivamos que la sobreexpresión molecular de β -catenina, independientemente de su combinación con un INL mayor o menor, presenta una peor SLE, siendo su combinación con un $INL \geq 2.3625$ la que incrementa el empeoramiento de esta supervivencia, como se puede observar en la *Figura 26* y en la *Tabla 34*.

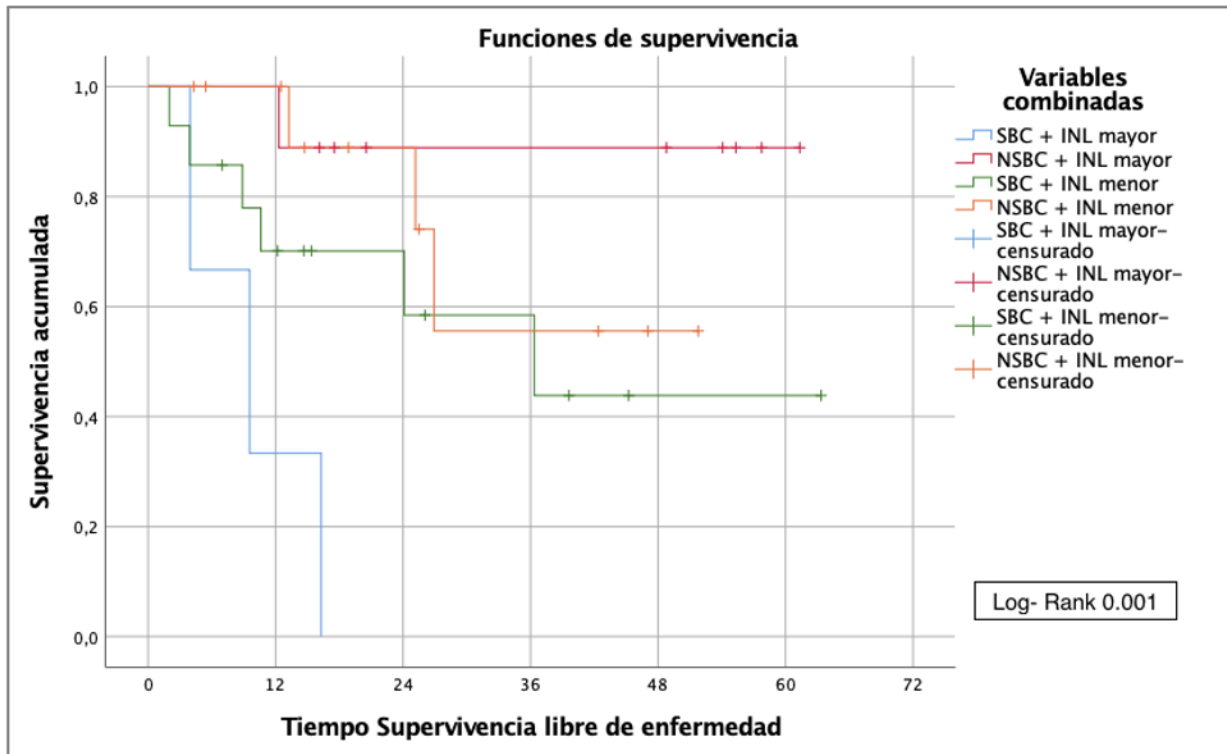
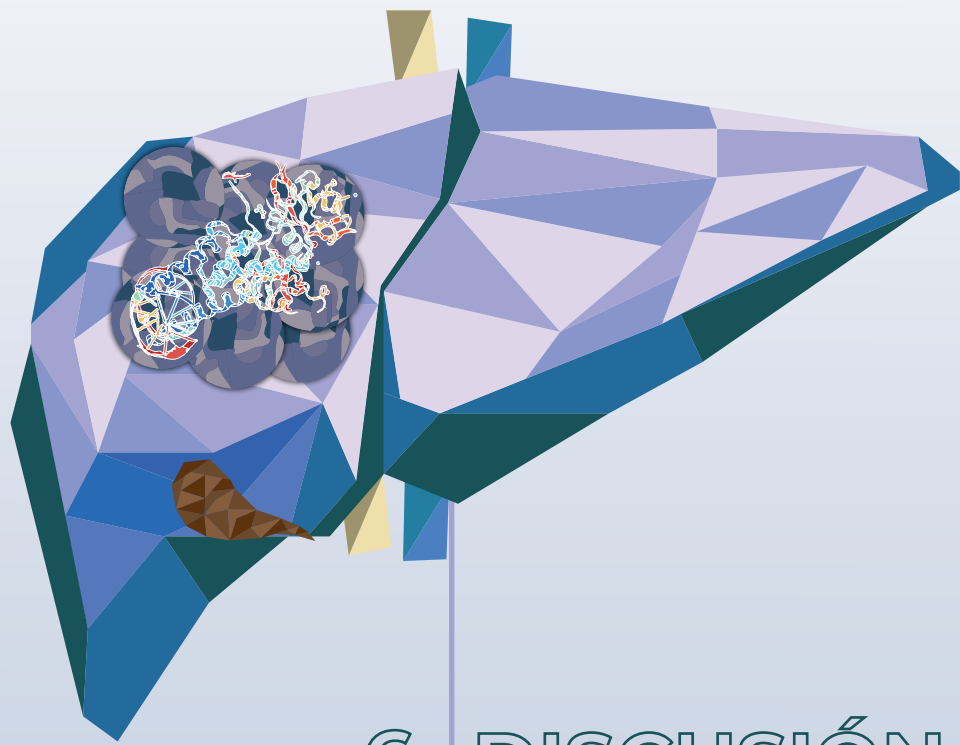


Figura 26: Curva Kaplan- Meier de la SLE con respecto a la variable combinada Sobreexpresión Beta-catenina y el INL

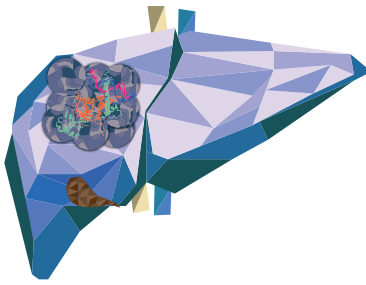
Tabla 34: Tabla que recoge el tiempo medio y el porcentaje de SLE al año a los 3 años y a los 5 años por grupos de la variable combinada Sobreexpresión β - catenina y el INL

	SLE			
	Media \pm DS	1 año	3 años	5 años
SBC + INL menor	37.837 (7.432)	70%	58%	38%
SBC + INL mayor	9.933 (3.571)	33%	0%	
NSBC + INL menor	38.948 (5.718)	100%	56%	56%
NSBC + INL mayor	55.892 (5.135)	100%	87%	87%



6. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN



6.1. RELACIÓN ENTRE EL GRADO DE DIFERENCIACIÓN TUMORAL Y LA SOBREEXPRESIÓN MOLECULAR DE AHR

El AhR es un factor de transcripción activado por un ligando que presenta dominios funcionales con estructura hélice-bucle-hélice-PAS (bHLH- PAS) y que puede ser activado por compuestos tóxicos ambientales denominados genéricamente xenobióticos; entre ellos se encuentran el TCDD y el α -benzo[a]pireno (hidrocarburos aromáticos policíclicos) [165].

En ausencia de ligando, el AhR está presente en el citosol en un complejo multimolecular con la proteína de shock térmico de 90 kDa (Hsp90), la proteína que interactúa con el receptor de hidrocarburo de arilo (XAP2) y p23. Al unirse a un ligando, este complejo conteniendo AhR se traslada al núcleo, el receptor se separa del resto de componentes para formar un heterodímero con su molécula asociada, Translocador nuclear del receptor de arilos (Arnt). Así, el heterodímero AhR/Arnt formado reconoce una secuencia específica en la región reguladora de sus genes diana denominada elemento de respuesta a los xenobióticos (*Xenobiotic Responsive Element*, XRE). Dichos elementos XRE han sido localizados en la región promotora diferentes genes, por ejemplo, el gen *CYP1A1*. Este proceso de regulación transcripcional puede dar lugar a un incremento o a una reducción en la tasa de expresión del gen diana. Desde una perspectiva toxicológica, TCDD provoca un amplio espectro de efectos bioquímicos y moleculares que, a nivel funcional, resultan en teratogénesis, inmunosupresión debida a la involución tímica, promoción de tumores y alteración de la homeostasis [166].

Además de esta actividad toxicológica, la vía del AhR puede interactuar directamente, y de manera independiente a la presencia de agentes tóxicos, con circuitos de señalización implicados en el desarrollo de los órganos. La desregulación de estas vías en líneas celulares y modelos murinos de ratón apoya la implicación de este receptor en varias enfermedades humanas como el cáncer, los trastornos inmunológicos, las patologías cardiovasculares y la infertilidad. Así, AhR interactúa con la vía $TGF\beta$ /BMP, la vía Wnt/ β -catenina, las vías de los receptores tirosina quinasa tales como el receptor del factor de crecimiento de los queratinocitos (KGFR), el VEGFR y el EGFR; adicionalmente, AhR también modula la vía de

señalización de Notch [167].

Se ha observado que la expresión de AhR se encuentra significativamente elevada en varias formas de cáncer como el gástrico [168], mama [169], renal [170] y pulmón [171]. En el caso del CHC, el estudio de Liu Z et al. comparó la expresión de AhR en células hepáticas normales y en hepatocarcinomas de origen humano, observando que la inmunorreactividad de AhR en los tejidos de CHC era significativamente mayor que en los tejidos hepáticos normales ($p=0.004$). Así mismo, en dicho estudio se comparó la expresión de AhR con factores epidemiológicos y clínico-patológicos, observándose la existencia de correlación entre AhR y la categoría "T" del tumor ($p=0.003$), siendo la tinción de AhR más intensa para hepatocarcinomas pobre/moderadamente diferenciados [165].

En línea con los resultados anteriormente expuestos, en nuestro estudio se objetiva una relación directa entre el grado de diferenciación tumoral y la sobreexpresión molecular de AhR, siendo el riesgo de presentar un grado de diferenciación tumoral pobre o indiferenciado de 6.964 veces superior en pacientes con sobreexpresión molecular de AhR con respecto al riesgo que presentan los pacientes con un grado de diferenciación bueno/moderado ($p=0.022$; HR 6.964, IC 95% 1.328-36.529).

El grado de diferenciación tumoral ha sido identificado en diversos estudios como un factor independiente que afecta tanto a la SG como a la SLE en pacientes con CHC que reciben TH ortotópico [172,173]. Teniendo esto en cuenta, así como la relación directa que se objetiva en nuestro estudio entre la sobreexpresión molecular de AhR y el grado de diferenciación tumoral, proponemos que la sobreexpresión molecular de AhR pueda estar implicada no sólo en la progresión tumoral sino también en su pronóstico, de acuerdo a lo sugerido para otros tipos de cánceres como el de mama, en el cual la expresión de AhR aparece como un factor independiente para la SG en pacientes sin afectación ganglionar [169].

En nuestro estudio, sin embargo, el análisis de los posibles factores implicados tanto en la SG como en la SLE, no confirman esta relación entre la sobreexpresión molecular de AhR y la supervivencia de los pacientes.

6.2. RELACIÓN ENTRE EL TAMAÑO TUMORAL Y LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE β -CATENINA

La β -catenina es un intermediario molecular esencial en la señalización de la ruta Wingless/Wnt, la cual es crítica durante el desarrollo embrionario y cuya desregulación está implicada en diversas patologías incluyendo el cáncer [82,83].

En relación al tamaño tumoral y a la expresión de β -catenina, el trabajo de Cieply et al. mostró que el tamaño medio de los tumores en los casos de CHC con mutaciones en el gen CTNNB1, que codifica la β -catenina, era significativamente mayor (>2 veces) que el de los tumores sin dicha mutación, con un tamaño tumoral >5 cm en seis de los nueve tumores del grupo conteniendo la mutación [174]. Posteriormente, Calderao et al. objetivaron que mutaciones en este mismo gen en muestras de CHC resecaadas se asociaba con tumores grandes (OR 2.14, $p=0.002$) [85].

Por otro lado, en el estudio de Gong et al. que analizó el valor pronóstico de β -catenina en los pacientes con hepatocarcinomas resecaados, no sólo se objetivó una correlación significativa entre la sobreexpresión de este marcador y el tamaño tumoral ($p=0.009$), sino que los pacientes con alta expresión de β -catenina presentaron un riesgo de mortalidad 1.69 veces mayor cuando se compara con el de los pacientes con baja expresión de β -catenina [175]. Similares resultados se han mostrado en el estudio de Han et al. en que analizaron la expresión de β -catenina y de la quinasa dependiente de Ciclina 8 (CDK8), mostrando que la expresión aberrante de CDK8 ($p<0.005$), de la β -catenina nuclear ($p<0.001$) y de la β -catenina de membrana ($p<0.05$) estaba aumentada de forma significativa en tumores >5 cm de diámetro. Además, la expresión combinada de CDK8 y de β -catenina resultaba en una peor SG en comparación con aquellos pacientes con expresión normal de ambos parámetros, siendo estos en el análisis multivariante factores pronósticos negativos independientes que afectan a la SG [176].

En nuestro caso, confirmamos dicho resultado, ya que el tamaño del nódulo mayor se relacionó de forma independiente con la sobreexpresión molecular de β -catenina ($p=0.026$; HR 1.032, IC 95% 1.004-1.061). No obstante, no pudimos establecer una relación entre la sobreexpresión molecular de β -catenina con la SG de los pacientes o con la SLE.

6.3. RELACIÓN ENTRE LA INFECCIÓN VÍRICA ACTIVA Y LA SOBREENPRESIÓN MOLECULAR DE β -CATENINA

En cuanto a la relación entre la infección vírica y la sobreexpresión molecular de β -catenina, en el análisis multivariante de Gong et al., para identificar características clínico-patológicas relacionadas con la expresión de este marcador, se mostró que, además del tamaño tumoral, la infección por VHB se correlaciona con niveles elevados de β -catenina ($p= 0.002$). No obstante, teniendo en cuenta que la tasa de infección por el VHB entre los participantes del estudio fue relativamente alta (73/86; 85%), cabe la posibilidad de que dicho resultado pueda ser debido a un sesgo selectivo [175].

En nuestro trabajo, el presentar infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica se relacionó de forma independiente con la sobreexpresión molecular de β -catenina, siendo el riesgo de presentar niveles elevados de esta proteína en los pacientes con infección vírica activa en el momento de la intervención quirúrgica de 8.069 veces con respecto a los que no la presentaron ($p=0.024$; HR 8.069, IC 95% 1.311-49.663). No obstante, esta categoría incluye pacientes con infección activa de VHC, VHB y VIH; manteniéndose activa en 9 pacientes de 18 (50%), en 1 paciente de 8 (10%) y en un único paciente (100%) para estos tipos virales, respectivamente.

6.4. RELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE NEUTRÓFILOS/LINFOCITOS Y LA EXPRESIÓN DE DE β -CATENINA

La respuesta inflamatoria sistémica tiene un papel importante en la carcinogénesis, provocando un aumento de las citoquinas y de los medidores inflamatorios, lo que predispone a que las células cancerígenas proliferen mediante la promoción de la angiogénesis, el daño al ADN y la inhibición de la apoptosis [177]. La activación de una respuesta inflamatoria sistémica puede detectarse entre otros parámetros mediante el INL [178].

Diversos estudios han señalado la elevación del INL como factor pronóstico de supervivencia en el cáncer colorrectal [179], el cáncer gástrico [180] y en el cáncer de ovario tanto de tumor primario [181] como de carcinomatosis peritoneal [182]. En el caso del CHC, este índice también se ha relacionado con el pronóstico de los pacientes en aquellos que son sometidos a resección curativa [183], quimioembolización arterial transcateter [184], RFA [185] y TH [186].

El metaanálisis de Wang et al., cuyo objetivo fue evaluar el factor pronóstico del INL preoperatorio en pacientes con CHC a los que se les realizaba hepatectomía, reveló que un INL preoperatorio alto tenía una estrecha relación con una menor SG ($p < 0.00001$, HR 1.52; IC 95% 1.37-1.69), presentando estos estudios una buena homogeneidad ($p = 0.14$, $I^2 = 30\%$). Así mismo, un INL preoperatorio elevado correlacionó con una peor SLE con respecto a índices bajos ($p < 0.00001$; HR 1.50; IC 95% 1.35-1.67). De igual manera, la homogeneidad en estos análisis fue buena ($p = 0.20$, $I^2 = 29\%$). Los valores de corte del INL oscilaron entre 1.505 y 5.00. En base a ello, cinco y tres estudios consideraron 2.81 y 2.00 como valores de corte [183].

En el metaanálisis de Xu et al., en el que se valoró el INL preoperatorio en pacientes con CHC sometidos a TH, el valor de corte osciló entre 2.3 y 6,0. Con respecto a la SG, un elevado INL pretratamiento se relacionó con una peor SG con respecto a los pacientes con un índice bajo ($p = 0.002$; HR 2.22; IC 95% 1.34-3.68). No obstante, se objetivó una importante heterogeneidad dentro de estos estudios ($p = 0.00001$, $I^2 = 85\%$). En cuanto a la SLE, un INL elevado se relacionó de igual forma con una peor SLE ($p = 0.01$; HR 2.51; IC 95% 1.22-5.15) en condiciones de estudio de una heterogeneidad significativa ($p < 0.00001$, $I^2 = 86\%$) [186].

En nuestro estudio, hemos identificado en el análisis de SLE que el INL se relacionó de forma independiente con la SLE en los pacientes tratados de CHC ($p = 0.019$; HR 0.333, IC 95% 0.132-0.838). Así mismo, objetivamos que dicho índice también se relaciona de forma independiente no sólo con la sobreexpresión mo-

lecular de β -catenina ($p=0.021$; HR 0.306, IC 95% 0.112-0.837), sino también cuando sus niveles de expresión se encuentran reprimidos ($p=0.092$; HR 0.149, IC 95% 0.016-1.367).

Continuando el análisis de este marcador, si analizamos la expresión de β -catenina dentro del conjunto de los posibles factores que puedan influir en la SLE, resulta queda excluida en el análisis multivariante. No obstante, al recodificarla como sobreexpresión objetivamos que se comporta como un factor independiente para la SLE ($p=0.023$; HR 3.938, IC 95% 1.207-12.845).

Teniendo en cuenta estos hallazgos, consideramos oportuno combinarlos para ver cómo influían en su conjunto con respecto a la SLE. Objetivamos que un INL alto actúa como un factor potenciador cuando tiene lugar simultáneamente con la sobreexpresión molecular de β -catenina, empeorando así la SLE de los pacientes. Este hecho, reafirma que la desregulación de la expresión de β -catenina está implicada en procesos carcinogénicos en el CHC, de acuerdo con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación. Como dato novedoso de este estudio, hemos confirmado que su combinación con otros factores, en este caso el INL (directamente implicado en la respuesta inmunológica) puede aumentar la predictibilidad a la hora de estimar la SLE de los pacientes con CHC.

El punto de corte del INL a partir del cual hemos considerado si su nivel es alto o bajo ha sido establecido en 2.3625 (sensibilidad 0.308, especificidad 0.68). A pesar de que el área bajo la curva es de 0.351, el valor se encuentra dentro del rango de valores descrito en otros estudios que relacionan el INL como factor pronóstico en pacientes tratados de CHC [183,186].

6.5. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE TAZ Y LAS VARIABLES ESTUDIADAS

La vía de señalización Hippo tiene un papel fundamental en el control del crecimiento y se encuentra conservada en todo el reino animal. Así, participa en el control del crecimiento de los órganos, en la función de las células madre, en la regeneración y en la supresión de tumores. De hecho, la vía Hippo está desregulada con gran frecuencia en muchos tipos de cánceres, lo que sugiere que la alteración de la señalización de Hippo está estrechamente relacionada con el inicio y/o la progresión de los tumores [187].

La función principal de la vía Hippo es regular negativamente la actividad del factor de transcripción asociado a Yes (Yes-Associated Protein, YAP) así como del coactivador transcripcional con unión al dominio PDZ (TAZ), ambos coactivadores transcripcionales homólogos principales intermediarios moleculares de esta vía. Como coactivadores transcripcionales, YAP/TAZ no pueden unirse al ADN directamente y deben interactuar con factores de transcripción de unión al ADN (Transcriptional Enhanced-Associated Domain, TEAD) para regular la expresión de sus genes diana [187,188]. Cuando la vía Hippo está desactivada, YAP/TAZ se fosforilan por quinasas de la familia Last (Last1/2), se translocan al núcleo y forman un factor transcripcional híbrido funcional con TEADs para activar genes pro-proliferativos y pro-supervivencia, permitiendo así la proliferación celular y evitando la muerte celular [189].

En el estudio de Hagenbeek et al. se mostró, empleando hígado de ratón, que la sobreexpresión de la forma activa de TAZ induce una importante infiltración de células mieloides y la secreción de citoquinas proinflamatorias a través de un mecanismo dependiente de TEADs, estableciendo, por tanto, un vínculo entre la actividad de TAZ y las respuestas inflamatorias que influyen en el desarrollo de tumores hepáticos [190].

En relación a la expresión de TAZ y a las características clínico-patológicas de los pacientes tratados de CHC, el estudio de Guo et al. correlacionó la expresión de este factor con el tamaño tumoral, con el estadio TNM, con la presencia de metástasis ganglionares o a distancia, con la diferenciación histológica y con la recidiva tumoral [191]. En nuestro estudio, hemos observado en el análisis univariante de factores clínico-patológicos que están relacionados con la sobreexpresión molecular de TAZ, existiendo una tendencia general a peores resultados en pacientes con sobreexpresión con respecto a aquellos en los que TAZ no variaba o se encontraba reprimido. Por otro lado, tanto en el análisis univariante para la sobreexpresión molecular de TAZ como en el análisis multivariante para la represión molecular de TAZ, el tamaño tumoral, la suma de los tamaños tumorales, el INL,

el IPL y el IIS, se encontró una relación estadísticamente significativa con ambos niveles de expresión molecular, siendo el IPL el único factor relacionado con la represión molecular de TAZ en el análisis multivariante ($p=0.024$; HR 1.025, IC 95% 1.003-1.047), lo que reafirma la idea anteriormente expuesta de que la expresión de TAZ y la respuesta inflamatoria están vinculadas en el desarrollo del CHC.

En cuanto al papel pronóstico de TAZ en el CHC, el estudio de Xiao et al. mostró que los tejidos de CHC con alta expresión de TAZ presentaban una peor SG ($p=0.001$) con respecto a los tejidos no tumorales; las tasas de SG a 1, 3 y 5 años fueron de 64.8, 29.6 y 23.8%, respectivamente, mientras que las tasas de los pacientes con baja expresión de TAZ fueron del 82.8, 72.4% y 66.8%, respectivamente [192]. En nuestro estudio, no hemos podido determinar que TAZ influya en la SG ni en la SLE en los pacientes con CHC tratados.

A pesar de que los resultados de nuestro estudio no son aún concluyentes, en vista a los resultados anteriormente expuestos, proponemos que la expresión de TAZ presenta propiedades oncogénicas potenciales en la hepatocarcinogénesis.

6.6. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO DE LA INVESTIGACIÓN

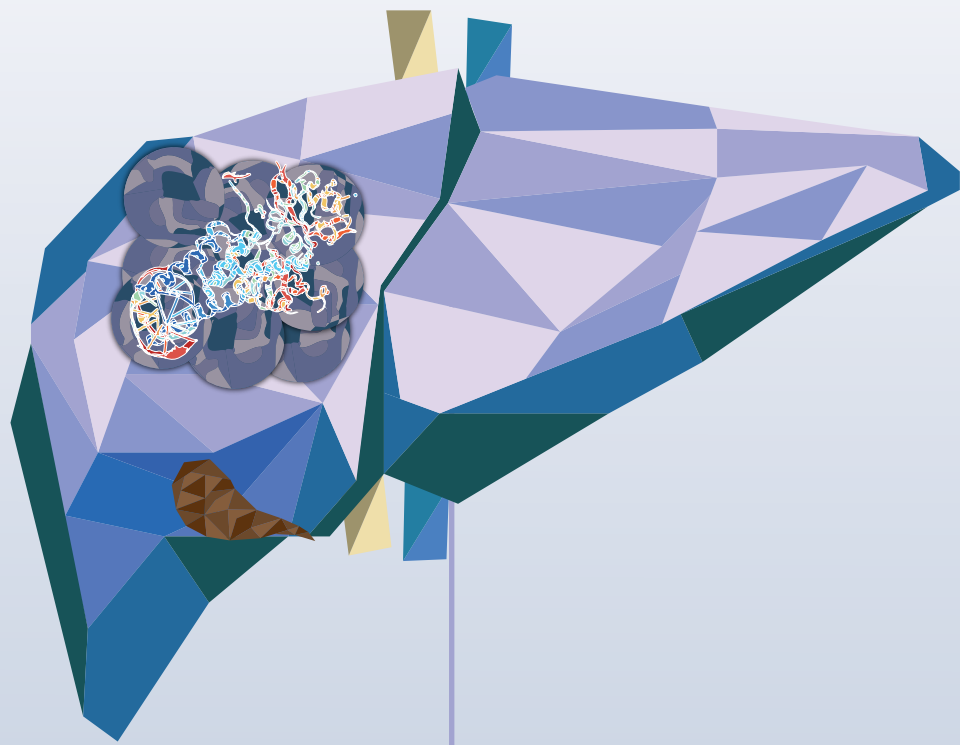
La limitación fundamental de nuestro estudio es el tamaño muestral, a pesar del período de tiempo de recopilación, las muestras recolectadas no han sido suficientes para confirmar aquellos hallazgos de pronóstico molecular objetivados en otros estudios. Entre ellos, la correlación entre YAP/TAZ así como la relación entre la expresión de TAZ o la expresión de β -catenina con la supervivencia de los pacientes. También hemos tenido limitaciones para comparar los hallazgos moleculares con aquellos factores pronósticos que a día de hoy están establecidos en el CHC, específicamente, la invasión vascular.

Otra de las limitaciones que presenta este estudio es la variabilidad de tratamientos que han recibido los pacientes, lo que, sumado a la limitación del tamaño muestral, no nos ha permitido realizar un análisis exhaustivo por subgrupos de tratamiento, lo que sin duda aportaría más información sobre la expresión de los marcadores analizados a nivel molecular y sobre su pronóstico según el tratamiento recibido.

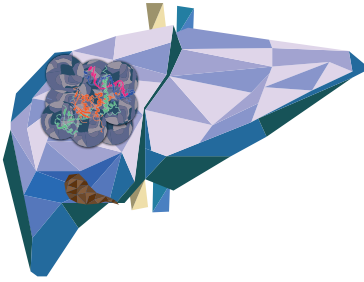
No obstante, a pesar de las limitaciones, los hallazgos alcanzados permiten confirmar el potencial que presenta esta línea de investigación para trabajos futuros.

Como punto positivo a destacar en el diseño de nuestro trabajo, se trata de un estudio en el que las muestras están apareadas, de manera que los hallazgos moleculares surgen de la comparación de tejido no tumoral y tejido tumoral en un mismo paciente, disminuyendo así la variabilidad en los resultados moleculares y siendo estos hallazgos comparables a nuestra población.

Por último, consideramos que éste es un estudio novedoso, ya que combina la expresión molecular con los hallazgos clínicos de los pacientes. El establecimiento de esta conexión entendemos que facilitará el estudio de la enfermedad en su conjunto. De esta forma, completando este proyecto podremos, en un futuro, ofrecer al paciente el mejor tratamiento, fundamentado el manejo del paciente en un algoritmo individualizado basado tanto en parámetros de expresión molecular como en parámetros clínico-patológicos. La continuación de esta línea de investigación nos permitirá precisar estas conexiones, así como incorporar nuevos parámetros al mapa clínico-molecular del paciente.

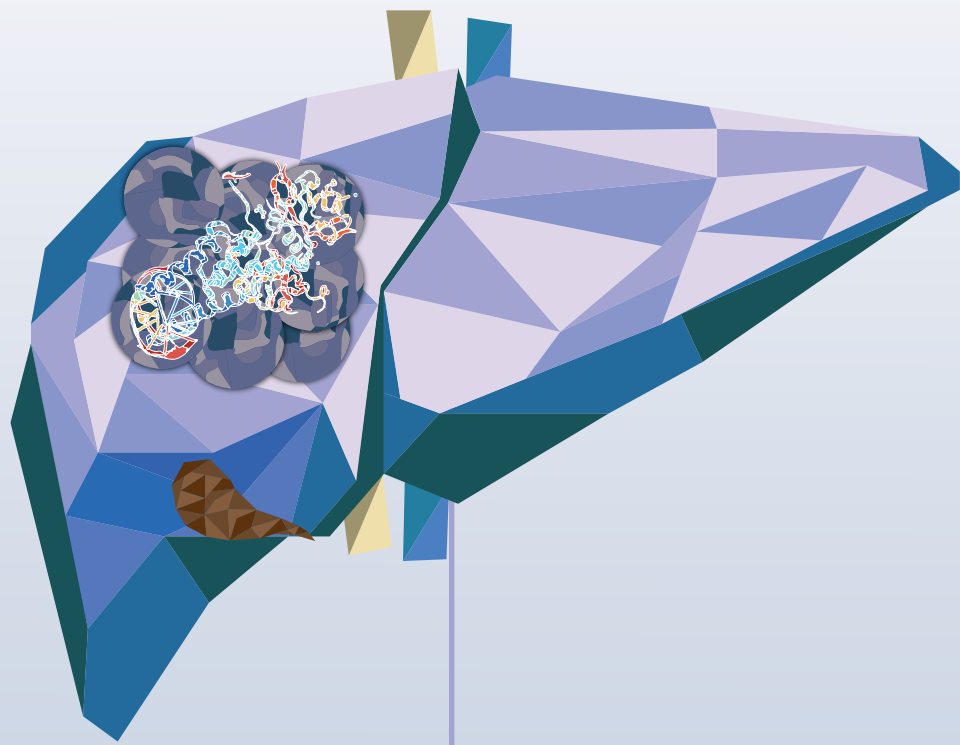


7. CONCLUSIONES

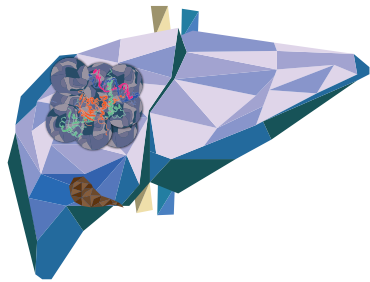


CONCLUSIONES

- El grado de diferenciación tumoral pobre o indiferenciado se relaciona de forma directa con la sobreexpresión molecular de AhR, por tanto, la sobreexpresión molecular de AhR puede estar implicada en la progresión tumoral y en el pronóstico del CHC.
- Existe una importante correlación entre los niveles de β -catenina y los parámetros patológicos como es el tamaño tumoral, el INL y la infección vírica activa.
- La sobreexpresión molecular de β -catenina se relaciona con una peor SLE y su combinación con un INL alto empeora este pronóstico.
- La expresión de TAZ presenta propiedades oncogénicas potenciales en la hepatocarcinogénesis dada la relación objetivada en este estudio con el tamaño tumoral, la suma de los tamaños tumorales, el INL, el IPL y el IIS.



8. BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- [1] Suriawinata AA, Thung SN. Malignant liver tumors. *Clin Liver Dis* 2002;6:527–54. [https://doi.org/10.1016/S1089-3261\(02\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S1089-3261(02)00005-3).
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [3] McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis* 2015;19:223–38. <https://doi.org/10.1159/000315223>.
- [4] Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management 2019;16:589–604. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y.A>.
- [5] Park JW, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen PJ, et al. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: The BRIDGE Study. *Liver Int* 2015;35:2155–66. <https://doi.org/10.1111/liv.12818>.
- [6] Theise ND. Cirrhosis and hepatocellular neoplasia: more like cousins than like parent and child. *Gastroenterology* 1996;111:526–8.
- [7] El-serag HB. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:1118–27.
- [8] Singal AG, El-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:2140–51. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.08.014>.
- [9] Tang A, Hallouch O, Chernyak V, Kamaya A, Sirlin CB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. *Abdom Radiol* 2018;43:13–25. <https://doi.org/10.1007/s00261-017-1209-1>.
- [10] Roncalli M, Terracciano L, Di Tommaso L, David E, Colombo M. Liver precancerous lesions and hepatocellular carcinoma: The histology report. *Dig Liver Dis* 2011;43:361–72. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(11\)60592-6](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(11)60592-6).
- [11] Borzio M, Fargion S, Borzio F, Fracanzani AL, Croce AM, Stroffolini T, et al. Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 2003;39:208–14. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00190-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00190-9).
- [12] Kobayashi M, Ikeda K, Hosaka T, Sezaki H, Someya T, Akuta N, et al. Dysplastic nodules frequently develop into hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis and cirrhosis. *Cancer* 2006;106:636–47. <https://doi.org/10.1002/cncr.21607>.
- [13] Massarweh NN, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control* 2017;24:1–11. <https://doi.org/10.1177/1073274817729245>.
- [14] Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, arid current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004;11:97–107. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2003.00487.x>.
- [15] Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2015;149:1226-1239.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.061>.
- [16] McGlynn KA, Evans AA, Thomas London W. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2012;142:1264–73. https://doi.org/10.1142/9789814299794_0003.
- [17] World Health Organization. Hepatitis C 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (accessed June 4, 2020).
- [18] Lemon SM, McGivern DR. Is hepatitis C virus carcinogenic? *Gastroenterology* 2012;142:1274–8.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.01.045>.

- [19] Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: The effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002;155:323–31. <https://doi.org/10.1093/aje/155.4.323>.
- [20] Anzola M. Hepatocellular carcinoma: Role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 2004;11:383–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2004.00521.x>.
- [21] Cho LY, Yang JJ, Ko KP, Park B, Shin A, Lim MK, et al. Coinfection of hepatitis B and C viruses and risk of hepatocellular carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2011;128:176–84. <https://doi.org/10.1002/ijc.25321>.
- [22] Huang YT, Jen CL, Yang HI, Lee MH, Su J, Lu SN, et al. Lifetime risk and sex difference of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis B and C. *J Clin Oncol* 2011;29:3643–50. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.2335>.
- [23] Diaz G, Engle RE, Tice A, Melis M, Montenegro S, Rodriguez-Canales J, et al. Molecular signature and mechanisms of hepatitis D virus-associated hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Res* 2018;16:1406–19. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0012>.
- [24] Ji J, Sundquist K, Sundquist J. A Population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:790–2. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs168>.
- [25] Testino G, Leone S, Borro P. Alcohol and hepatocellular carcinoma: A review and a point of view. *World J Gastroenterol* 2014;20:15943–54. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.15943>.
- [26] Turati F, Galeone C, Rota M, Pelucchi C, Negri E, Bagnardi V, et al. Alcohol and liver cancer: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol* 2014;25:1526–35. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu020>.
- [27] Gutjahr E, Gmel G, Rehm J. Relation between average alcohol consumption and disease: An overview. *Eur Addict Res* 2001;7:117–27. <https://doi.org/10.1159/000050729>.
- [28] Heckley GA, Jarl J, Asamoah BO, G-Gerdtham U. How the risk of liver cancer changes after alcohol cessation: A review and meta-analysis of the current literature. *BMC Cancer* 2011;11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-446>.
- [29] Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: Synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002;36:1206–13. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36780>.
- [30] Loomba R, Yang HI, Su J, Brenner D, Iloeje U, Chen CJ. Obesity and alcohol synergize to increase the risk of incident hepatocellular carcinoma in men. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:891–898.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.06.027>.
- [31] Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans Is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:124–131.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.07.019>.
- [32] Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:274–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x>.
- [33] Welzel TM, Graubard BI, Zeuzem S, El-Serag HB, Davila JA, McGlynn KA. Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: A study in the SEER-medicare database. *Hepatology* 2011;54:463–71. <https://doi.org/10.1002/hep.24397>.
- [34] Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1106–22. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106>.
- [35] Kew MC. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis* 2013;22:305–10.
- [36] Chu Y, Yang H, Wu H, Liu J, Wang L, Lee M, et al. Aflatoxin B1 exposure increases the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Int J Cancer* 2017;141:711–20. <https://doi.org/10.1002/ijc.30782>.
- [37] Elmberg M, Hultcrantz R, Ekbom A, Brandt L, Olsson S, Olsson R, et al. Cancer Risk in Patients with Hereditary Hemochromatosis and in Their First-Degree Relatives. *Gastroenterology* 2003;125:1733–41. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.09.035>.

- [38] Fracanzani AL, Conte D, Fraquelli M, Taioli E, Mattioli M, Losco A, et al. Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease. *Hepatology* 2001;33:647–51. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22506>.
- [39] Rosencrantz RA, Lecompte L, Yusuf Y. Beneath the Copper-Pediatric Wilson's Disease Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma: A Case Report with Literature Review. *Semin Liver Dis* 2015;35:434–8. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1567828>.
- [40] Walshe JM, Waldenström E, Sams V, Norlinder H, Westermark K. Abdominal malignancies in patients with Wilson's disease. *QJM - Mon J Assoc Physicians* 2003;96:657–62. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcg114>.
- [41] Antoury C, Lopez R, Zein N, Stoller JK, Alkhoury N. Alpha-1 antitrypsin deficiency and the risk of hepatocellular carcinoma in end-stage liver disease. *World J Hepatol* 2015;7:1427–32. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i10.1427>.
- [42] Stewart MF. Review of hepatocellular cancer , hypertension and renal impairment as late complications of acute porphyria and recommendations for patient. *J Clinical Pathology* 2012;65:976–81. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-200791>.
- [43] Gupta A, Das A, Majumder K, Arora N, Mayo HG, Singh PP, et al. Obesity is Independently Associated with Increased Risk of Hepatocellular Cancer-related Mortality. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials* 2018;41:874–81. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000388>.
- [44] Chen CL, Yang HI, Yang WS, Liu CJ, Chen PJ, You SL, et al. Metabolic Factors and Risk of Hepatocellular Carcinoma by Chronic Hepatitis B/C Infection: A Follow-up Study in Taiwan. *Gastroenterology* 2008;135:111–21. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.073>.
- [45] Berentzen TL, Gamborg M, Holst C, Sørensen TIA, Baker JL. Body mass index in childhood and adult risk of primary liver cancer. *J Hepatol* 2014;60:325–30. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.09.015>.
- [46] El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: A systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:369–80. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2005.12.007>.
- [47] Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: A longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005;42:132–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.09.012>.
- [48] Li X, Wang X, Gao P. Diabetes Mellitus and Risk of Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int* 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5202684>.
- [49] Thakkar B, Aronis KN, Vamvini MT, Shields K, Mantzoros CS. Metformin and Sulfonylureas in Relation to Cancer Risk in Type II Diabetes Patients: A Meta-analysis using primary data of published studies. *Metabolism* 2013;62:922–34. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.01.014>.
- [50] Singh S, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W. Anti-diabetic medications and the risk of hepatocellular cancer: A systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2013;108:881–91. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.5>.
- [51] Lee YCA, Cohet C, Yang YC, Stayner L, Hashibe M, Straif K. Meta-analysis of epidemiologic studies on cigarette smoking and liver cancer. *Int J Epidemiol* 2009;38:1497–511. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp280>.
- [52] Petrick JL, Campbell PT, Koshiol J, Thistle JE, Andreotti G, Beane-Freeman LE, et al. Tobacco, alcohol use and risk of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: The Liver Cancer Pooling Project. *Br J Cancer* 2018;118:1005–12. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0007-z>.
- [53] Prorok PC. Epidemiologic approach for cancer screening. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992;14:117–28.
- [54] Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:417–22. <https://doi.org/10.1007/s00432-004-0552-0>.
- [55] Singal AG, Pillai A, Tiro J. Early Detection, Curative Treatment, and Survival Rates for Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients with Cirrhosis: A Meta-analysis. *PLoS Med* 2014;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001624>.
- [56] Papatheodoridis G, Dalekos G, Sypsa V, Yurdaydin C, Buti M, Goulis J, et al. PAGE-B predicts the

risk of developing hepatocellular carcinoma in Caucasians with chronic hepatitis B on 5-year antiviral therapy. *J Hepatol* 2016;64:800–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.035>.

- [57] Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul JL, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018;69:182–236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>.
- [58] Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, et al. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018;68:723–50. <https://doi.org/10.1002/hep.29913>.
- [59] Omata M, Cheng AL, Kokudo N, Kudo M, Lee JM, Jia J, et al. Asia–Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update. *Hepatol Int* 2017;11:317–70. <https://doi.org/10.1007/s12072-017-9799-9>.
- [60] Llovet JM, Ducreux M, Lencioni R, Di Bisceglie AM, Galle PR, Dufour JF, et al. EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012;56:908–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>.
- [61] CT/MRI LI-RADS v2018 CORE. *Am Coll Radiol* 2018;1–58. <https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/RADS/LI-RADS/LI-RADS-2018-Core.pdf>.
- [62] Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* 2020;76:182–8. <https://doi.org/10.1111/his.13975>.
- [63] Kojiro M, Wanless IR, Alves V, Badve S, Balabaud C, Bedosa P, et al. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. *Hepatology* 2009;49:658–64. <https://doi.org/10.1002/hep.22709>.
- [64] Choi WT, Kakar S. Immunohistochemistry in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2017;46:311–25. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.01.006>.
- [65] Tremosini S, Forner A, Boix L, Vilana R, Bianchi L, Reig M, et al. Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut* 2012;61:1481–7. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301862>.
- [66] Galle PR, Foerster F, Kudo M, Chan SL, Llovet JM, Qin S, et al. Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2019;1–16. <https://doi.org/10.1111/liv.14223>.
- [67] Terentiev AA, Moldogazieva NT. Alpha-fetoprotein : a renaissance. *Tumor Biol* 2013;34:2071–91. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0904-y>.
- [68] Trevisani F, Intino PED, Morselli-labate AM, Mazzella G, Accogli E, Caraceni P, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease : influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol* 2001;34:570–5.
- [69] Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, Saito K, Uemura Y, Nakatsura T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2015;21:10573–83. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10573>.
- [70] Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, et al. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* 2003;38:200–7. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(02\)00360-4](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(02)00360-4).
- [71] Cha C, Fong Y, Jarnagin WR, Blumgart LH, DeMatteo RP. Predictors and patterns of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg* 2003;197:753–8. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2003.07.003>.
- [72] Liu L, Miao R, Yang H, Lu X, Zhao Y, Mao Y, et al. Prognostic factors after liver resection for hepatocellular carcinoma: A single-center experience from China. *Am J Surg* 2012;203:741–50. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2011.05.010>.
- [73] Ikai I, Arii S, Kojiro M, Ichida T, Makuuchi M, Matsuyama Y, et al. Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey. *Cancer* 2004;101:796–802. <https://doi.org/10.1002/cncr.20426>.
- [74] Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005;25:181–200. <https://doi.org/10.1055/s-2005-871198>.
- [75] Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Predicting survival after

liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol* 2009;10:35–43. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70284-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70284-5).

- [76] Yamazoe T, Mori T, Yoshio S, Kanto T. Hepatocyte ploidy and pathological mutations in hepatocellular carcinoma: impact on oncogenesis and therapeutics. *Glob Heal Med* 2020;2:273–81. <https://doi.org/10.35772/ghm.2020.01089>.
- [77] Oversoe SK, Clement MS, Pedersen MH, Weber B, Aagaard NK, Villadsen GE, et al. TERT promoter mutated circulating tumor DNA as a biomarker for prognosis in hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 2020;55:1433–40. <https://doi.org/10.1080/00365521.2020.1837928>.
- [78] in der Stroth L, Tharehalli U, Günes C, Lechel A. Telomeres and telomerase in the development of liver cancer. *Cancers (Basel)* 2020;12:1–24. <https://doi.org/10.3390/cancers12082048>.
- [79] Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun* 2013;4:1–6. <https://doi.org/10.1038/ncomms3218>.
- [80] Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet* 2014;46:1267–73. <https://doi.org/10.1038/ng.3126>.
- [81] Pezzuto F, Izzo F, Buonaguro L, Annunziata C, Tatangelo F, Botti G, et al. Tumor specific mutations in TERT promoter and CTNNB1 gene in hepatitis B and hepatitis C related hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016;7:54253–62.
- [82] Annick Buendia M. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2000;10:185–200. <https://doi.org/10.1006/scbi.2000.0319>.
- [83] Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 2017;36:1461–73. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>.
- [84] Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000;24:245–50. <https://doi.org/10.1038/73448>.
- [85] Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouzé E, Blanc JF, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol* 2017;67:727–38. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.014>.
- [86] Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* 2015;47:505–11. <https://doi.org/10.1038/ng.3252>. Exome.
- [87] Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G-->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8586–90.
- [88] Vautier G, Bomford AB, Portmann BC, Metivier E, Williams R, Ryder SD. p53 mutations in British patients with hepatocellular carcinoma: Clustering in genetic hemochromatosis. *Gastroenterology* 1999;117:154–60. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70562-7](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70562-7).
- [89] Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, Murray JI, Ball CA, Alexander KE, et al. Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. *Mol Biol Cell* 2002;13:1977–2000. <https://doi.org/10.1091/mbc.02>.
- [90] Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M, Hirohashi S. p53 Gene Mutation Spectrum in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 1992;52:6358–64.
- [91] Conte M, Altucci L. Molecular pathways: The complexity of the epigenome in cancer and recent clinical advances. *Clin Cancer Res* 2012;18:5526–34. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2037>.
- [92] Saito Y, Hibino S, Saito H. Alterations of epigenetics and microRNA in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2014;44:31–42. <https://doi.org/10.1111/hepr.12147>.
- [93] Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: The Good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* 2012;12:564–71. <https://doi.org/10.1038/nrc3278>.
- [94] Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad I Ben, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012;44:694–8. <https://doi.org/10.1038/ng.2256>.

- [95] Galuppo R, Ramaiah D, Ponte OM, Gedaly R. Molecular therapies in hepatocellular carcinoma: What can we target? *Dig Dis Sci* 2014;59:1688–97. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3058-x>.
- [96] Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, et al. Pivotal Role of mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2008;135:1–21. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.08.008>.
- [97] Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DY, Solé M, et al. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *J Hepatol* 2010;52:550–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.01.015>.
- [98] Newell P, Toffanin S, Villanueva A, Chiang DY, Minguez B, Cabellos L, et al. Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo. *J Hepatol* 2009;51:725–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.028>.Ras.
- [99] Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. *AJCC cancer staging manual*. 8th ed. New York: Springer; 2016.
- [100] Kamarajah SK, Frankel TL, Sonnenday C, Cho CS, Nathan H. Critical evaluation of the American Joint Commission on Cancer (AJCC) 8th edition staging system for patients with Hepatocellular Carcinoma (HCC): A Surveillance, Epidemiology, End Results (SEER) analysis. *J Surg Oncol* 2018;117:644–50. <https://doi.org/10.1002/jso.24908>.
- [101] Satala CB, Jung I, Kobori L, Kovacs Z, Fodor D, Szodorai R, et al. Benefits of the 8th American Joint Committee on Cancer System for Hepatocellular Carcinoma Staging. *J Gastrointest Cancer* 2020;5–7. <https://doi.org/10.1007/s12029-020-00394-z>.
- [102] Park S, Choi S, Cho YA, Sinn DH, Kim JM, Park CK, et al. Evaluation of the american joint committee on cancer (AJCC) 8th edition staging system for hepatocellular carcinoma in 1,008 patients with curative resection. *Cancer Res Treat* 2020;52:1145–52. <https://doi.org/10.4143/crt.2020.208>.
- [103] Zhang G, Li R, Zhao X, Meng S, Ye J, Zhao L. Validation of the American Joint Committee on Cancer eighth edition staging system in patients undergoing hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a US population-based study. *J Surg Res* 2018;222:55–68. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.09.044>.
- [104] Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, et al. Natural History of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. *Cancer* 1985;56:918–28.
- [105] Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: The BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999;19:329–37. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007122>.
- [106] Manghisi G, Elba S, Mossa A, Giorgio A, Aloisio V, Perrotta A, et al. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: A retrospective study of 435 patients. *Hepatology* 1998;28:751–5. <https://doi.org/10.1002/hep.510280322>.
- [107] Pererrone F, Daniele B, Battista Gaeta G, Pignata S, Gallo C, Izzo F, et al. Prospective validation of the CLIP score: A new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:840–5. <https://doi.org/10.1053/he.2000.5628>.
- [108] Liu PH, Hsu CY, Hsia CY, Lee YH, Su CW, Huang YH, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: Assessment of eleven staging systems. *J Hepatol* 2016;64:601–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.10.029>.
- [109] Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1999;31:133–41. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(99\)80173-1](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80173-1).
- [110] Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-Fàbrega J, Burrel M, Garcia-Criado Á, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.11.018>.
- [111] Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: Comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology* 2005;41:707–15. <https://doi.org/10.1002/hep.20636>.
- [112] Cillo U, Vitale A, Grigoletto F, Farinati F, Brolese A, Zanusi G, et al. Prospective validation of the Barcelona Clinic Liver Cancer staging system. *J Hepatol* 2006;44:723–31. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.12.015>.
- [113] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2018;391:1301–14. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30910-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30910-9).

org/10.1016/S0140-6736(18)30010-2.

- [114] Torzilli G, Belghiti J, Kokudo N, Takayama T, Capussotti L, Nuzzo G, et al. A snapshot of the effective indications and results of surgery for hepatocellular carcinoma in tertiary referral centers: Is it adherent to the EASL/AASLD recommendations? An observational study of the HCC east-west study group. *Ann Surg* 2013;257:929–37. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e31828329b8>.
- [115] Bolondi L, Burroughs A, Dufour JF, Galle PR, Mazzaferro V, Piscaglia F, et al. Heterogeneity of patients with intermediate (BCLC B) hepatocellular carcinoma: Proposal for a subclassification to facilitate treatment decisions. *Semin Liver Dis* 2012;32:348–59. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1329906>.
- [116] Leung TWT, Tang AMY, Zee B, Lau WY, Lai PBS, Leung KL, et al. Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: A study based on 926 patients. *Cancer* 2002;94:1760–9. <https://doi.org/10.1002/cncr.10384>.
- [117] Kudo M, Chung H, Osaki Y. Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): Its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (JIS score). *J Gastroenterol* 2003;38:207–15. <https://doi.org/10.1007/s005350300038>.
- [118] Han KH, Kudo M, Ye SL, Choi JY, Poon RTP, Seong J, et al. Asian consensus workshop report: Expert consensus guideline for the management of intermediate and advanced hepatocellular carcinoma in Asia. *Oncology* 2011;81:158–64. <https://doi.org/10.1159/000333280>.
- [119] Yau T, Tang VYF, Yao TJ, Fan ST, Lo CM, Poon RTP. Development of Hong Kong liver cancer staging system with treatment stratification for patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2014;146:1691–1700.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.032>.
- [120] de Freitas LBR, Longo L, Santos D, Grivicich I, Álvares-da-Silva MR. Hepatocellular carcinoma staging systems: Hong Kong liver cancer vs Barcelona clinic liver cancer in a Western population. *World J Hepatol* 2019;11:678–88. <https://doi.org/10.4254/wjh.v11.i9.678>.
- [121] Heinrich S, Sprinzl M, Schmidtman I, Heil E, Koch S, Czuderna C, et al. Validation of prognostic accuracy of MESH, HKLC, and BCLC classifications in a large German cohort of hepatocellular carcinoma patients. *United Eur Gastroenterol J* 2020;8:444–52. <https://doi.org/10.1177/2050640620904524>.
- [122] Allaire M, Goumard C, Lim C, Le Cleach A, Wagner M, Scatton O. New frontiers in liver resection for hepatocellular carcinoma. *JHEP Reports* 2020;2:100134. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100134>.
- [123] Citterio D, Facciorusso A, Sposito C, Rota R, Bhoori S, Mazzaferro V. Hierarchic interaction of factors associated with liver decompensation after resection for hepatocellular carcinoma. *JAMA Surg* 2016;151:846–53. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2016.1121>.
- [124] Azoulay D, Ramos E, Casellas-Robert M, Salloum C, Lladó L, Nadler R, et al. Liver resection for hepatocellular carcinoma in patients with clinically significant portal hypertension. *JHEP Reports* 2021;3:100190. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100190>.
- [125] Tabrizian P, Jibara G, Shrager B, Schwartz M, Roayaie S. Recurrence of Hepatocellular Cancer after Resection: Patterns, Treatments, and Prognosis. *Ann Surg* 2015;261:947–55. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000710>.
- [126] Poon RTP, Sheung TF, Chung M Lo, Chi LL, Wong J. Long-term survival and pattern of recurrence after resection of small hepatocellular carcinoma in patients with preserved liver function: Implications for a strategy of salvage transplantation. *Ann Surg* 2002;235:373–82. <https://doi.org/10.1097/0000658-200203000-00009>.
- [127] Nagasue N, Uchida M, Makino Y, Takemoto Y, Yamanoi A, Hayashi T, et al. Incidence and factors associated with intrahepatic recurrence following resection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1993;105:488–94. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90724-Q](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90724-Q).
- [128] Plessier A, Codes L, Consigny Y, Sommacale D, Dondero F, Cortes A, et al. Underestimation of the influence of satellite nodules as a risk factor for post-transplantation recurrence in patients with small hepatocellular carcinoma. *Liver Transplant* 2004;10:86–90. <https://doi.org/10.1002/lt.20039>.
- [129] Truant S, Boleslawski E, Duhamel A, Bouras AF, Louvet A, Febvay C, et al. Tumor size of hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver: A controversial predictive factor for outcome after resection. *Eur J Surg Oncol* 2012;38:1189–96. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2012.07.112>.

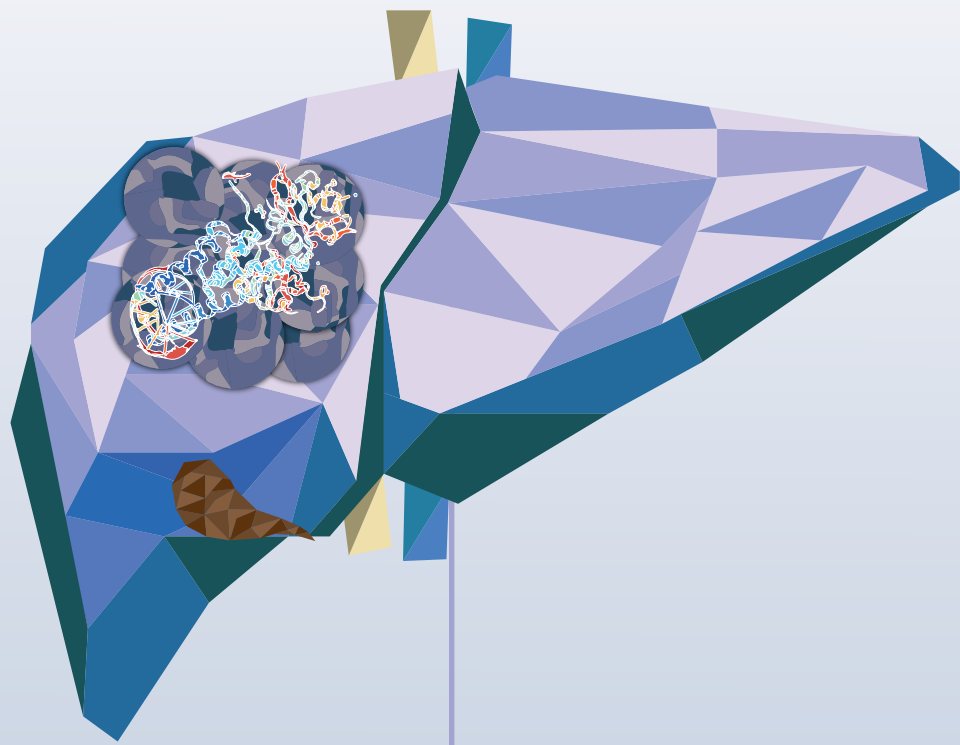
- [130] Ferrer-Fàbrega J, Forner A, Liccioni A, Miquel R, Molina V, Navasa M, et al. Prospective validation of ab initio liver transplantation in hepatocellular carcinoma upon detection of risk factors for recurrence after resection. *Hepatology* 2016;63:839–49. <https://doi.org/10.1002/hep.28339>.
- [131] Mazzaferro V, REGALIA E, DOCI R, ANDREOLA S, PULVIRENTI A, BOZZETTI F, et al. Carcinomas in Patients With Cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334:693–9.
- [132] Vibert E, Schwartz M, Olthoff KM. Advances in resection and transplantation for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2020;72:262–76. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.11.017>.
- [133] Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464–70. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22172>.
- [134] Sapisochin G, Bruix J. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Outcomes and novel surgical approaches. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:203–17. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.193>.
- [135] Lee HW, Lee JM, Yoon JH, Kim YJ, Park JW, Park SJ, et al. A prospective randomized study comparing radiofrequency ablation and hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Treat Res* 2018;94:74–82. <https://doi.org/10.4174/astr.2018.94.2.74>.
- [136] Cucchetti A, Piscaglia F, Cescon M, Colecchia A, Ercolani G, Bolondi L, et al. Cost-effectiveness of hepatic resection versus percutaneous radiofrequency ablation for early hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2013;59:300–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.009>.
- [137] Yu J, Yu XL, Han ZY, Cheng ZG, Liu FY, Zhai HY, et al. Percutaneous cooled-probe microwave versus radiofrequency ablation in early-stage hepatocellular carcinoma: A phase III randomized controlled trial. *Gut* 2017;66:1172–3. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312629>.
- [138] Raoul JL, Forner A, Bolondi L, Cheung TT, Kloeckner R, de Baere T. Updated use of TACE for hepatocellular carcinoma treatment: How and when to use it based on clinical evidence. *Cancer Treat Rev* 2019;72:28–36. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.11.002>.
- [139] Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003;37:429–42. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50047>.
- [140] Lencioni R, de Baere T, Soulen MC, Rilling WS, Geschwind JFH. Lipiodol transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: A systematic review of efficacy and safety data. *Hepatology* 2016;64:106–16. <https://doi.org/10.1002/hep.28453>.
- [141] Llovet JM, Mas X, Aponte JJ, Fuster J, Navasa M, Christensen E, et al. Cost effectiveness of adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma during the waiting list for liver transplantation. *Gut* 2002;50:123–8. <https://doi.org/10.1136/gut.50.1.123>.
- [142] Alba E, Valls C, Dominguez J, Martinez L, Escalante E, Lladó L, et al. Transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma on the waiting list for orthotopic liver transplantation. *Am J Roentgenol* 2008;190:1341–8. <https://doi.org/10.2214/AJR.07.2972>.
- [143] Millonig G, Graziadei IW, Freund MC, Jaschke W, Stadlmann S, Ladurner R, et al. Response to preoperative chemoembolization correlates with outcome after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transplant* 2007;13:272–9. <https://doi.org/10.1002/lt>.
- [144] B. S, R. S. Transarterial chemoembolization and radioembolization. *Semin Liver Dis* 2014;34:435–43.
- [145] Sangro B, Iñarrairaegui M, Bilbao JI. Radioembolization for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012;56:464–73. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.07.012>.
- [146] Kolligs FT, Bilbao JI, Jakobs T, Iñarrairaegui M, Nagel JM, Rodriguez M, et al. Pilot randomized trial of selective internal radiation therapy vs. chemoembolization in unresectable hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2015;35:1715–21. <https://doi.org/10.1111/liv.12750>.
- [147] Pitton MB, Kloeckner R, Ruckes C, Wirth GM, Eichhorn W, Wörns MA, et al. Randomized Comparison of Selective Internal Radiotherapy (SIRT) Versus Drug-Eluting Bead Transarterial Chemoembolization (DEB-TACE) for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2015;38:352–60. <https://doi.org/10.1007/s00270-014-1012-0>.
- [148] Salem R, Gordon AC, Mouli S, Hickey R, Kallini J, Gabr A, et al. Y90 Radioembolization Significantly Prolongs Time to Progression Compared With Chemoembolization in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2016;151:1155–63. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.029>.

- [149] Gardini AC, Tamburini E, Iñarrairaegui M, Frassinetti GL, Sangro B. Radioembolization versus chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: A meta-analysis of randomized trials. *Onco Targets Ther* 2018;11:7315–21. <https://doi.org/10.2147/OTT.S175715>.
- [150] Seinstra BA, Defreyne L, Lambert B, Lam MGEH, Verkooijen HM, van Erpecum KJ, et al. Transarterial RAdioembolization versus ChemoEmbolization for the treatment of hepatocellular carcinoma (TRACE): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2012;13:1. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-13-144>.
- [151] Vilgrain V, Pereira H, Assenat E, Guiu B, Ilonca AD, Pageaux GP, et al. Efficacy and safety of selective internal radiotherapy with yttrium-90 resin microspheres compared with sorafenib in locally advanced and inoperable hepatocellular carcinoma (SARAH): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017;18:1624–36. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30683-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30683-6).
- [152] Chow PKH, Gandhi M, Tan SB, Khin MW, Khasbazar A, Ong J, et al. SIRveNIB: Selective internal radiation therapy versus sorafenib in Asia-Pacific patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2018;36:1913–21. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.0892>.
- [153] Ricke J, Klumpen HJ, Amthauer H, Bargellini I, Bartenstein P, de Toni EN, et al. Impact of combined selective internal radiation therapy and sorafenib on survival in advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2019;71:1164–74. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.006>.
- [154] Edeline J, Raoul JL, Vauleon E, Guillygomac'h A, Boudjema K, Boucher E. Systemic chemotherapy for hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A retrospective study. *World J Gastroenterol* 2009;15:713–6. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.713>.
- [155] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–90. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0708857>.
- [156] Kudo M, Finn R, Qin S, Han K-H, Piscaglia F, Baron A, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2018;391:1163–73.
- [157] Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017;389:56–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32453-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32453-9).
- [158] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:1208–36. <https://doi.org/10.1002/hep.20933>.
- [159] Hu B, Yang XR, Xu Y, Sun YF, Sun C, Guo W, et al. Systemic immune-inflammation index predicts prognosis of patients after curative resection for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2014;20:6212–22. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0442>.
- [160] Strasberg SM, Belghiti J, Clavien P-A, Gadzijev E, Garden JO, Lau W-Y, et al. The Brisbane 2000 Terminology of Liver Anatomy and Resections. *Hpb* 2000;2:333–9. [https://doi.org/10.1016/s1365-182x\(17\)30755-4](https://doi.org/10.1016/s1365-182x(17)30755-4).
- [161] Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: A new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004;240:205–13. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000133083.54934.ae>.
- [162] Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954;7:462–503.
- [163] Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2017;67:93–9. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>.
- [164] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [165] Liu Z, Wu X, Zhang F, Han L, Bao G, He X, et al. AhR expression is increased in hepatocellular carcinoma. *J Mol Histol* 2013;44:455–61. <https://doi.org/10.1007/s10735-013-9495-6>.
- [166] Mimura J, Fujii-kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 2003;1619:263–8.
- [167] Roman AC, Carvajal-Gonzalez JM, Merino JM, Mulero-Navarro S, Fernández-Salguero PM. The

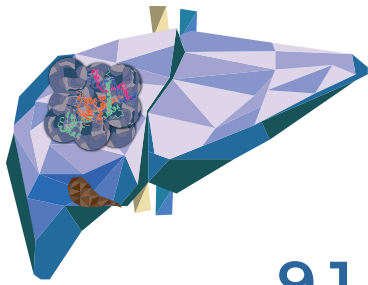
aryl hydrocarbon receptor in the crossroad of signalling networks with therapeutic value. *Pharmacol Ther* 2018;185:50–63. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.12.003>.

- [168] Yin X, Chen J, Mao W, Wang Y, Chen M. A selective aryl hydrocarbon receptor modulator 3, 3'-Diindolylmethane inhibits gastric cancer cell growth. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31:1–9.
- [169] Jeschke U, Zhang X, Kuhn C, Colinge J, Sixou S, Cavaillès V. The Prognostic Impact of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in Primary Breast Cancer Depends on the Lymph Node Status. *Int J Mol Sci* 2019;20:1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms20051016>.
- [170] Callero MA, Suárez G V, Luzzani G, Itkin B, Nguyen B, Loaiza-perez AI. Aryl hydrocarbon receptor activation by aminoflavone : New molecular target for renal cancer treatment. *Int J Oncol* 2012;41:125–34. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1427>.
- [171] Su J, Lin P, Wang C, Chang H. Overexpression of Cytochrome P450 1B1 in Advanced Non-small Cell Lung Cancer : A Potential Therapeutic Target. *Anticancer Res* 2009;29:509–15.
- [172] Tamura S, Kato T, Berho M, Misiakos EP, O'Brien C, Reddy KR, et al. Impact of Histological Grade of Hepatocellular Carcinoma on the Outcome of Liver Transplantation. *Arch Surg* 2001;136:25–30. <https://doi.org/10.1001/archsurg.136.1.25>.
- [173] Klintmalm GB. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma A Registry Report of the Impact of Tumor Characteristics on Outcome. *Ann Surg* 1998;228:479–90.
- [174] Cieply B, Zeng G, Proverbs-Singh T, Geller DA, Monga SPS. Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in Beta-catenin gene. *Hepatology* 2009;49:821–31. <https://doi.org/10.1002/hep.22695.UNIQUE>.
- [175] Gong X-Y, Ma N, Xu HX, Chen F, Huang X-H, Wang Q. Prognostic significance of c - Met , β - catenin and FAK in patients with hepatocellular carcinoma following surgery. *Oncol Lett* 2018;15:3796–805. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7733>.
- [176] Han SI, Lim S-C. Expression and Prognostic Significance of CDK8 and β -Catenin in Hepatocellular Carcinoma. *In Vivo (Brooklyn)* 2020;34:1387–94.
- [177] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer Sergei. *Cell* 2011;140:883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025.Immunity>.
- [178] Zahorec R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts — rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl Lek Listy* 2001;102:5–14.
- [179] Silva TH, Orlando A, Schilithz C, Arantes W, Peres F, Murad LB. Neutrophil-lymphocyte ratio and nutritional status are clinically useful in predicting prognosis in colorectal cancer patients. *Nutr Cancer* 2019;72:1345–54. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1679198>.
- [180] Yamamoto M, Kurokawa Y, Kobayashi N, Takahashi T, Miyazaki Y, Tanaka K, et al. Prognostic Value of the Combined Index of Plasma Fibrinogen and the Neutrophil – Lymphocyte Ratio in Gastric Cancer. *World J Surg* 2019;44:207–12. <https://doi.org/10.1007/s00268-019-05193-7>.
- [181] Cho H, Hur HW, Kim SW, Kim SH, Kim JH, Kim YT, et al. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:15–23. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0516-3>.
- [182] Ramón-Rodríguez J, De-Armas-Conde N, Jaén-Torrejimenó I, Prada-Villaverde A, Rojas-Holguín A, López-Guerra D, et al. Prognostic value of pre-operative systemic immune-inflammation index and platelet to lymphocyte ratio in peritoneal carcinomatosis of ovarian origin. *Surg Oncol* 2022;42. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2022.101750>.
- [183] Wang Y, Peng C, Cheng Z, Wang X, Wu L, Li J, et al. The prognostic significance of preoperative neutrophil-lymphocyte ratio in patients with hepatocellular carcinoma receiving hepatectomy : A systematic review and meta-analysis. *Int J Surg* 2018;55:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2018.05.022>.
- [184] Schobert IT, Savic LJ, Chapiro J, Bousabarah K, Chen E, Laage-gaupp F, et al. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios as predictors of tumor response in hepatocellular carcinoma after DEB-TACE. *Eur Radiol J* 2020;30:5663–73. <https://doi.org/10.1007/s00330-020-06931-5.Neutrophil-to-lymphocyte>.
- [185] Chen Y, Yang Y, Zhang X, Fan Q, Li X, Xin Y-J, et al. Nomogram Based on Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio to Predict Recurrence in Patients with Hepatocellular Carcinoma after Radiofrequency Ablation. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2021;44:1551–60. <https://doi.org/10.1007/s00270-021-02872-8>.

- [186] Xu Z, Ye C, Liu L, Wu G, Zhao Z. The pretransplant neutrophil-lymphocyte ratio as a new prognostic predictor after liver transplantation for hepatocellular cancer : a systematic review and meta-analysis. *Biomark Med* 2018;12:188–99.
- [187] Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo : targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nature* 2014;13:63–79. <https://doi.org/10.1038/nrd4161>.
- [188] Yu F-X, Zhao B, Guan K-L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 2015;163:811–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.044>.Hippo.
- [189] Zhang S, Zhou D. Role of the transcriptional coactivators YAP / TAZ in liver cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2019;61:64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.006>.
- [190] Hagenbeek TJ, Webster JD, Kljavin NM, Chang MT, Pham T, Lee H, et al. The Hippo pathway effector TAZ induces TEAD-dependent liver inflammation and tumors. *Sci Signal* 2018;11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaj1757>.
- [191] Guo Y, Pan Q, Zhang J, Xu X, Liu X, Wang Q, et al. Functional and Clinical Evidence That TAZ is a Candidate Oncogene in Hepatocellular Carcinoma. *J Cell Biochem* 2015;116:2465–75. <https://doi.org/10.1002/jcb.25117>.
- [192] Xiao H, Jiang N, Zhou B, Liu Q, Du C. TAZ regulates cell proliferation and epithelial–mesenchymal transition of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2015;106:151–9. <https://doi.org/10.1111/cas.12587>.



9. ANEXOS



ANEXOS

9.1. ANEXO I. TABLA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS

Anticuerpo primario	Dilución	Casa comercial	Referencia	Anticuerpo secundario	Tiempo incubación
AhR	1:1000	Enzo	BML-SA210-0100	Conejo	<i>Overnight 14h</i>
β-Catenina	1:1000	BD Biosciences	610153	Ratón	<i>Overnight 14h</i>
YAP	1:1000	NOVUS	NB-110-58358	Conejo	<i>Overnight 14h</i>
TAZ	1:1000	NOVUS	NB-110-58359	Conejo	<i>Overnight 14h</i>

9.2. ANEXO II. TABLA DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Anticuerpo secundario	Dilución	Casa comercial	Referencia	Tiempo incubación
YRDye 800CW Goat anti-Rabbit	1:15000	LI-COR	926-32211	<i>45 minutos en oscuridad</i>
YRDye 680RD Goat anti-Mouse	1:10000	LI-COR	926-68070	<i>45 minutos en oscuridad</i>

