



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Evaluación Oncológica mediante Células Tumoraes
Circulantes, PET-TC Y AFP de Pacientes con
Hepatocarcinoma Sometidos a Trasplante Hepático**

D. David Ferreras Martínez

2021

Agradecimientos

Esta tesis es fruto del esforzado trabajo de muchos profesionales de diferentes ámbitos con un objetivo común que no es otro que el bien de todos. Mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo, los doctores Pablo Ramírez y Pedro Cascales, que supieron despertar en mí la inquietud por buscar respuestas allí donde se dan la mano el arte y la ciencia.

El camino que recorro como cirujano ha sido labrado por muchos que me preceden, verdaderos pioneros de la cirugía que hoy conocemos. Mi especial gratitud al Dr. Parrilla, mentor de generaciones, y al Dr. Sánchez Bueno.

He tenido el privilegio de compartir esta andanza con verdaderos amigos. Víctor, Pedro, Álvaro y Miquel: si estoy donde estoy y hago lo que hago, es por vosotros. Que la senda que nos unió vuelva a ser una.

A mi familia. Gracias por enseñarme lo más importante, lo más difícil de explicar en esta vida, el amor. Gracias a mis padres, a mi hermana, a Cris. Y todo mi agradecimiento y mi cariño a mis abuelos, a los que conocí, a los que no y a los que todavía disfruto; su vida, de trabajo digno y sacrificio, es mi mejor maestra.

“Cuatro cosas tiene el hombre

que no sirven en la mar:

ancla, gobernalle y remos,

y miedo de naufragar”

Antonio Machado

Resumen

Resumen

Introducción

El carcinoma hepatocelular (CHC) es una de las neoplasias malignas más prevalentes en todo el mundo. El trasplante de hígado (TOH) es la mejor opción terapéutica potencialmente curativa en pacientes cirróticos seleccionados (criterios de Milán). Sin embargo, la escasez de donantes alarga el tiempo en la lista de espera y promueve la progresión del tumor. Además, la tasa de recidiva después del TOH es alta, en torno al 10-20%. Hoy en día no existen marcadores eficientes de actividad biológica previa al TOH que puedan predecir la recaída. La determinación de células tumorales circulantes (CTC) en sangre periférica, podría desempeñar un papel importante.

El objetivo de este trabajo es determinar el número de CTC en pacientes con CHC incluidos en la lista de espera para TOH, estudiar su posible asociación con los niveles de alfafetoproteína (AFP), captación en el PET-TC y variables clínicas (invasión vascular, tamaño tumoral, tiempo en lista de espera, recidiva, etc) y comparar los niveles de CTC antes del TOH y durante los dos primeros años de seguimiento.

Pacientes y método

Se obtuvo sangre periférica de 30 pacientes incluidos en lista de espera para TOH y al cabo de 1 y 6 meses, y 1 y 2 años del TOH. La determinación de CTC se realizó a partir de sangre periférica por el método Isoflux, basado en anticuerpos inmunomagnéticos anti-EpCAM y posterior recuento por inmunofluorescencia. Análisis estadístico: se emplearon los test Rho Spearman, U de Mann-Whitney y test de Wicoxon cuando era apropiado (SPSS 22.0; Inc., Chicago, Ill, USA).

Resultados

Se incluyeron 30 pacientes con CHC dentro de los criterios de Milán. El 90% fueron varones, con una mediana de edad de 57 años. La mediana de seguimiento fue de 57 meses (RI: 45-62). Durante el seguimiento, 4 pacientes (13,3%) presentaron recidiva.

A todos los pacientes se les extrajo una muestra sanguínea para la determinación de CTC antes del TOH y en 24 de ellos (80%) se contabilizó al menos una CTC. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles preTOH y los niveles de CTC al año ($p=0,018$) y a los 2 años ($p=0,038$). Los niveles de CTC a lo largo del seguimiento en los pacientes con y sin recidiva fueron similares.

Los niveles pretrasplante de CTC se asociaron a un mayor tiempo en lista de espera ($p=0,002$), PET-TC positivo ($p=0,024$), mayor tamaño tumoral ($p=0,001$), mayor suma del diámetro de los tumores viables ($p=0,006$) y presencia de invasión microvascular ($p=0,033$).

En los pacientes con PET-TC positivo fue más frecuente la presencia de invasión microvascular (30% vs 0; $p=0,03$) y se asoció a mayores niveles de CTC pretrasplante ($p=0,028$) y mayor suma del diámetro de tumores viables ($p=0,034$).

Los pacientes con recidiva presentaron un SUVmax más elevado (5,2 vs 1,1; $p=0,013$), mayor tamaño tumoral (5 cm vs 2 cm, $p = 0,036$), mayor suma de los diámetros de los tumores viables (8,3 cm vs 2,8 cm; $p=0,031$), mayor frecuencia de invasión microvascular (50% vs 3,8%; $p = 0,039$), menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) (8 meses vs 59,5 meses, $p=0,003$) y menor supervivencia global (22 meses vs 59,5 meses; $p=0,017$). Además, se observó una tendencia descendente en los niveles de CTC.

La SLE fue menor en pacientes con SUVmáx $\geq 3,5$ ($p<0,001$) y niveles pretrasplante de CTC ≥ 9 ($p=0,040$).

Conclusiones

Los niveles de CTC disminuyen significativamente después del TOH. La concentración de CTC en sangre periférica y la captación en el PET-TC en pacientes con CHC sometidos a TOH está asociada con factores de mal pronóstico y a una menor SLE. La determinación de estos marcadores antes del TOH es útil para predecir la recidiva.

Abstract

Abstract

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most prevalent malignancies worldwide. Liver transplantation (LT) is the best potentially curative therapeutic option in selected cirrhotic patients (Milan criteria). Nevertheless, the shortage of organ donors lengthens the wait time and promotes tumor progression. What is more, the recurrence rate after LT is high, around 10 to 20%. Nowadays, there are not efficient markers of biological pretransplant activity that could predict early recurrence. In this context, the investigation of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood, also termed liquid biopsy, could play a major role.

The aim of this work is to determine the number of CTCs in patients with HCC awaiting for LT, to study its possible association with AFP levels, positivity of PET-CT and clinical variables (vascular invasion, tumor size, waiting list time, post-LT recurrence...) and to compare CTC levels before and after LT (one and six months and one and two years).

Patients and method

Peripheral blood was obtained from 30 patients on the waiting list for LT and after 1 month, 6 months and one and two years of the LT. CTCs immunomagnetic isolation was performed with anti-EpCAM antibodies by IsoFlux™ system. Statistical analysis: Rho Spearman test, Mann-Whitney U test and Wilcoxon test were used when appropriate (SPSS 22.0; Inc., Chicago, Ill, USA).

Results

A total of 30 patients with HCC within Milan criteria were included. Ninety percent were male, with a median age of 57 years. The median follow-up was 57 months (IQR: 45-62). During follow-up, 4 patients (13.3%) had a recurrence.

A blood sample was taken from all patients for the determination of CTCs before LT, and in 24 of them (80%) at least one CTC was counted. Statistically significant differences were found between the pre-LT levels and the CTC levels at one year ($p=0.018$) and at 2 years ($p=0.038$). Throughout follow-up, CTC levels were similar in patients with and without recurrence.

Pre-LT levels of CTC were associated with a prolonged waiting time on the list ($p=0.002$), positive PET-CT ($p=0.024$), larger tumor size ($p=0.001$), increase in the sum of the diameters of viable tumors ($p=0.006$) and presence of microvascular invasion ($p=0.033$). No significant correlation was found between pre-LT CTC levels and recurrence.

In patients with positive PET-CT, the presence of microvascular invasion was more frequent ($p=0.03$) and was associated with higher levels of pre-LT CTCs ($p=0.028$) and an increase in the sumsum of viable tumors diameter ($p=0.034$).

Patients with recurrence presented a higher SUVmax (5.2 vs 1.1; $p=0.013$), larger tumor size (5 cm vs 2 cm, $p=0.036$), and greater sum of the diameters of viable tumors (8, 3 cm vs 2.8 cm; $p = 0.031$), higher frequency of microvascular invasion (50% vs 3.8%; $p=0.039$), lower recurrence-free survival (8 months vs 59.5 months, $p = 0.003$) and lower overall survival (22 months vs 59.5 months; $p=0.017$). Also, a downward trend was observed in CTC levels.

The recurrence-free survival was lower in patients with SUVmax ≥ 3.5 ($p<0.001$) and pre-LT CTC levels ≥ 9 ($p=0.040$).

Conclusion

CTC levels decrease significantly after LT. CTC levels and PET-CT uptake in patients with HCC undergoing LT is associated with clinical and pathological factors of poor prognosis and lower recurrence-free survival. Therefore, the determination of these markers before transplantation is useful to predict recurrence.

AASLD, American Association for the study of Liver Diseases

AFP, alfafetoproteína

AJCC, American Joint Comitte on Cancer

BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer

CHC, carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma

CSC, circulating stem cells (células madre circulantes)

CTC, células tumorales circulantes

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group

EMT, transición epitelio-mesenquimal

EpCAM, molécula de adhesión de células epiteliales

QE, quimioembolización

LEQ, lista de espera quirúrgica

MELD, Model of End-Stage Liver Disease

TACE, transarterial chemoembolization (quimioembolización transarterial)

TC, tomografía computarizada

TOH, trasplante ortotópico hepático

VHB, virus de la hepatitis B

VHC, virus de la hepatitis C

Índice

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. HEPATOCARCINOMA.....	5
1.1.1. Epidemiología.....	5
1.1.2. Clínica.....	6
1.1.3. Diagnóstico.....	6
El papel del PET: estado actual del tema.....	9
Papel del PET en el CHC tratado mediante trasplante hepático.....	11
Marcadores tumorales.....	16
Alfafetoproteína (AFP).....	16
Otros biomarcadores.....	18
1.1.4. Diagnóstico precoz – cribado.....	18
1.1.5. Estadiaje y pronóstico.....	19
1.1.6. Tratamiento.....	26
1.1.6.1. Resección quirúrgica.....	26
1.1.6.2. Trasplante hepático.....	28
Resultados y factores pronósticos en el TOH.....	30
Modelos de predicción de recurrencia.....	34
Perspectivas de futuro.....	39
Seguimiento postrasplante.....	40
1.1.6.3. Otros tratamientos.....	41
Terapias locorregionales.....	41
Tratamiento sistémico.....	45
1.2. CARCINOGENÉISIS, PROCESO METASTÁSICO Y CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.....	47
1.2.1. Carcinogénesis.....	47
1.2.2. Cascada metastásica.....	48
1.2.3. ¿Qué son las células tumorales circulantes?.....	49
Ácidos nucleicos circulantes.....	52

1.2.3.1. Aplicaciones de las CTC	52
1.2.3.2. Métodos de detección de CTC	53
Técnicas basadas en propiedades físicas	57
Técnicas basadas en propiedades biológicas	58
Principales inconvenientes de la biopsia líquida en la actualidad	60
1.2.4. Papel de las CTC en el hepatocarcinoma	60
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
2.1. Justificación	67
2.2. Hipótesis	68
2.3. Objetivos	68
Objetivo principal	68
Objetivos específicos	68
3. MATERIAL Y MÉTODO	71
3.1. Diseño del estudio	73
3.2. Pacientes	73
3.2.1. Criterios de inclusión	73
3.2.2. Criterios de exclusión	74
3.2.3. Método de selección y seguimiento	74
3.3. Variables del estudio	74
Variables clínicas	74
Variables analíticas	75
Variables histológicas	75
3.4. Método	76
Determinación de CTC mediante el sistema Isoflux	76
Enriquecimiento de CTC	76
Aislamiento de CTC	76
Contaje de CTC	77

PET-TC	78
3.5. Análisis estadístico	79
4. RESULTADOS	81
4.1. Estudio descriptivo de las características de los pacientes y evolución clínica.	83
4.2. Correlación entre los niveles de CTC pretrasplante y variables demográficas, clínicas, radiológicas e histológicas.....	86
4.3. Correlación entre los niveles de AFP pretrasplante y variables demográficas, clínicas, radiológicas e histológicas.....	90
4.4. Evolución de los niveles de CTC y AFP.....	90
Evolución de los niveles de CTC	90
Patrones evolutivos de los niveles de CTC.....	92
Evolución de los niveles de AFP	95
4.5. Correlación entre la captación en el PET y variables demográficas, clínicas e histológicas.	96
4.6. Pacientes con recidiva.....	99
Evolución de los niveles de CTC y AFP en relación con la recidiva.....	101
Eficacia en la predicción de la recidiva.....	103
4.7. Análisis de supervivencia.....	105
Análisis de supervivencia en función del PET.....	108
Análisis de supervivencia en función de los niveles pretrasplante de CTC.....	114
Análisis de supervivencia en función de los niveles pretrasplante de AFP.....	117
Análisis de supervivencia en función de la combinación de los niveles pretrasplante de CTC y el resultado en el PET-TC.....	120
5. DISCUSIÓN.....	123
Características de los pacientes	125
Pacientes con recidiva.....	127
Papel del PET	131
Niveles de AFP y de CTC	136

AFP: niveles pretrasplante, evolución y correlación con otras variables.....	136
CTC: niveles pretrasplante, evolución y correlación con otras variables.....	137
Niveles pretrasplante de CTC.....	137
Evolución de las CTC.....	141
Patrones evolutivos.....	142
¿Estamos identificando la célula correcta?.....	143
Sistemas de detección de CTC en pacientes con CHC.....	144
Utilidad de las CTC.....	145
Fortalezas y debilidades del estudio	146
6. CONCLUSIONES	149
7. BIBLIOGRAFÍA.....	153

1. INTRODUCCIÓN

El hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (CHC) es la sexta neoplasia maligna más frecuente en el mundo y la segunda en términos de mortalidad. Este tumor a menudo se desarrolla en el contexto de una hepatopatía crónica (1,2) en cuyo caso el trasplante hepático es la mejor opción potencialmente curativa en pacientes seleccionados (criterios de Milán) (3) con una supervivencia global a 5 años inferior al 70% (4). Sin embargo, la escasez de donantes alarga el tiempo en lista de espera, promoviendo la progresión de la enfermedad. A su vez, la tasa de recurrencia postrasplante no es desdeñable: del 10 al 20% de los pacientes sufrirá recidiva tumoral al cabo del primer año. Esto mermará considerablemente su supervivencia al extenderse el tumor a otras localizaciones y disminuir la probabilidad de reintervención con intención curativa (5).

Se han descrito varios factores pronósticos asociados al fenómeno de recurrencia. Sin embargo, están basados en características macro y microscópicas tras el análisis anatomopatológico del hígado enfermo explantado. Estos factores pronósticos son fundamentalmente el tamaño y número de nódulos, el grado de diferenciación y la presencia de invasión microvascular. Actualmente no existen marcadores eficientes de la actividad tumoral pretrasplante que permitan predecir de forma precoz la recidiva de la enfermedad.

En este contexto, la determinación de células tumorales circulantes (CTC) en sangre periférica, también denominada biopsia líquida, podría desempeñar un papel importante. Estas células provienen de un tumor sólido primario o bien de un foco metastásico y son diseminadas por todo el organismo a través del torrente sanguíneo, lo que da pie al desarrollo de nuevos focos de enfermedad tumoral. Hoy en día están consideradas marcadores emergentes del proceso metastásico, proporcionando información en tiempo real sobre el estado oncológico de forma individualizada. Entre sus principales aplicaciones clínicas se encuentran el diagnóstico precoz de cáncer, la detección de recidiva o progresión de la enfermedad, la optimización del tratamiento y la monitorización de la respuesta al mismo. Precisamente, dos de las principales razones por las que fracasa el tratamiento frente a una enfermedad cancerígena son la incapacidad para monitorizar la evolución del tumor a lo largo del tiempo y adaptar el tratamiento de acuerdo a estos cambios y la dificultad para identificar la reaparición de la enfermedad precozmente.

Los niveles de CTC en pacientes con hepatocarcinoma han demostrado asociarse con la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, el tamaño tumoral, la presencia o no de invasión microvascular, los niveles de AFP, etc. Asimismo, se ha demostrado su

aplicabilidad como factor predictor de recurrencia tras la cirugía. Sin embargo, el peso de la evidencia científica recae sobre aquellos casos sometidos a cirugías resectivas curativas, y se desconoce el papel que juegan en pacientes trasplantados de hígado por hepatocarcinoma. En estos casos, debido a una completa exéresis del tumor (hígado explantado) y al implante de un nuevo injerto libre de enfermedad, la presencia de CTC extrahepáticas pretrasplante se ha postulado como la fuente de recurrencia y aparición de metástasis postrasplante.

El objetivo de este trabajo es estudiar la evolución de las CTC antes y después del trasplante hepático en pacientes diagnosticados de CHC dentro de los criterios de Milán, analizar su papel en la recaída de la enfermedad y determinar su posible asociación con la captación en el PET-TC, los niveles de AFP y los factores de mal pronóstico conocidos.

1.1. HEPATOCARCINOMA

El hepatocarcinoma es la neoplasia primaria del hígado más frecuente. Suele desarrollarse en pacientes que presentan una cirrosis hepática establecida y supone una de las principales causas de muerte en este grupo, lo que lo convierte en una de las neoplasias más letales y, por tanto, en un problema médico relevante. Esto ha impulsado el desarrollo de nuevas herramientas para lograr un diagnóstico precoz y tratarlo eficazmente en todas sus fases evolutivas.

1.1.1. Epidemiología

El CHC es el séptimo cáncer más frecuente a nivel mundial (quinto en varones y noveno en mujeres) y el segundo en términos de mortalidad, con aproximadamente 800.000 muertes al año. Las tasas de incidencia y mortalidad de los varones triplican a las de mujeres (15,3 vs 5,3% y 14,3 vs 5,1% respectivamente) (6,7). Suele aparecer a la edad media de 50-60 años (8). Su distribución a lo largo y ancho del globo terráqueo es heterogénea, siendo el Sudeste asiático y África subsahariana las regiones más afectadas (más de 15 casos/100.000 hab/año). Un dato preocupante es que la incidencia de CHC está aumentando a nivel mundial (9). Además, también se ha constatado un aumento en la tasa de mortalidad, a diferencia de otras neoplasias (10). Los países del sur de Europa, entre ellos España, pertenecen a las regiones de incidencia intermedia, entre 5-10 casos/100.000 hab/año (11).

La mayoría de casos se desarrollan en el seno de una hepatopatía crónica avanzada (cirrosis) (12) y se han identificado varios factores de riesgo importantes para el desarrollo de CHC. Estos incluyen la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), la infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), la hemocromatosis hereditaria y la cirrosis de casi cualquier causa (13). En un análisis de 770.000 casos de CHC en todo el mundo en 2012, más del 50% de los casos se atribuyeron al VHB y el 20% a la infección por VHC (14). En España, el principal factor de riesgo asociado a la aparición de CHC es el VHC (11,15). El riesgo de desarrollar CHC es menor del 1% anual en pacientes con hepatitis crónica sin fibrosis significativa y aumenta a un 3-7% anual cuando se establece la cirrosis, debido a la inflamación crónica durante el proceso de necrosis-regeneración (16). Otros factores que se han asociado con un riesgo incrementado de desarrollar CHC son el tabaco, la diabetes mellitus, el déficit de alfa-1-antitripsina, la esteatosis hepática no alcohólica y la aflatoxina. En España, la disponibilidad en la actualidad

de un tratamiento eficaz contra el VHC es posible que conduzca a cambios en la incidencia de CHC en los próximos años. Las guías españolas (17) recomiendan la vacunación universal contra el VHB (reduce la incidencia de CHC) y el tratamiento antivírico en pacientes con hepatitis vírica crónica (previene la evolución a cirrosis y, por tanto, la aparición de CHC). Además, una vez establecida la lesión hepática oncogénica, la eliminación del agente etiológico disminuye (pero no elimina) el riesgo de aparición de CHC.

1.1.2. Clínica

El CHC es un tumor que a menudo crece de forma silente y requiere la realización de varias pruebas de imagen para su diagnóstico. La ausencia de signos o síntomas específicos durante el curso clínico conlleva que muchos pacientes sean diagnosticados en una fase avanzada en la que no existe un tratamiento curativo. La mediana de supervivencia desde el diagnóstico es de 6 a 20 meses (18–20).

La mayoría de los pacientes no presentan síntomas más allá de los propios de la cirrosis. La aparición de ascitis, encefalopatía, ictericia o hemorragia digestiva, es decir, la descompensación de una cirrosis que hasta entonces se mantenía estable, puede sugerir la presencia de CHC. Los síntomas descritos en la literatura son inespecíficos: astenia, anorexia, pérdida de peso, dolor abdominal, ictericia (por invasión del árbol biliar), dolor óseo (por metástasis), fiebre (por necrosis tumoral), hemorragia intraabdominal (por rotura tumoral) o la (rarísima) presencia de un absceso hepático piógeno (18).

1.1.3. Diagnóstico

En nuestro entorno, más del 80% de los CHC se desarrollan en el seno de una cirrosis y en estos pacientes la presencia de CHC es una de las principales causas de muerte (21). En un paciente cirrótico el hallazgo de un nódulo hepático (especialmente si es mayor de 1 cm) debe considerarse sospechoso de CHC y estudiarse (Figura 1) (22).

El análisis de laboratorio es inespecífico y muchos pacientes mostrarán alteraciones propias de la cirrosis: trombocitopenia, hipoalbuminemia, hiperbilirrubinemia, hiponatremia, hipopotasemia, alargamiento del tiempo de protrombina, etc.

El CHC recibe principalmente flujo sanguíneo arterial (a diferencia del parénquima hepático, que también recibe flujo portal), lo que condiciona un patrón de captación de contraste específico en las pruebas de imagen que consiste en hipervascularización en fase arterial seguida de lavado precoz en fase venosa portal. De acuerdo a estos criterios, es posible establecer el diagnóstico no invasivo de CHC como todo nódulo mayor de 1 cm que presenta dicho patrón vascular en una prueba de imagen dinámica (resonancia magnética – RM – o tomografía computerizada – TC – con contraste) sobre un hígado cirrótico (19,22). Si el nódulo no presenta un patrón vascular típico, se debería confirmar histológicamente mediante punción-biopsia, que no siempre es factible en estos pacientes (ascitis, alteraciones de la coagulación, etc). En los nódulos menores de 1 cm se recomienda observación con ecografías seriadas cada 3 o 4 meses (23).

Las pruebas de imagen más empleadas en el diagnóstico de CHC son ecografía, TC, RM y angiografía, siendo la primera de ellas la técnica de elección en el estudio de cribado. La TC y la RM aportan más información y permite establecer el diagnóstico con una sensibilidad y especificidad elevadas (24). La angiografía ocupa hoy en día la segunda línea como técnica diagnóstica, empleándose fundamentalmente en el tratamiento (quimiembolización).

En el momento del diagnóstico, tan solo el 5-15% de los pacientes presentan diseminación extrahepática y es más común en aquellos tumores de mayor tamaño (> 5 cm) o con presencia de invasión vascular extensa. La recurrencia extrahepática tras terapias locorregionales tampoco es habitual (5-24%). CHC metastatiza preferentemente en el pulmón, seguido de ganglios linfáticos locorregionales, hueso y glándula suprarrenal (25–27).

Según el documento de consenso de las sociedades españolas AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH (17), los nódulos < 1 cm detectados mediante ecografía de cribado deben ser seguidos mediante una ecografía cada 3-6 meses. Si tras 2 años no se detecta crecimiento, se debe volver al cribado habitual cada 6 meses. Por otro lado, los nódulos > 1 cm detectados mediante ecografía en pacientes cirróticos pueden ser diagnosticados de CHC sin necesidad de obtener una confirmación histológica si presentan una captación de contraste en fase arterial seguido de lavado en fases venosas en una técnica de imagen (TC y RM dinámicas). Si el patrón vascular no es específico de CHC se recomienda una punción diagnóstica del nódulo. En este caso, si el análisis patológico es negativo, no se puede descartar el diagnóstico de CHC y se debe valorar la realización de una nueva punción diagnóstica o seguimiento estrecho de la

lesión. En el caso de pacientes sin cirrosis establecida, la aplicación de estos criterios de imagen no es válida y es necesaria la realización de una punción para obtener el diagnóstico.

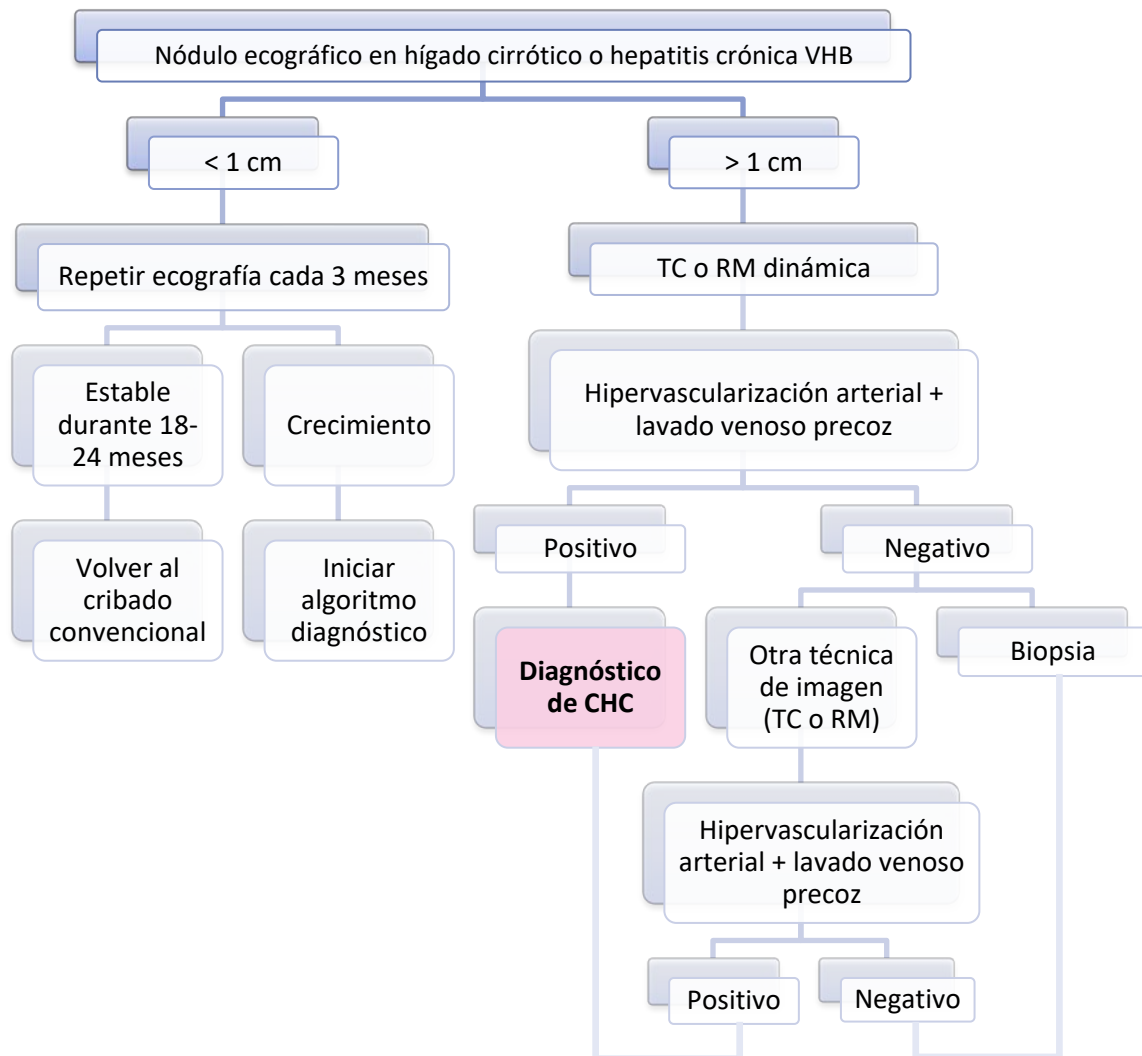


Figura 1. Algoritmo diagnóstico propuesto para el estudio de un nódulo hepático. Adaptado de Bruix et al (19).

El papel del PET: estado actual del tema

El uso de la tomografía por emisión de positrones (de sus siglas en inglés, PET) en las enfermedades oncológicas se ha vuelto algo habitual en la última década. Se trata de una técnica no invasiva que aporta información sobre el grado de actividad biológica (o metabólica) de un tumor y que permite por tanto determinar su agresividad, su extensión (metástasis) y su reaparición (recidiva) durante el seguimiento, además de monitorizar la respuesta a diferentes líneas de tratamiento oncológico. El uso del PET en el CHC también ha cobrado interés y la información que proporciona podría cambiar en algunos escenarios las indicaciones o el manejo de los pacientes con CHC que son candidatos a TOH.

El PET se basa en la captación anómala por las células tumorales (que suelen presentar un consumo superior de glucosa) de un radiofármaco (habitualmente fluorodesoxiglucosa, ^{18}F FDG). En el hígado, la positividad del PET se determina examinando si la captación de FDG en el tumor es significativamente mayor que en el parénquima hepático circundante. Esta captación se manifiesta habitualmente mediante el “índice de captación estándar máximo” o SUVmax (Standard Uptake Value). Los valores de SUVmax de las lesiones se calculan delimitando un área de interés donde la captación de FDG es mayor. Otros parámetros empleados con frecuencia son el ratio entre el SUVmax en el tumor y el SUVmax en el parénquima hepático sano ($T_{\text{max}}/L_{\text{max}}$) y el ratio entre el SUVmax tumoral y el SUVmedio del hígado ($T_{\text{max}}/L_{\text{mean}}$) (28–33). Varios trabajos han coincidido en señalar un ratio $T_{\text{max}}/L_{\text{max}}$ superior a 1,15 como punto de corte predictor de SLE (28,34).

El papel del PET en el diagnóstico de CHC permanece sin aclarar, siendo sus principales aplicaciones como herramienta para monitorizar la respuesta al tratamiento, predecir el pronóstico y rastrear la enfermedad metastásica (35–38). En la Figura 2 se muestra la imagen mediante TC de un CHC y su captación en el PET.

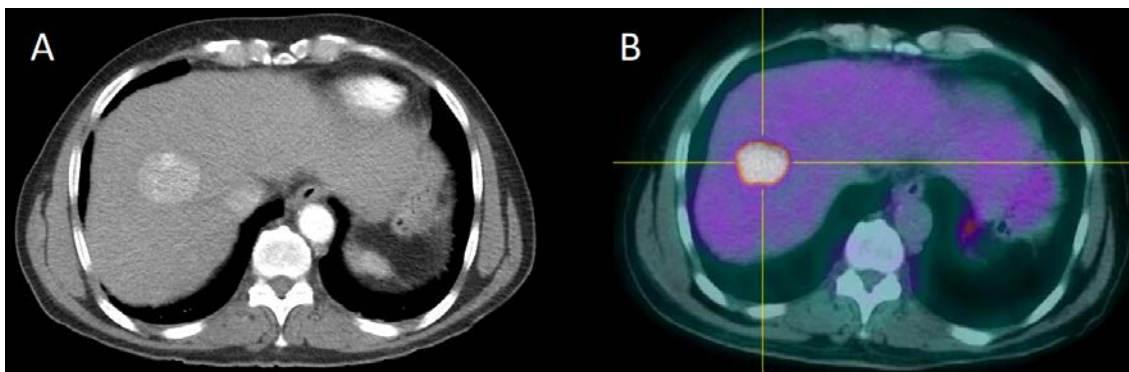


Figura 2. LOE hepática hipercaptante en fase arterial compatible con CHC (A) que muestra una captación patológica en el PET-TC (B).

El 18F-FDG PET posee una sensibilidad del 50-70% en la detección de CHC (39,40). El consumo de 18F-FDG por las células tumorales depende de varios mecanismos enzimáticos: transporte de glucosa (GLUT 1), fosforilación por una hexokinasa (HK II) y defosforilación de FDG-6-P a FDG (glucosa-6-fosfatasa). En los CHC bien diferenciados, el comportamiento del tejido tumoral no difiere significativamente del parénquima hepático circundante; sin embargo, en los CHC pobremente diferenciados existe un mayor acúmulo del trazador debido a una menor actividad de la glucosa-6-fosfatasa. En base a esto, Okazumi et al (41) propusieron una clasificación del CHC de acuerdo a tres patrones de captación en el 18F-FDG PET (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de Okazumi: tipos de CHC según su captación en el PET.

Tipo CHC	Diferenciación	Actividad enzimática	Captación del trazador
Okazumi tipo 1	Poco diferenciado	HK II ↑, glucosa-6-fosfatasa ↓	Mayor que hígado sano
Okazumi tipo 2	Diferenciado	Normal	Igual que hígado sano
Okazumi tipo 3	Diferenciado	Glucosa-6-fosfatasa ↑	Menor que hígado sano

Los tipos 2 y 3 de la clasificación anterior representarían cerca del 45% de los falsos negativos en los PET realizados a pacientes con CHC. Sin embargo, esta relación hoy en día parece ser más compleja. Jo et al (42), en un trabajo reciente, evidenciaron que solo aproximadamente el 30% de los pacientes con un PET positivo desarrollaron posteriormente metástasis. En el resto de pacientes, la positividad del PET la atribuyeron a un aumento de la expresión de GLUT 1 en respuesta a un microambiente tumoral carente de glucosa pero que no necesariamente se relacionaría con una mayor agresividad tumoral. De este modo, el potencial de una neoplasia para metastatizar se vería influenciado por el microambiente tumoral en el que evoluciona. Las condiciones de hipoxia, déficit de glucosa y disminución de las señales de proliferación propiciarían el desarrollo de fenotipos invasivos (transición epitelio-mesénquimal) que no siempre captan en el PET.

En un intento por incrementar la sensibilidad del PET en la diagnóstico del CHC, también se ha recurrido a otros trazadores como 11C-acetato o 18F-colina (43,44). El primero de ellos tiene la desventaja de presentar una baja afinidad por los CHC poco diferenciados y los focos metastásicos. También se ha propuesto su uso combinado con 18F-FDG. El 18F-colina ha demostrado ser efectivo en la detección de CHC subcentimétricos y más sensible que 18F-FDG para detectar CHC bien diferenciados. Sin embargo, la hiperplasia nodular focal y algunas lesiones inflamatorias hepáticas también muestran captación con este trazador, lo que merma su especificidad. En pacientes con CHC sometidos a TOH, varios estudios han señalado que, si bien el 11C-acetato tiene una tasa de detección de lesiones bien diferenciadas más alta y su uso combinado con 18F-FDG aumenta la sensibilidad y especificidad, el 18F-FDG sigue siendo más útil para evaluar tumores poco diferenciados (39,45).

Papel del PET en el CHC tratado mediante trasplante hepático

Los criterios de selección de pacientes con CHC para TOH se encuentran en constante evolución. A los factores conocidos (tamaño, invasión vascular o grado de diferenciación,) se les han sumado en las dos últimas décadas nuevos criterios biológicos (biomarcadores) y morfológicos (basados en pruebas de imagen como el PET-TC), en un intento de mejorar la precisión a la hora de predecir la recidiva.

En pacientes con CHC, varios estudios han descrito la relación entre los hallazgos en el PET y algunos de los factores pronósticos conocidos como la invasión microvascular, el grado de diferenciación tumoral, el tamaño y número de nódulos o la respuesta a TACE o RFA (46–49).

Algunos trabajos también han mostrado una asociación consistente entre los hallazgos en el PET-TC y SLE y SG, hallando altas tasas de recidiva después del trasplante en pacientes con tumores hipercaptantes (28,29,34,50–54).

Por tanto, existe una amplia evidencia de que el PET aporta información útil para predecir el pronóstico postrasplante, con el añadido de permitir estudiar la actividad biológica tumoral más allá de los criterios morfológicos clásicos.

Los principales trabajos que abordan la utilidad del PET-TC en el manejo del CHC susceptible de TOH se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Estudios realizados sobre el valor pronóstico del (18) FDG-PET/TC en CHC con TOH.

Trabajo	Número pacientes	Parámetros PET	Valor de corte	Hallazgos
Yang et al (50), 2006	38	Análisis visual (+/-)	NA	PET negativo se asocia a mayor SLE.
Kornberg et al (51), 2009	42	Análisis visual (+/-)	NA	PET positivo, mayor recurrencia y menor SLE y predictor de invasión microvascular.
Lee et al (28), 2009	59	Tmax/Lmax	1,15	Tmax/Lmax factor independiente predictor de SLE.
Kornberg et al (52), 2012	91	Análisis visual (+/-)	NA	PET positivo es factor pronóstico independiente de SLE y predictor de exclusión de la LEQ.
Lee et al (53), 2013	191	Análisis visual (+/-)	NA	PET factor pronóstico para SLE y recurrencia precoz.
Cho et al (55), 2014	457	Análisis visual (+/-)	NA	PET mejora el estadiaje y la detección de metástasis.
Detry et al (34), 2015	27	Tmax/Lmax	1,15	Tmax/Lmax factor independiente predictor de SLE.
Lee et al (56), 2015	280	Análisis visual (+/-)	NA	PET-TC factor pronóstico en pacientes fuera de los criterios de Milán.

Hong et al (31), 2016	123	TLR	1,1	AFP + PET predicen mejor la SLE que los criterios de Milán.
Hsu et al (30), 2016	147	SUV y TLR	4,8 y 2	PET en combinación con criterios UCSF predice riesgo recidiva.
Lee et al (29), 2016	280	Análisis visual (+/-)	NA	Tamaño tumoral + PET predicen SLE y SG.
Hyun et al (57), 2016	317	TLR	2	TLR > 2, peor SG.
Castilla-Lièvre et al (43), 2016	33	Análisis visual (+/-)	NA	18F-FDG-PET negativo y 11C-colina-PET positivo se asoció con menor tasa de recidiva.
Kobayashi et al (58), 2016	60	Análisis visual (+/-)	NA	PET+ se relaciona con invasión vascular y recurrencia postTOH.
Boussouar et al (32), 2016	28	Tmax/Lmax	1,15	Tmax/Lmax se correlaciona con AFP, tamaño tumoral y pobre diferenciación tumoral.
Kim et al (59), 2016	110	TLR	1,16	Ratio TLR >1,16 factor predictor de recidiva.
Bailly et al (60), 2016	34	Análisis visual (+/-) y Tmax/Lmax	1,15	Tmax/Lmax > 1,15 predictor de invasión microvascular y grado de diferenciación.
Kornberg et al (54), 2017	116	Análisis visual (+/-)	NA	Combinación de criterios Up-to-seven y PET predice SLE.

Takada et al (61), 2017	182	Análisis visual (+/-)	NA	PET positivo factor de riesgo independiente para SLE.
Ye et al (62), 2017	103	Análisis visual (+/-)	NA	La SLE en pacientes fuera de criterios de Milán y PET negativo, fue comparable a la de pacientes dentro de criterios de Milán.
Lin et al (33), 2017	65	SUVmax y Tmax/Lmax	NA	Ratio TSUVmax/LSUVmax predictor de invasión vascular.
Refaat et al (63), 2018	100	SUVmax y Tmax/Lmax	1,21	Tmax/Lmax > 1,21 predictor de progresión tras terapia puente y correlación con AFP.
Ling et al (64), 2019	258	TLR	2	TLR ≥ 2 predictor de histología desfavorable.
Kang et al (48), 2019	239	TBRmax	2,8	AFP, tamaño y número de tumores y TBRmax, factores independientes de recidiva.
Ding et al (65), 2020	93	Análisis visual, SUVmax, TLR y otros	NA	Diferentes parámetros del PET son factores pronósticos.

AFP, alfafetoproteína; CHC, carcinoma hepatocelular; FDG, fluorodesoxiglucosa; PET, tomografía por emisión de positrones; SUV; Standardized uptake value; TLR, ratio de captación tumor - hígado (tumor-to-non-tumor liver uptake ratio); Tmax/Lmax, ratio de la máxima captación de FDG en el tumor y en parénquima hepático sano; TBRmax, tumor-to-blood pool ratio; UCSF, University of California San Francisco.

Otro aspecto interesante es la relación entre el PET y los pacientes con CHC avanzado (fuera de los criterios de Milán). Varios estudios han publicado resultados satisfactorios en términos de SLE en pacientes con CHC fuera de los criterios de Milán y con un PET negativo. Esto podría ayudar en la toma de decisiones a la hora de incluir a pacientes con CHC fuera de los criterios de Milán en lista de espera para TOH, indicando el procedimiento en aquellos casos en los que el PET es negativo (52). Por otra parte, en pacientes con tumores avanzados, el PET puede ser útil a la hora de establecer la respuesta a los tratamientos administrados, como TACE, sorafenib y radioembolización (66–68).

Marcadores tumorales

Alfafetoproteína (AFP)

El marcador tumoral más empleado en CHC es la alfafetoproteína (AFP). Se trata de una glucoproteína de síntesis hepática durante la gestación. En el individuo adulto sano, se consideran normales niveles de AFP menores de 20 ng/ml. Su concentración sérica se eleva a menudo en pacientes con CHC, aunque no se ha establecido una correlación clara entre los niveles de AFP y otros aspectos histomorfológicos del tumor, como el tamaño, la presencia de invasión vascular y un bajo grado de diferenciación. Además, hasta el 40% de los CHC pueden asociarse con niveles normales de AFP (especialmente en los estadios iniciales) (69). Únicamente en pacientes con alto riesgo, unos niveles muy elevados de AFP (>400 ng/ml) pueden sugerir la presencia de CHC (70). Por otro lado, la AFP también se puede elevar en otros procesos hepáticos (agresión y/o regeneración) como la resección hepática, hepatopatía crónica en ausencia de CHC y en las hepatitis víricas; así como en otras circunstancias no relacionadas con el hígado, como el embarazo y algunos tumores gonadales. Por tanto, su rendimiento diagnóstico es bajo (22,71).

Lo anteriormente expuesto convierte a la AFP en una regular herramienta de despistaje, con una sensibilidad de 39 - 64%, especificidad de 76 - 91% y valor predictivo positivo de 9 - 33% (72) y las guías actuales no recomiendan su inclusión en los programas de cribado.

Del mismo modo que en el diagnóstico de CHC la AFP ocupa un lugar marginal, numerosos trabajos señalan hoy en día su utilidad como marcador pronóstico (especialmente en aquellos

pacientes candidatos a TOH) y los niveles de AFP se incluyen en la mayoría de algoritmos que tratan de predecir el riesgo de recurrencia. Aún así, a pesar de que su uso se ha aceptado de forma generalizada, no existe consenso en cuanto a los valores a emplear como punto de corte que permitan estratificar el riesgo de recidiva, existiendo en la literatura más de 25 trabajos en los que se establecen puntos de corte en un rango de 100 a 1.000 ng/ml. La mayoría de estos trabajos concuerdan en que unos niveles inferiores a 15 ng/ml se asocian a un pronóstico excelente mientras que los pacientes con concentraciones de AFP superiores a 1.000 ng/ml deberían excluirse del TOH. En cuanto al punto de corte, se han sugerido valores entre 100 y 400, siendo esta última la cifra más extendida (72). En otro enfoque interesante, varios grupos han realizado determinaciones seriadas de los niveles de AFP, concluyendo que un incremento mensual superior a 15 - 50 ng/ml o 0,1 ng/ml al día es un factor de riesgo de recidiva y se asocia con una menor supervivencia (73–76).

En definitiva, la AFP es un elemento clave en el manejo de pacientes con CHC que son candidatos a TOH. Aunque no es útil en el diagnóstico de CHC, la AFP puede ser de gran ayuda a la hora de predecir la agresividad del tumor y el riesgo de recurrencia postrasplante. En este ámbito, su principal aplicación es su capacidad para estratificar a los mejores candidatos a TOH y, en combinación con otros parámetros (tamaño y número de tumores, histopatología, PET), es un excelente criterio de selección que permite, de forma razonable, ampliar los clásicos criterios de Milán. De este modo, incluir el límite de 1.000 ng/ml en los criterios de selección permitiría la exclusión de los pacientes que sí cumplen los criterios de Milán pero que tienen un alto riesgo de recurrencia (y por tanto no se beneficiarán del TOH). También se ha demostrado que los pacientes fuera de los criterios de Milán (pero dentro de Up-to-7 o UCSF) y con AFP < 100 ng/ml tienen un bajo riesgo de recurrencia (77,78).

Además, la AFP puede ser útil en la monitorización de la evolución del tumor mientras el paciente se encuentra en lista de espera, especialmente para evaluar la respuesta a terapias puente (*downstaging*) y para el seguimiento postrasplante. Los retos del futuro pasan por implementar el uso de la AFP en las guías internacionales como herramienta de selección y dilucidar los valores exactos que deben considerarse como puntos de corte para la estratificación de los pacientes en función del riesgo de recidiva.

Otros biomarcadores

Las herramientas diagnósticas más novedosas son las basadas en técnicas de biología molecular, auspiciadas por un mejor conocimiento de las vías moleculares que determinan la aparición de CHC. La determinación mediante inmunohistoquímica de estos biomarcadores emergentes sin embargo no ha logrado desbancar a las técnicas diagnósticas habituales (79,80). Esto es debido a que los CHC, al igual que la mayoría de neoplasias, presentan una alta heterogeneidad tanto desde el punto de vista genotípico como fenotípico y hallar un biomarcador altamente sensible y específico se vuelve una tarea harto complicada. Algunos de estos marcadores en boga son las metaloproteasas de matriz (MMP), el glipicano-3 (GPC3), la osteopontina (OPN), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la interleucina-8 (IL-8). Su papel en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del CHC se encuentra actualmente en estudio.

1.1.4. Diagnóstico precoz – cribado

En oncología, los programas de *screening* o cribado tienen como fin reducir la mortalidad asociada a una neoplasia. En nuestro entorno, más del 80% de los CHC se desarrollan en el seno de una cirrosis y en estos pacientes la presencia de esta neoplasia es una de las principales causas de muerte (21). En 1999, Zhang et al (81) demostraron que aplicar un programa de cribado en pacientes cirróticos mejoraba la supervivencia, siendo la realización de ecografías seriadas preferible al cribado combinado con determinación de AFP, que no demostró ser eficiente. Hoy en día, se recomienda con un grado alto de consenso la inclusión en programas de cribado a todo paciente con cirrosis establecida (independientemente de su etiología) que potencialmente pueda ser tratado en caso de detectarse CHC. En base a la evidencia científica disponible hasta la fecha, se preconiza un intervalo de 6 meses entre exploraciones ya que acortarlo a cada 3 meses únicamente aumenta los costes y espaciarlo a cada año disminuye la supervivencia (82,83).

Con una sensibilidad entre el 60 y 80% y una especificidad superior al 90% (84), una buena relación coste-eficacia y su “no invasividad”, la ecografía (en manos de personal experto) es la técnica de elección para el cribado de CHC. Con respecto al uso de test serológicos, a pesar de disponer de varios marcadores tumorales (principalmente AFP), no se aconseja su empleo como herramienta de cribado por su baja eficacia (85).

Las guías españolas recomiendan en su documento de consenso (17) que los pacientes afectados de cirrosis hepática deben ser considerados para participar en programas de cribado, siendo la técnica más adecuada la ecografía abdominal, que debe realizarse cada 6 meses, independientemente del riesgo de desarrollar CHC.

1.1.5. Estadiaje y pronóstico

En estos pacientes, el grado de alteración de la función hepática influye en las opciones terapéuticas disponibles y la supervivencia más allá del estadiaje tumoral, de modo que será necesario valorar no solo la extensión de la neoplasia sino la función hepática y la presencia de síntomas relacionados con el tumor.

Para evaluar el grado de disfunción hepática, los sistemas más empleados son la clasificación Child-Pugh (Tabla 3) y la escala MELD (Tabla 4) (86) mientras que para valorar la reserva funcional del paciente oncológico las escalas más empleadas son el índice Karnofsky (Tabla 5) (87) la clasificación *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status* (Tabla 6) (88), útiles para evaluar la capacidad del paciente para tolerar diferentes tratamientos (quimioterapia, cirugía, etc) y determinar el pronóstico a corto plazo.

Tabla 3. Clasificación Child-Pugh.

Parámetro	Puntos asignados		
	1	2	3
Bilirrubina total* (mg/dL)	< 2	2 - 3	> 3
Albúmina sérica (g/L)	> 3,5	2,8 – 3,5	> 2,8
Tiempo de protrombina (INR)	< 1,8	1,8 – 2,3	> 2,3
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada – Severa (refractaria)
Encefalopatía hepática	Ausente	Grado I - II	Grado III - IV
*En la colangitis biliar primaria y la colangitis esclerosante primaria, el límite superior para asignar 1 punto es 4 y para 2 puntos, 10.			
Interpretación			
Puntos	Clase	Supervivencia 1 año	Supervivencia 2 años
5 – 6	A	100%	85%
7 – 9	B	81%	57%
10 - 15	C	45%	35%

Tabla 4. Sistema de puntuación MELD.

MELD = 3,78 [Ln Bilirrubina (mg/dL)] + 11,2 [Ln INR] + 9,57 [Ln Creatinina (mg/dL)] + 6,43	
Si los pacientes han sido sometidos a diálisis al menos 2 veces en la última semana, se usará "4" como valor de creatinina.	
Cualquier valor menor a 1 se sustituirá por 1.	
Valor	Mortalidad a los 3 meses
≥ 40	71,3 - 100%
30 – 39	52,6 – 74,5%
20 – 29	19,6 – 45,5%
10 – 19	6 - 20%
≤ 9	1,9 – 3,7%

Tabla 5. Índice Karnofsky (IK) (87).

Categorías generales	Grado	Descripción
Capaz de realizar actividades normales, no requiere cuidados especiales	100	Actividad normal. Sin evidencia de enfermedad.
	90	Actividad normal. Signos y síntomas leves de enfermedad.
	80	Actividad normal. Algunos signos y síntomas de enfermedad.
Incapaz de trabajar, puede vivir en casa y autocuidarse con ayuda variable	70	Cuida de sí mismo pero es incapaz de llevar a cabo una actividad o trabajo normal.
	60	Necesita ayuda ocasional de otros pero es capaz de cuidar de sí mismo en la mayor parte de sus necesidades.
	50	Requiere ayuda considerable de otro y cuidados especiales frecuentes.
Incapaz de autocuidarse. Requiere cuidados especiales, susceptible de hospitalización. Probable avance rápido de la enfermedad.	40	Incapacitado. Requiere cuidados especiales.
	30	Severamente incapacitado. Indicación de hospitalización aunque no hay indicios de muerte inminente.
	20	Gravemente enfermo. Necesita asistencia activa de soporte.
	10	Moribundo.
	0	Fallecido.

Tabla 6. Clasificación ECOG (88).

Grado	Equivalencia IK	Descripción
0	IK 100 – 90%	Paciente totalmente asintomático y capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.
1	IK 80 – 70%	Paciente con síntomas que le impiden realizar trabajos arduos, aunque se desempeña normalmente en sus actividades cotidianas y en trabajos ligeros. El paciente solo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.
2	IK 60 – 50%	Paciente incapaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.
3	IK 40 – 30%	Paciente encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria como, por ejemplo, vestirse.
4	IK 20 – 10%	Paciente encamado el 100% del día y que necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria como, por ejemplo, la higiene corporal, la movilización en la cama e incluso la alimentación.
5	IK 0%	Paciente fallecido.

Hoy en día, el sistema más empleado en el manejo del CHC es el sistema Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC) (89), que ha sido validado en múltiples estudios (90). El sistema BCLC tiene en cuenta el estadio del tumor, el grado de disfunción hepática y la presencia de síntomas y es el único que relaciona el pronóstico predicho con la opción terapéutica recomendada (Figura 3). Según este sistema, con los tratamientos curativos (resección, TOH y ablación, aplicables en el 40% de los CHC) se estima una supervivencia a 5 años del 50-70%; con los tratamientos paliativos (quimioembolización y sorafenib, aplicables en el 30% de los CHC), la mediana de supervivencia se sitúa en 20 meses para la quimioembolización y 11 meses para sorafenib y, por último, el 30% restante (estadio terminal) solo optan a tratamiento sintomático, con una mediana de supervivencia de 3 meses y una supervivencia estimada al año del 10% (91).

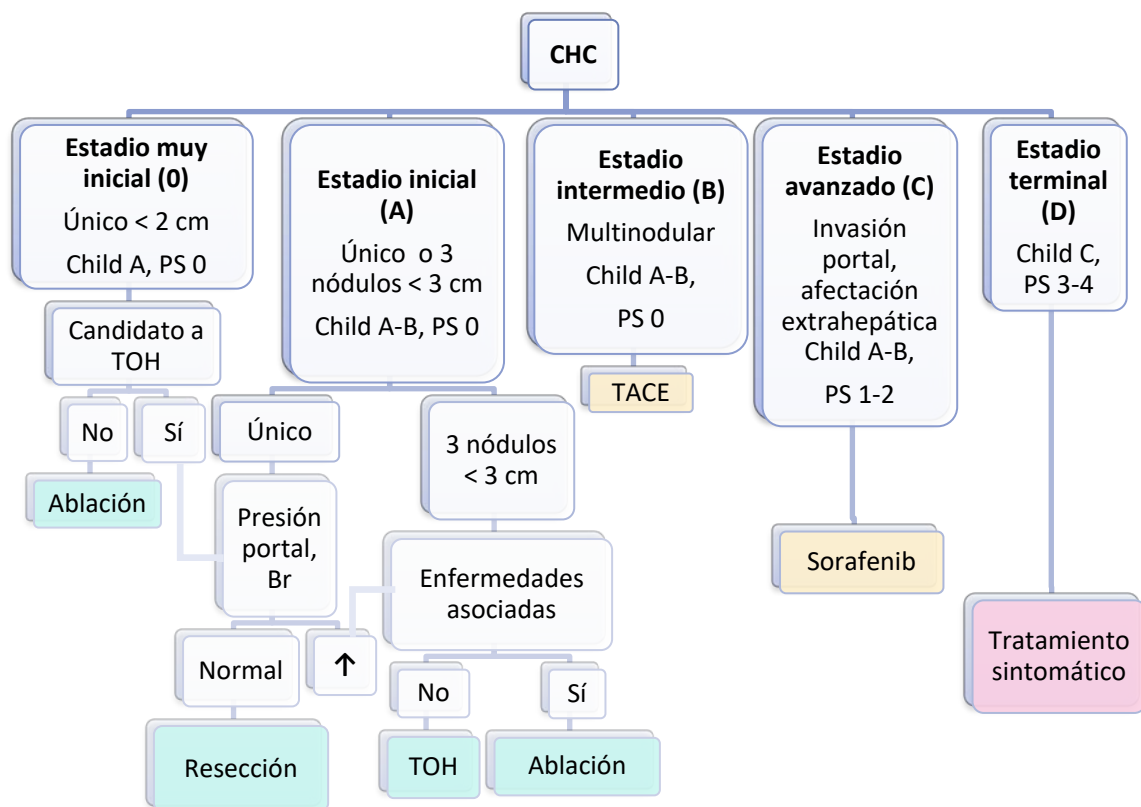


Figura 3. Algoritmo de manejo de CHC según el *Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)*. PS, *performance status*; TOH, trasplante ortotópico de hígado; Br, bilirrubina; TACE, *transarterial chemoembolization*. Adaptado de Bruix et al (91).

Otro sistema empleado (especialmente en Estados Unidos) es la clasificación TNM (Tabla 7), propuesta por el *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* y la *Union for International Cancer Control (UICC)* (92). Es un sistema similar al empleado en otras neoplasias, donde “T” representa el tamaño tumoral, “N” la presencia o no de infiltración de ganglios linfáticos adyacentes y “M” la presencia o no de enfermedad metastásica. Al no tener en cuenta la función hepática no es un buen predictor de supervivencia (93).

Tabla 7. Clasificación TNM del hepatocarcinoma (adaptado de *AJCC Cancer Staging Manual*) (92).

Estadio	TNM	Características
IA	T1a	Tumor único ≤ 2 cm (T1a).
	N0	Sin metástasis ganglionares (N0) o a distancia (M0).
	M0	
IB	T1b	Tumor único > 2 cm sin infiltración vascular (T1b).
	N0	Sin metástasis ganglionares (N0) o a distancia (M0).
	M0	
II	T2	Tumor único > 2cm y con infiltración vascular o múltiples tumores, ninguno > 5 cm (T2).
	N0	Sin metástasis ganglionares (N0) o a distancia (M0).
	M0	
IIIA	T3	Múltiples tumores con al menos uno > 5 cm (T3).
	N0	Sin metástasis ganglionares (N0) o a distancia (M0).
	M0	
IIIB	T4	Al menos un tumor (de cualquier tamaño) que infiltra una rama venosa principal (vena hepática o vena porta) o invasión de órganos adyacentes distintos de la vesícula biliar o perforación del peritoneo visceral (T4).
	N0	Sin metástasis ganglionares (N0) o a distancia (M0).
	M0	
IVA	Cualquier T	Un solo tumor o muchos tumores de cualquier tamaño (Cualquier T) que se ha diseminado a los ganglios linfáticos adyacentes (N1), pero no a distancia (M0).
	N1	
	M0	
IVB	Cualquier T	Un solo tumor o muchos de cualquier tamaño (cualquier T).
	Cualquier N	Puede o no haberse diseminado a los ganglios linfáticos adyacentes (cualquier N).
	M1	Presencia de metástasis (M1).

1.1.6. Tratamiento

Gracias a la aplicación de programas de cribado y el manejo multidisciplinar centralizado por equipos con dilatada experiencia, el CHC ha pasado de tener un pronóstico ominoso (su diagnóstico tardío en fases avanzadas intratables hacía que se considerase como un episodio terminal en la cirrosis) a disponer de tratamientos potencialmente curativos como la resección quirúrgica y el trasplante hepático.

Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes no son candidatos a estas dos opciones debido a la extensión del tumor, la disfunción hepática subyacente y la escasez de órganos para trasplante. Esto ha llevado al desarrollo de otros tratamientos, como la ablación tumoral local, la quimioembolización hepática y la combinación con otras técnicas en diferentes estrategias terapéuticas.

1.1.6.1. Resección quirúrgica

La resección quirúrgica es la primera opción terapéutica en tumores únicos en ausencia de cirrosis, algo infrecuente en nuestro medio. A pesar de un enfoque quirúrgico agresivo, la enfermedad suele encontrarse demasiado extendida para considerar esta opción terapéutica. Se estima que solo del 10 al 30% de los pacientes diagnosticados de CHC serán candidatos a una resección quirúrgica (94). A su vez, de estos pacientes con tumores considerados “resecables”, tan solo en la mitad de los casos realmente podrá llevarse a cabo la cirugía (95).

En pacientes que presentan una cirrosis compensada se recomienda individualizar en cada caso tras una evaluación pormenorizada de la función hepática de modo que la supervivencia no sea inferior a la esperada con otros tratamientos potencialmente curativos como el TOH o la ablación. El candidato ideal sería el que presenta un único tumor con bilirrubinemia normal y sin hipertensión portal clínicamente relevante (gradiente de presión de vena suprahepática inferior a 10 mmHg, ausencia de ascitis y ausencia de varices esofágicas) (96). Si existen hiperbilirrubinemia o signos de hipertensión portal, el paciente sería tributario de TOH y en caso de que este no sea factible, ablación. En cuanto al tamaño tumoral, no existe un punto de corte definido siempre y cuando la masa esté bien delimitada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que a mayor tamaño, más posibilidades de que fenómenos como la invasión vascular o la satelitosis estén presentes, lo que aumenta el riesgo de recidiva, siendo en estos casos la resección quirúrgica menos atractiva que otras alternativas terapéuticas como el TOH (97).

El tipo de resección dependerá de la localización tumoral y del grado de cirrosis, pudiendo realizar resecciones anatómicas (según los segmentos de Couinaud) o menos agresivas en tumores menores de 1,5 cm (en los que el potencial de invasión microvascular es muy bajo) con el fin de minimizar la pérdida de parénquima hepático en pacientes cirróticos (98). Mientras que en pacientes con hígados sanos se pueden reseccionar hasta dos tercios del parénquima hepático, en pacientes cirróticos se recomienda no extender la resección más allá del 25% del parénquima funcional. Hay que tener presente que la insuficiencia hepática tras la resección es la principal causa de muerte en el posoperatorio inmediato (99,100). En este contexto, el estudio preoperatorio del hígado remanente (en términos de volumen y grado de funcionalidad) mediante la realización de una volumetría hepática es altamente recomendable, sobre todo si se va a realizar una embolización portal como paso previo a la resección con el fin de hipertrofiar el hígado sano (101,102). Esta técnica ha demostrado ser eficaz y segura a la hora de inducir la hipertrofia del parénquima sano y prevenir la aparición de insuficiencia hepática tras la resección (103). El empleo de esta técnica en combinación con la TACE también parece ser una opción válida, logrando tasas más elevadas de necrosis tumoral y de supervivencia libre de enfermedad, aunque la evidencia disponible en la actualidad es baja (104). Con el fin de optimizar la eficacia de la resección quirúrgica se recomienda disponer de ecografía intraoperatoria que permita detectar nódulos de 0,5 a 1 cm.

A pesar de una selección cuidadosa de los pacientes que pueden optar a la resección quirúrgica y de los buenos resultados obtenidos en términos de supervivencia, la tasa de recidiva de la enfermedad es muy alta, pudiendo llegar al 70% a los 5 años (105), motivo por el que se han realizado estudios con múltiples tratamientos adyuvantes. Sin embargo, ninguno ha demostrado ser eficaz en la prevención de la recidiva (106).

1.1.6.2. Trasplante hepático

El TOH es el tratamiento de elección en aquellos pacientes que no son susceptibles de una resección hepática, siempre y cuando cumplan los criterios de Milán (tumor único < 5 cm o con un máximo de 3 nódulos menores de 3 cm, sin invasión vascular ni diseminación extrahepática) y no presenten comorbilidades que contraindiquen la intervención (18).

El hecho de lograr la resección completa del tumor maligno al mismo tiempo que se reemplaza el hígado cirrótico (en el que podrían aparecer nuevas lesiones), lo convierten en una opción atractiva. Inicialmente, la experiencia fue decepcionante: las tasas de mortalidad a 90 días eran inaceptables, la recidiva tumoral era la norma (presente hasta en un 80% de los pacientes) y las tasas de supervivencia a largo plazo estaban muy por debajo de los pacientes trasplantados por enfermedad no maligna (107,108). Sin embargo, los avances en las últimas décadas en diferentes campos (inmunosupresión, preservación de órganos, técnica quirúrgica, etc), la publicación de buenos resultados en múltiples estudios y la constatación de que el hallazgo incidental de pequeños CHC en hígados explantados no afectaba negativamente a la supervivencia de pacientes sometidos a trasplante de hígado por otras afecciones en comparación con pacientes cuyo hígado explantado no presentaba la neoplasia (109) aupó al TOH a las primeras posiciones del escalafón terapéutico. De hecho, hoy en día el CHC es la principal indicación de TOH en Estados Unidos (110).

El punto de inflexión vino de la mano de Mazzaferro et al (111) cuando, en 1996, demostró que el TOH era una opción válida cuando se seleccionaba a los pacientes de acuerdo a unos criterios, con resultados similares en términos de supervivencia a los pacientes trasplantados por cirrosis sin CHC. Hoy en día, se aplican en todo el mundo y son conocidos como los criterios de Milán (tumor único < 5 cm o con un máximo de 3 nódulos menores de 3 cm, sin invasión vascular ni diseminación extrahepática) (111). Los criterios de Milán han sido criticados por su carácter restrictivo, que excluye a pacientes que podrían ser candidatos al TOH. Esto ha dado pie a la propuesta de criterios más laxos. Los más populares son los de la UCSF (*University of California San Francisco*) (112) y los *Up-to-seven* (5). Los criterios de la UCSF incluyen 1 lesión ≤ 6,5 cm y 2-3 lesiones ≤ 4,5 cm cada una con un diámetro tumoral total ≤ 8 cm. En los criterios *Up-to-seven*, la suma del número de nódulos tumorales y del diámetro en centímetros del nódulo tumoral de mayor tamaño es ≤ 7. Aunque es posible que los criterios de Milán puedan ampliarse, aún no existe suficiente evidencia científica para establecer nuevos límites.

El principal escollo en el TOH es la escasez de donantes, que favorece la progresión de la enfermedad tumoral durante el período en lista de espera (pudiendo incluso contraindicar el trasplante). De hecho, entre un 10 y 20% de los pacientes con CHC son excluidos de la lista de espera mientras aguardan por un órgano debido a la progresión tumoral (113,114). Para atenuar este problema se han adoptado varias estrategias:

- **Aumentar el número (*pool*) de donantes** mediante la donación en asistolia (115–117), el empleo de donantes añosos (118–120) y el uso de donante vivo (121). Todas ellas estrategias con resultados similares al uso de donantes convencionales.
- **Sistema de priorización.** Con la idea de priorizar a aquellos pacientes con altas probabilidades de progresión tumoral se propuso modificar la escala MELD otorgando puntos adicionales a estos pacientes y así equilibrar el riesgo de exclusión/muerte en lista de espera respecto al resto de candidatos a trasplante. Sin embargo este sistema está sujeto a la disparidad geográfica y la probabilidad de exclusión de la lista es difícilmente equiparable entre distintas regiones. Por tanto, no existe una estrategia de priorización óptima hoy en día (122,123).
- **Tratamiento locorregional preoperatorio (terapia puente).** A pesar de la falta de datos de ensayos clínicos controlados, existe un amplio consenso en el uso de la terapia puente para los pacientes con CHC y un tiempo estimado de espera para trasplante de al menos seis meses (124–126). Además, existe un beneficio oncológico: se han descrito mejores resultados postrasplante en aquellos pacientes con una respuesta tumoral local importante (respuesta patológica completa o al menos 60% de necrosis tumoral) tras la terapia puente (127,128). Algunos de los tratamientos más extendidos son la ablación por radiofrecuencia (asistida o no por laparoscopia) y la quimioembolización o TACE (de sus siglas en inglés, *transarterial chemoembolization*). El papel de la terapia puente en pacientes que cumplen los criterios de Milán en los que se estima un tiempo de espera corto es incierto y se ha sugerido no emplearla en este contexto (129).
- **Tratamiento sistémico preoperatorio.** Recientemente se ha sugerido el empleo de sorafenib como terapia puente al trasplante (130). Sin embargo es necesaria una base científica más sólida para esclarecer el papel de este fármaco como tratamiento adyuvante en el trasplante (131).

Resultados y factores pronósticos en el TOH

Actualmente la supervivencia de los pacientes que se someten a TOH por CHC dentro de los criterios de Milán es equiparable a la de los que se trasplantan por otro motivo, con tasas de SG del 75-85% y de SLE de 80-90% a 5 años (132–134).

A pesar del uso de criterios morfológicos que permiten seleccionar cuidadosamente a pacientes candidatos a TOH (criterios de Milán), un 10-20% de los pacientes sufren una recaída tumoral postrasplante, lo que se asocia con un peor pronóstico (111,135,136). En estos casos, la supervivencia tras la recaída oscila entre los 7 y 16 meses (136,137). Aproximadamente el 75% de las recidivas tienen lugar durante los primeros dos años postrasplante y solo el 10% aparecen más allá del cuarto año (136). La mayoría de autores consideran recidiva *precoz* a la que tiene lugar durante el primer año tras el TOH y estaría relacionada o bien con un fracaso en la estadificación pretrasplante o bien con la presencia de células tumorales circulantes en el torrente sanguíneo. Por otra parte, cabe esperar que la recaída tardía tenga únicamente relación con la presencia de células tumorales que han permanecido latentes aguardando condiciones propicias para su proliferación (138).

En estos pacientes, de base inmunodeprimidos por el TOH, la recidiva se considera una enfermedad sistémica: solo en el 30% de los casos se limita al injerto hepático, siendo lo más frecuente (> 50%) la afectación de varios órganos, fundamentalmente pulmón, hígado, hueso, ganglios linfáticos y glándula suprarrenal (136,139).

Se han identificado varios factores de riesgo para recurrencia posTOH y se pueden agrupar de acuerdo a las características del tumor, del paciente y del tratamiento (Tabla 8).

Tabla 8. Factores que se asocian a un mayor riesgo de recurrencia postrasplante. Adaptado de Filgueira (140).

Factores relacionados con el tumor
<ul style="list-style-type: none">– Estadiaje tumoral– Invasión microvascular– Grado de diferenciación– AFP– Ratio neutrófilos/linfocitos– PET positivo
Factores relacionados con el paciente
<ul style="list-style-type: none">– Obesidad– Etiología vírica de la cirrosis– Tratamiento anti-VHC
Relacionados con el tratamiento
<ul style="list-style-type: none">– Biopsia percutánea– Tiempo en lista de espera– Terapias puente– Edad del donante– Tiempo de isquemia– Técnica quirúrgica– Inmunosupresión– Sorafenib adyuvante

Factores relacionados con el tumor

Los factores pronósticos más importantes descritos son: tamaño y número de tumores, ubicación del tumor (especialmente la distribución bilobar), presencia de adenopatías, grado histológico de diferenciación, presencia de invasión macrovascular y microvascular, niveles de AFP y presencia de diseminación extrahepática (109,111,132). De todas ellas, la asociación más consistente es con el tamaño tumoral: un metaanálisis de 2011 mostró que el riesgo de recidiva era proporcional al diámetro del tumor más grande, sin asociación con el número de nódulos (141). Posteriormente, en 2018, otro estudio multicéntrico corroboró estos resultados y evidenció un incremento del riesgo de recaída por cada centímetro adicional en el diámetro del tumor más grande, sin asociarse con el número de nódulos (142).

Otro importante factor pronóstico es la invasión microvascular. Se define como la presencia de émbolos tumorales dentro de la luz vascular (portal o suprahepática), no detectable por técnicas radiológicas y que por tanto solo se puede determinar en el hígado explantado. Constituye el predictor más fiable de recurrencia tumoral; cuando se encuentra presente, el riesgo de recurrencia y de muerte se dobla o incluso se triplica (5,143).

Factores relacionados con el paciente

La etiología de la enfermedad hepática también podría suponer un factor pronóstico. Hoy en día se sabe que los pacientes con CHC en el seno de una hepatopatía por VHC son más propensos a ser candidatos a trasplante en lugar de a una resección respecto a los pacientes con CHC y VHB. Esto es debido a que los pacientes con VHC suelen presentar tumores más avanzados y una función hepática más deteriorada, asociando tasas de recurrencia más altas y supervivencias más cortas (144). De hecho, una crítica al estudio original de Mazzaferro en el que estableció los criterios de Milán es que se limitó fundamentalmente a pacientes con VHC, siendo este considerado hoy en día un factor predictor independiente de peor supervivencia. La reciente introducción de nuevos antivirales frente al VHC podría alterar los resultados del TOH en estos pacientes (145). Por otro lado, la reactivación de una hepatitis por VHB (especialmente si está presente la mutación en el gen promotor BCP) se ha asociado con la recaída tumoral y una menor supervivencia (146)

La obesidad se ha asociado a una mayor tasa de recidiva y de invasión microvascular y por tanto a una menor supervivencia. Varios trabajos han sugerido que la obesidad conduce a un

estado pro-oncogénico que podría estimular la angiogénesis tumoral, la proliferación y la invasión (aumento de leptina y sobreexpresión de VEGF) (147,148).

Algunos autores han sugerido recientemente que la esteatohepatitis no alcohólica (*non-alcoholic steatohepatitis* o NASH) podría asociarse a CHC menos agresivos con menores tasas de recurrencia, aunque se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis (149,150).

Factores relacionados con el tratamiento

La asociación entre las terapias puente y la tasa de recidiva es controvertida. Un estudio multicéntrico de 2017 (151) no encontró diferencias entre los pacientes que recibían terapias puente y los que no en términos de riesgo de recidiva y supervivencia libre de enfermedad y una revisión de 2018 corroboró estos hallazgos (152). Por el contrario, otro trabajo de 2018 encontró una reducción del riesgo de recidiva en pacientes sometidos a TACE cuando se ajustaba por tamaño inicial de la lesión (mayor beneficio en tumores de al menos 4 cm) (142).

También se ha establecido una asociación entre el tiempo en lista de espera y la tasa de recurrencia. De este modo, tanto un intervalo de tiempo corto (< 6 meses) como largo (> 18 meses) se asocia a un mayor riesgo de recurrencia postrasplante (153).

La inmunosupresión, empleada para reducir el riesgo de rechazo del injerto, se asocia con un mayor riesgo de recidiva tumoral (154). En una revisión retrospectiva de 70 pacientes sometidos a TOH por CHC que recibieron inmunosupresión basada en ciclosporina se evidenció que los niveles séricos de este fármaco eran significativamente más elevados en aquellos pacientes que sufrieron recidiva en comparación con aquellos que permanecieron sanos (155).

Otros inmunosupresores, como sirolimus (inhibidor de la vía del *mammalian target of rapamycin* o mTOR) parecen asociarse con menores tasas de recidiva y mortalidad relacionada con la recidiva (156). Sin embargo, la evidencia científica proviene de estudios retrospectivos y no existe hasta la fecha una recomendación consensuada sobre su uso.

Se ha sugerido que la quimioterapia adyuvante (tras el trasplante) podría ser beneficiosa. Esto se fundamenta en que la manipulación del hígado a explantar puede dar lugar a una diseminación intraoperatoria de células tumorales al torrente sanguíneo y que la inmunosupresión puede facilitar el crecimiento tumoral, lo que explicaría por qué las recidivas postrasplante tienden a ocurrir más rápidamente después del trasplante que después de la

resección (157). Se han realizado varios ensayos clínicos con diferentes agentes quimioterápicos y resultados dispares (158–160), de modo que no existen recomendaciones consensuadas al respecto. Por otra parte, el papel del sorafenib como tratamiento adyuvante permanece sin aclarar (131). Siegel et al (161), en un estudio con 14 pacientes fuera de los criterios de Milán a los que se administró sorafenib después del trasplante, describió una tasa de recurrencia del 28,6% después de una mediana de seguimiento de 2,6 años. En definitiva, la evidencia actual no justifica el uso rutinario de tratamientos adyuvantes después del TOH por CHC fuera de un ensayo clínico controlado.

Modelo pronóstico para la predicción de la supervivencia después de la recurrencia postrasplante

En 2015, en un trabajo en el que colaboraron varios grupos europeos y americanos, se desarrolló un modelo pronóstico de supervivencia tras el diagnóstico de recidiva que se basa en la presencia de tres signos de mal pronóstico: la recidiva durante el primer año, AFP > 100ng/ml en el momento de la recaída y que el tumor no sea tratable con intención curativa. La supervivencia a 5 años de los pacientes con recidiva en ausencia de estos criterios se acerca al 50% (162). Este modelo permite identificar a aquellos pacientes con mejor pronóstico tras sufrir una recidiva y ofrecerles tratamientos más agresivos (cirugía, radiofrecuencia, etc). Este trabajo ha sido posteriormente validado por un estudio multicéntrico (163).

Modelos de predicción de recurrencia

Los criterios de Milán se basan en la morfología tumoral preoperatoria en base a las pruebas de imagen y no se correlacionan bien con el estudio histológico del hígado explantado ni predicen con exactitud el riesgo de recurrencia postrasplante al no tener en cuenta variables objetivas sobre la biología tumoral (164,165). De este modo, es posible que pacientes con tumores pequeños pero agresivos y con un riesgo alto de recidiva sean candidatos a TOH mientras que otros pacientes con tumores fuera de los criterios de Milán pero baja agresividad no puedan optar por este tratamiento (5,112). Esto explicaría por qué actualmente la tasa de recidiva postrasplante sigue siendo elevada. Por todo ello, muchos grupos consideran hoy en día demasiado restrictivos los criterios de Milán y en los últimos años se han propuesto nuevos algoritmos que permitan predecir con mayor fiabilidad el riesgo de recurrencia y optimizar la selección de pacientes candidatos a TOH. Estos modelos tienen en cuenta nuevas variables que

no se incluían en los criterios de Milán pero sí se relacionan con el riesgo de recurrencia y pronóstico.

RETREAT score

Recientemente, en un trabajo de la Universidad de California en San Francisco (UCSF) se ha propuesto el *Risk Estimation of Tumor Recurrence After Transplant (RETREAT) score* usando datos de 721 pacientes dentro de los criterios de Milán trasplantados entre 2002 y 2012 en tres centros (Tabla 9). El modelo fue validado en una cohorte de 341 pacientes que también cumplían los criterios de Milán y que fueron trasplantados en un cuarto centro durante el mismo período de tiempo (166). El sistema se basa en tres variables (que previamente se asociaron de forma independiente con la recurrencia de la enfermedad): invasión microvascular, nivel sérico de AFP en el momento del trasplante y la suma del diámetro del tumor viable más grande de todos los tumores viables en el hígado explantado y el número de tumores viables en el hígado explantado. Se elaboró un sistema de puntuación con el fin de predecir el riesgo de recurrencia a un año y cinco años asignando puntuaciones de 0 a 3 para los niveles de AFP y tamaño tumoral y 2 puntos adicionales si hay invasión microvascular, con rango de puntos totales posibles entre 0 y 8. El resultado fue una estratificación del riesgo de recurrencia a cinco años desde menos del 3% si la puntuación es 0 a más del 75% si la puntuación es igual o superior a 5. Según los trabajos más recientes, este modelo podría ser una herramienta predictora de recurrencia superior a los criterios de Milán (167).

Tabla 9. Modelo de predicción de recurrencia RETREAT *score*.

Variable	Puntos RETREAT*
AFP (ng/ml)	
0-20	0
21-99	1
100-999	2
≥ 1.000	3
Invasión microvascular	2
Diámetro del mayor tumor viable + número de tumores viables**	
0	0
1,1-4,9	1
5,0-9,9	2
≥ 10	3

*Una puntuación global de 0 correspondería a un paciente con niveles de AFP entre 0 y 20 en el momento del TOH en ausencia de invasión macrovascular y tumores viables en el hígado explantado. ** Ejemplo: si en el hígado explantado se hallan 3 nódulos, de los que 2 son viables y miden 4 y 3 cm respectivamente y un tercero se encuentra completamente necrótico y mide 5 cm, la puntuación en este apartado sería la suma de 4 (cm del mayor tumor viable) + 2 (número de tumores viables) y se correspondería con un *score* de “2”.

MORAL score

Otro novedoso modelo propuesto para predecir la recurrencia tumoral postrasplante se trata del *Model of Recurrence After Liver transplant* (MORAL). Inicialmente la fórmula se basó en los niveles de AFP, el ratio neutrófilos/linfocitos y el tamaño tumoral (168) y posteriormente, otro grupo modificó y simplificó la fórmula empleando únicamente los niveles de AFP y otro marcador biológico conocido como *protein induced by vitamin K absence-II* (PIVKA-II) (169). La puntuación en el MORAL se definió como la suma de 11 veces la raíz cuadrada de los niveles de PIVKA-II y 2 veces la raíz cuadrada de los niveles de AFP. En ambos grupos, un MORAL score bajo ($\leq 314,8$) se asoció con una supervivencia libre de recidiva y global significativamente mayor (169). Sin embargo este modelo aún está pendiente de ser validado en futuros estudios en otros centros.

AFP model

Según una reciente revisión que analizó los modelos pronósticos de recurrencia postrasplante (incluyendo 18 trabajos, entre los que se encuentran los citados anteriormente), el modelo basado en la determinación de AFP, propuesto en 2012 por Duvoux et al (170) es actualmente el que goza de mayor validez y permite estratificar en grupos de alto y bajo riesgo de recurrencia a 5 años mejor que los criterios de Milán (171). Además de los niveles de AFP, este modelo tiene en cuenta el tamaño tumoral (diámetro mayor) y el número de nódulos. Si la puntuación final es mayor de 2, el paciente presentará un riesgo alto de recurrencia a 5 años postrasplante, mientras que si es igual o menor de 2, el riesgo será bajo (Tabla 10). Este modelo ha sido validado en otros trabajos posteriores y ha demostrado ser exitoso a la hora de seleccionar pacientes fuera de los criterios de Milán que lograrán resultados similares a los pacientes dentro de los criterios de Milán (165,172,173).

Tabla 10. AFP model.

Variable	Puntos AFP model
Diámetro mayor del tumor (cm)	
≤ 3	0
3 - 6	1
> 6	4
Número de nódulos	
1 - 3	0
≥ 4	2
AFP (ng/ml)	
≤ 100	0
100-999	2
≥ 1.000	3

Otros algoritmos pronósticos

Otros grupos han propuesto sus propios modelos en los que se tienen en cuenta diferentes criterios (tamaño tumoral, número de nódulos, diámetro tumoral total, volumen tumoral, etc) en combinación con distintos puntos de corte para los niveles de AFP (174,175). Quizá el más novedoso sea el trabajo de un grupo coreano, que combina los niveles de AFP con los hallazgos en el PET y concluye que los pacientes con PET positivo y AFP > 200 ng/ml presentan un alto riesgo de recurrencia postTOH y no deberían ser candidatos a este tratamiento (31).

A pesar de algunas discrepancias, estos estudios comparten muchos puntos en común: coinciden en que un valor de AFP > 1000 ng/ml debería llevar a la exclusión de estos pacientes de recibir un TOH; sugieren una asociación entre AFP y características morfológicas (tamaño y volumen tumoral y número de nódulos); y algunos incluso proponen la combinación con otros marcadores de agresividad, como los hallazgos histopatológicos (grado de diferenciación e invasión vascular) o el PET.

Perspectivas de futuro

Criterios ampliados de trasplante

El empleo de unos criterios más laxos que permitan incluir a más pacientes como candidatos a trasplante ha suscitado gran interés. Algunos grupos, como el de la Universidad de California, San Francisco (UCSF) (112), han publicado buenos resultados utilizando criterios de elegibilidad expandidos (nódulo único de hasta 6,5 cm o hasta 3 nódulos siempre y cuando ninguno sea mayor de 4,5 cm y la suma de sus diámetros sea menor o igual a 8 cm), comparables a los de los pacientes que cumplían los criterios de Milán y los autores concluyeron que los criterios de Milán eran demasiado estrictos y podrían estar excluyendo a algunos pacientes que podrían beneficiarse del trasplante en comparación con otros tratamientos paliativos, no potencialmente curativos (176). Otros centros de referencia también han publicado buenos resultados empleando criterios expandidos, mejorando significativamente la supervivencia de pacientes que, según los criterios clásicos, serían únicamente candidatos a tratamiento paliativo (5,177–182). Sin embargo, los criterios de Milán siguen siendo el punto de referencia para la selección de pacientes con CHC para trasplante y no existe un consenso internacional sobre el empleo de otros criterios de inclusión.

Downstaging

Además de su uso como "terapia puente" para reducir el número de abandonos de la lista de trasplante debido a la progresión tumoral, las terapias locorregionales neoadyuvantes (TACE, ablación por radiofrecuencia, etc) también se han empleado para infraestadiar (*downstaging*) a pacientes con CHC inicialmente más avanzados de modo que al ser reevaluados cumplan los criterios para trasplante. En este escenario, se han descrito tasas de supervivencia similares a las obtenidas con pacientes que inicialmente sí cumplían los criterios de Milán (183–186). Una revisión sistemática que incluía 13 estudios (n = 950) estimó un porcentaje de éxito del 48% (IC 95%, 39-58%). Por otra parte, en el análisis por subgrupos incluyendo solo estudios prospectivos (12 estudios, n = 320), se estableció una tasa de recurrencia postrasplante elevada: 16% (IC 95%, 11-23%) (187). Otra revisión sistemática (8 estudios, n = 720) estableció tasas de éxito desde el 24 al 69% y tasas de supervivencia a 1, 3 y 5 años de 82-100%, 79-100% y 54,6-94% respectivamente (188). Sin embargo, no existe hoy en día un acuerdo mayoritario con respecto al tratamiento de elección en el *downstaging* (ni tan

quiera en la definición de *downstaging* en sí misma), los criterios de selección, los criterios de imagen para definir la extensión tumoral y la forma en que todo esto debería afectar a la priorización en la lista de espera. De hecho, ni siquiera se han identificado los factores predictores de un tratamiento exitoso (189). Todo ello hace que aún no se hayan establecido recomendaciones respecto a su uso.

En resumen y con la evidencia científica disponible a día de hoy, se recomienda no expandir los criterios de selección de trasplante hepático, a no ser que se lleve a cabo en el contexto de un ensayo clínico o en un área con gran escasez de donantes (125). Una de las principales críticas que se ha hecho a la expansión de criterios es que propiciará el aumento de pacientes en lista de espera en detrimento de aquellos pacientes con supervivencias teóricas excelentes postrasplante (que se dejarían de trasplantar). Por otra parte, algunos análisis de coste-eficacia también desaconsejan esta estrategia (190).

Nuevos biomarcadores pronósticos

Al igual que en otras neoplasias, existe un gran interés en conocer mejor las vías moleculares que determinan el desarrollo de CHC y su recurrencia tras el tratamiento y así establecer nuevos marcadores basados en técnicas de biología molecular (191–193). En este contexto, el estudio de células tumorales circulantes y su determinación y caracterización en sangre periférica (biopsia líquida) podría aportar valiosa información al conocimiento del comportamiento biológico del carcinoma, diseñar estrategias terapéuticas efectivas en cada caso y monitorizar la respuesta a los tratamientos(194).

Seguimiento postrasplante

No existe un consenso sobre el intervalo de tiempo con el que deben realizarse las revisiones después del trasplante ni sobre las técnicas de imagen y serológicas a emplear. Se recomienda la tomografía computarizada con contraste o la resonancia magnética y determinaciones de AFP cada 6 a 12 meses (124). Algunos grupos han sugerido adoptar una estrategia de vigilancia de acuerdo al riesgo individual de recurrencia postrasplante. En este sentido, modelos de estratificación de riesgo como *RETREAT score* o *Moral score* podrían ser útiles una vez que hayan sido validados en estudios prospectivos (167,168).

Las guías españolas (17) recomiendan el trasplante hepático como una opción eficaz para pacientes que presenten un CHC que cumplan los criterios de Milán; el trasplante hepático de donante vivo es una opción válida si el tiempo de espera es lo suficientemente largo para considerar que pueda existir riesgo de exclusión por progresión tumoral. No se puede realizar ninguna recomendación respecto a la expansión de los criterios de inclusión más allá de los criterios convencionales de Milán y el tratamiento locorregional preoperatorio puede considerarse cuando el tiempo de espera previsto es mayor de 6 meses.

1.1.6.3. Otros tratamientos

Existe un amplio abanico terapéutico para aquellos pacientes con CHC sin afectación extrahepática y que no son candidatos a la resección hepática o al TOH. Podemos distinguir entre tratamientos locorregionales (ablación por radiofrecuencia, microondas, quimioembolización, radioembolización, etc) y tratamientos sistémicos. La elección del tratamiento está determinada por el grado de disfunción hepática, el tamaño y distribución de los tumores, el patrón vascular y la reserva funcional del paciente. Generalmente se prefiere optar por tratamientos locorregionales frente a los sistémicos. Sin embargo, no existe una técnica de elección y esta dependerá de las preferencias de cada equipo multidisciplinar en base a los recursos disponibles.

Terapias locorregionales

Ablación por radiofrecuencia (RFA)

La RFA es la técnica más usada en pacientes que no cumplen criterios de reseccabilidad pero que sí son candidatos a terapias locorregionales (CHC < 5 cm sin afectación extrahepática) (195). También ha demostrado ser una opción válida en el tratamiento de CHC recidivados tras una hepatectomía (196). Consiste en aplicar localmente energía térmica mediante un electrodo que genera una corriente alterna de radiofrecuencia al tejido circundante. El movimiento iónico da como resultado un calentamiento por fricción del tejido. Cuando la temperatura supera los 60°C, se produce la necrosis de los tejidos adyacentes al electrodo en un área de hasta 3 cm (197). La efectividad de la técnica se evalúa posteriormente mediante

una prueba de imagen (TC o RM) en la que se constata o no la presencia de un área bien delimitada que no capta contraste (necrosis) donde antes se encontraba la lesión (198).

Aunque no existe un tamaño tumoral más allá del cual se desaconseje la RFA, los mejores resultados se obtienen en pacientes con tumores únicos menores de 4 cm (199). Como se ha comentado anteriormente, la RFA es un tratamiento que también se puede emplear como terapia puente hasta el TOH, con el fin de detener la progresión tumoral y evitar así la exclusión de la lista de espera.

En cuanto a los resultados, se han descrito tasas de respuesta radiológica completa superiores al 90% para tumores menores de 5 cm, con unas tasas de recurrencia del 3 al 29% y del 3 al 32% a 3 y 5 años respectivamente, una supervivencia global de 67 a 80% y 17,8 a 67,9% a 3 y 5 años respectivamente y una supervivencia libre de enfermedad de 50 a 68% y 17 a 41,8% a 3 y 5 años respectivamente (200–204).

Se han realizado varios estudios prospectivos aleatorizados comparando la RFA con la resección quirúrgica. Un metaanálisis de 2017 (205) no observó diferencias entre ambas técnicas, si bien la mortalidad relacionada con el cáncer era significativamente menor en los pacientes sometidos a cirugía. Sin embargo, con una supervivencia a largo plazo superior al 40% (que alcanza el 80% en pacientes cuidadosamente seleccionados), existe un amplio consenso para considerar a la resección quirúrgica como tratamiento de elección frente a la RFA, incluso para tumores pequeños (126).

La RFA puede estar contraindicada desde un punto de vista anatómico, por ejemplo, en lesiones adyacentes al diafragma, la vesícula biliar, el intestino o venas principales intrahepáticas (206).

Ablación por microondas

Se trata de un procedimiento similar a la RFA, aunque en este caso el electrodo transmite microondas de alta frecuencia. Respecto a la RFA, goza de la ventaja de permitir realizar simultáneamente múltiples ablaciones. En la mayoría de las series se han descrito tasas de respuesta completa del 89 al 95%, tasas de recurrencia local del 4 al 22% a los 3 años y tasas de supervivencia del 51 al 81% a los 3 años (207–211).

En comparación con la RFA no parece haber grandes diferencias. Un metanálisis de 2016 (212) concluyó que ambos procedimientos presentaban una eficacia similar en términos de respuesta completa, tasa de recurrencia local y supervivencia global, aunque en las lesiones de mayor tamaño (> 2 cm) la tasa de recurrencia local fue significativamente menor cuando se empleó la ablación por microondas. Sin embargo, un estudio prospectivo aleatorizado realizado posteriormente no pudo corroborar estas diferencias. Las tasas de progresión tumoral local a 3 y 5 años fueron 4,3 y 11,4% con la ablación por microondas y 5,8 y 19,7% con RFA. No se observaron diferencias significativas en el análisis por subgrupos de tumores. Las tasas de supervivencia global a 3 y 5 años con microondas fueron 82 y 67% y 81 y 73% con RFA. Con la ablación por microondas se requirieron significativamente menos sesiones, la ablación con el aplicador fue más rápida los gastos de hospitalización más bajos que con RFA (213). Estos resultados la convierten en una técnica perfectamente válida como alternativa a la RFA, siempre y cuando esté disponible.

Quimioembolización o TACE

La quimioembolización o TACE (del inglés, *transarterial chemoembolization*) es el tratamiento de elección en pacientes con CHC en un estadio intermedio (estadio B de la clasificación BCLC) al ser el único que ha demostrado mejorar la supervivencia en estos pacientes (214–216). Se trata de un procedimiento de radiología intervencionista mediante el que se cateterizan selectivamente las ramas nutricias tumorales desde la arteria hepática con el fin de inyectar una combinación de un agente quimioterápico y una sustancia embolizante que ocluya dichas ramas (217).

Los candidatos idóneos para TACE son pacientes con CHC irresecable sin invasión vascular o diseminación extrahepática y con cirrosis compensada. De hecho, el grado de disfunción hepática parece ser el factor más importante para predecir la supervivencia en estos enfermos (218–220).

La TACE está contraindicada en los casos en los que el flujo portal se encuentra muy reducido o es inexistente y en pacientes con cirrosis descompensada (221). Es un procedimiento no exento de complicaciones. La más frecuente es el síndrome posquimioembolización, que se caracteriza por la presencia de fiebre (por necrosis tumoral), íleo y dolor abdominal. Otras complicaciones más graves son el desarrollo de abscesos hepáticos, fallo hepático, colecistitis isquémica o incluso muerte (222,223).

El procedimiento varía, pudiendo emplear diferentes combinaciones de agentes quimioterápicos y embolizantes. En la TACE convencional se emplea un agente quimioterápico junto con lipiodol (un medio de contraste yodado oleoso que promueve la retención intratumoral de la quimioterapia) y partículas de esponja de gelatina como agente embolizante. Algunas técnicas alternativas, como el uso de microesferas sintéticas cargadas con un agente quimioterápico que liberan lentamente (adriamicina, doxorubicina, etc) pueden minimizar los efectos secundarios al lograr simultáneamente la oclusión vascular y la liberación del agente quimioterápico, lo que reduce su paso a la circulación sistémica (224). Sin embargo, aún no se ha establecido cuál es el agente quimioterápico óptimo ni el mejor método de embolización (225).

El principal inconveniente de la TACE es que, a pesar de una respuesta inicial al tratamiento, la progresión de la enfermedad es la norma. En este sentido se ha investigado cómo evitar o ralentizar esta progresión tras el tratamiento mediante la asociación de TACE a otras terapias locorreregionales o tratamientos sistémicos (sorafenib) y hoy en día se dispone de múltiples combinaciones. Esta gran variedad de técnicas existente implica una gran heterogeneidad en los resultados. Un metaanálisis de 55 ensayos aleatorizados con un total de 5.763 pacientes concluyó que se lograba una ganancia significativa en términos de supervivencia con cualquiera de los procedimientos de embolización con respecto al tratamiento de soporte del grupo control (nivel de evidencia bajo), siendo la combinación de TACE con otro método (ablación o radioterapia) superior al empleo de TACE sola (226).

Por otra parte, cuestiones como cuál es el esquema terapéutico óptimo, forma de evaluar la respuesta o cuándo considerar que la TACE ha fracasado continúan sin respuesta.

Otros tratamientos locorreregionales

En los últimos años han aparecido otras terapias con resultados prometedores. Entre ellas destaca la radioembolización mediante microesferas de Itrio-90, que induce una necrosis tumoral extensa con un perfil de seguridad aceptable. Aunque su uso está aumentando, no hay estudios que demuestren un impacto sobre la supervivencia y no hay consenso en cuanto al uso óptimo de esta terapia (227). Un escenario clínico en el que la radioembolización podría preferirse respecto a la TACE es en pacientes con CHC y trombosis portal tumoral. Los beneficios sobre otras terapias locorreregionales incluyen una toxicidad relativamente baja, la posibilidad de tratar pacientes con una carga tumoral significativa (en una única sesión en

lugar las múltiples sesiones que requiere la TACE) y efectos secundarios relativamente limitados. Algunas de sus principales limitaciones son el alto coste y restricciones anatómicas (por ejemplo, el paso del material radioactivo al pulmón) (228).

En relación con el TOH se ha descrito su utilidad como terapia puente (229–231) y como *downstaging* (232,233) con resultados similares a otros tratamientos como la TACE.

Tratamiento sistémico

La quimioterapia sistémica paliativa con fármacos citotóxicos convencionales no se ha utilizado de forma rutinaria en pacientes con CHC avanzado por varias razones (234):

- CHC es un tumor quimiorresistente debido a la alta tasa de expresión de genes que le confieren resistencia a los fármacos.
- La quimioterapia convencional no ha demostrado mejorar la supervivencia. Cabe recordar que los pacientes con CHC avanzado presentan a menudo una función hepática muy deteriorada que influye más en la supervivencia que la propia agresividad del tumor, amortiguando el impacto que pueda tener el tratamiento sistémico. Además, la escasa reserva funcional hace que a menudo estos pacientes no toleren bien estos tratamientos (y sus efectos adversos).
- Los resultados de los estudios que se han llevado a cabo son muy dispares debido a la heterogeneidad de las poblaciones según el área geográfica (mientras que los pacientes asiáticos suelen ser más jóvenes, con cirrosis compensada y de etiología predominante vírica, los pacientes europeos y norteamericanos suelen ser mayores, con cirrosis etanólica y múltiples comorbilidades).
- La quimioterapia puede ser menos eficaz en general en pacientes con cirrosis significativa.

Esta situación cambió en 2008 con la aparición de sorafenib, un inhibidor de la tirosina quinasa que actúa sobre receptores de factores angiogénicos, entre otros (235). Se realizaron dos ensayos clínicos multicéntricos evaluando sorafenib respecto a placebo (ensayo SHARP, en Europa y América, y estudio Asia-Pacífico, en el sudeste asiático) en los que se demostró una ganancia significativa de 2-3 meses en la mediana de supervivencia (236,237). Sorafenib ha demostrado ser eficaz independientemente de la etiología de la cirrosis, el estadio tumoral, la

reserva funcional del paciente y los tratamientos previos recibidos (238). Sin embargo, no se dispone de biomarcadores predictivos de respuesta a sorafenib. Se han descrito todo tipo de factores para predecir el beneficio del tratamiento, desde la presencia de determinados eventos clínicos adversos (manifestaciones clínicas cutáneas, hipertensión, diarrea) (239–241) a marcadores bioquímicos (242) y moleculares (243–245). Ninguno de ellos ha logrado ser validado y aceptado en la práctica clínica.

Respecto a la combinación de sorafenib con otras terapias y según la evidencia disponible actualmente, su uso tras la TACE parece ser seguro y eficaz, aunque no ha demostrado un beneficio en términos de supervivencia (246). En relación al TOH, existe poca evidencia sobre su combinación con inmunosupresores (247). También podría ser una opción factible en el tratamiento de la recidiva tras el TOH (248,249).

Aunque sorafenib es, hasta la fecha, el único fármaco que ha demostrado un beneficio en la supervivencia ha propiciado el desarrollo de nuevas terapias moleculares frente al CHC así como un mejor conocimiento de las distintas vías de señalización presentes en esta neoplasia.

En lo concerniente a las terapias locorregionales y sistémicas, las sociedades españolas AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH recomiendan en su documento de consenso (17) la ablación tumoral como tratamiento eficaz en aquellos pacientes con CHC iniciales no candidatos a resección quirúrgica o como tratamiento durante el tiempo de espera del trasplante hepático. En tumores menores de 2 cm la ablación percutánea presenta una eficacia terapéutica similar a la resección quirúrgica. La TACE es el tratamiento de elección en pacientes sin síntomas asociados a cáncer, con función hepática conservada, que presentan un CHC multinodular sin invasión vascular ni extrahepática. Otros tratamientos locorregionales como la radioterapia intratumoral con Itrio-90 han mostrado eficacia en estudios preliminares y se recomienda su evaluación en el contexto de ensayos clínicos. Sorafenib es el tratamiento de elección en pacientes con CHC avanzado. La quimioterapia se ha mostrado ineficaz en el CHC y su uso no está recomendado.

1.2. CARCINOGENESIS, PROCESO METASTÁSICO Y CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

El cáncer no es una enfermedad, sino un conglomerado de trastornos que tienen en común una vasta alteración de la regulación del crecimiento celular que, en última instancia, conduce a la invasión de otros tejidos (metástasis). Aunque los avances de la medicina en el conocimiento de su base molecular son notables, aún queda mucho por aprender sobre sus causas y patogenia, claves para llegar a controlarlo en un futuro.

Hoy en día, a pesar de que un porcentaje significativo de enfermos de cáncer alcanzan la curación mediante la cirugía (y a veces tratamientos adyuvantes complementarios), otros acaban falleciendo tras desarrollar metástasis (250); un proceso en el que participa un amplio elenco de mediadores y en el que aún quedan muchas incógnitas por resolver.

1.2.1. Carcinogénesis

La carcinogénesis se basa en la aparición de una mutación o daño genético no letal en una única célula precursora que, mediante expansión clonal y acúmulo de múltiples mutaciones, dará lugar a una neoplasia. Las dianas de este daño genético son fundamentalmente cuatro grandes grupos de genes reguladores: los protooncogenes (promotores de crecimiento), los genes supresores tumorales (inhibidores del crecimiento), los genes reguladores de la apoptosis y los genes reparadores del ADN.

Este acúmulo de mutaciones confiere a la célula tumoral un fenotipo agresivo que condiciona su malignidad. En conjunto, estas características son (251):

- Autosuficiencia de las señales promotoras del crecimiento.
- Insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento.
- Potencial replicativo ilimitado.
- Evasión de la muerte celular.
- Evasión del sistema inmune.
- Capacidad angiogénica mantenida.
- Infiltración tisular y metástasis.

1.2.2. Cascada metastásica

La letalidad de una neoplasia maligna reside en la agresividad de las células tumorales que la integran, capaces de independizarse del tumor primario e invadir los tejidos sanos adyacentes o, al acceder a la circulación periférica, diseminarse a otros órganos (252–257) y establecer así nuevos nichos de enfermedad o metástasis (258). La enfermedad metastásica se desarrolla a lo largo de múltiples cambios genéticos y epigenéticos y una selección de rasgos favorables a través de sucesivos cuellos de botella (invasión tisular, inmunovigilancia, hipoxia, presión terapéutica, etc). Aquellos clones tumorales con las características prometastásicas más efectivas darán lugar al desarrollo de nuevos focos tumorales donde a su vez continuará la evolución, adquiriendo nuevas características que permitan proseguir la diseminación (259).

Los primeros pasos de este proceso son conocidos. En primer lugar, la expresión de algunos oncogenes promueve un proceso llamado transición epitelio-mesénquima (TEM). Durante este fenómeno, las células del carcinoma regulan negativamente determinados marcadores epiteliales (cadherinas) y positivamente otros mesenquimales (vimentina y actina del músculo liso). En conjunto, estos cambios favorecen el desarrollo de un fenotipo migratorio. Así, la pérdida de expresión de ciertas proteínas que regulan la adhesión intercelular (E-cadherinas), facilita a la célula tumoral prometastásica independizarse de la masa tumoral. A continuación invade el tejido sano tras degradar la matriz extracelular mediante la activación de metaloproteasas y el sistema activador del plasminógeno tipo urokinasa (260,261), adquiriendo entonces la motilidad que le permite alcanzar el torrente sanguíneo gracias la expresión de citocinas y algunos factores de crecimiento con actividad quimiotáctica. En conjunto, estos cambios fenotípicos confieren a la célula tumoral propiedades invasivas.

Una vez que acceden al torrente sanguíneo, las células tumorales son vulnerables a la aniquilación por las defensas inmunitarias y otros mecanismos como la apoptosis inducida al perder la adhesión a la matriz extracelular (*anoikis*). Por ello tienden a formar agregados en los que también participan factores de la coagulación y plaquetas y que se denominan émbolos tumorales. De esta forma, consiguen aumentar su supervivencia y capacidad de implantación distante (262).

A continuación se enumeran los principales hitos que debe superar una célula tumoral para establecer un nuevo foco de enfermedad.

1. Crecimiento de la célula tumoral prometastásica en un microambiente favorable en el que se den las interacciones adecuadas entre distintos complejos de señalización.
2. Independización de la masa tumoral primaria (pérdida de uniones intercelulares) e infiltración en el parénquima sano (degradación de la matriz extracelular) mediante procesos de diferenciación celular (transición epitelial a mesenquimatoso).
3. Intravasación al torrente sanguíneo, donde se forman agregados plaquetarios y microémbolos tumorales.
4. Interacción con el endotelio en un punto distal para que tenga lugar la adhesión y extravasación.
5. Angiogénesis y proliferación para colonizar así un nuevo tejido.

Sin embargo, las células que integran una neoplasia no son genéticamente idénticas, conviviendo múltiples subpoblaciones con características diferentes. Esta heterogeneidad no solo se manifiesta de forma intratumoral, sino que un mismo tumor sólido a su vez puede exhibir cambios temporales y evolucionar de acuerdo a variaciones genéticas en base al microambiente estromal y la presión terapéutica, lo que le confiere la capacidad de desarrollar resistencia a fármacos a los que inicialmente era sensible (263,264).

Por tanto, el manejo de la enfermedad metastásica debería recaer en el análisis de las características del tejido tumoral actual en lugar de en el tumor primario diagnosticado meses o años antes. En este sentido, la determinación de CTC podría ser una herramienta muy útil al proveer de información sobre el tumor en tiempo real.

1.2.3. ¿Qué son las células tumorales circulantes?

Las células tumorales circulantes (CTC) fueron descritas por primera vez en 1869 por el médico australiano Thomas R. Ashworth en una paciente con cáncer de mama. Ashworth apuntó que "las células idénticas a las del cáncer que se ven en la sangre pueden arrojar algo de luz sobre el modo en el que se originan los tumores múltiples que existen en la misma persona" (265). Estas CTC y su determinación en sangre periférica (biopsia líquida) ocupan actualmente muchas de las líneas de investigación en la lucha frente al cáncer y se cree que su detección y caracterización podría aportar valiosa información en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de cualquier neoplasia maligna (266–268).

Las CTC parecen desempeñar un papel fundamental en la formación de metástasis. Así lo han demostrado los estudios experimentales con CTC provenientes de pacientes e implantadas en ratones, en los que se observó la aparición de tumores con similares características a los tumores originales de los pacientes (269,270).

La evidencia actual sugiere que las CTC se encuentran ya presentes en los estadios iniciales de un tumor primario y muestran gran heterogeneidad (271,272). Se han caracterizado múltiples subpoblaciones: células tumorales epiteliales, mesenquimales, TEM y células tumorales con fenotipo célula madre, con distintos grados de agresividad y potencial para metastatizar (254). Se calcula que un millón de CTC por gramo de tejido tumoral se diseminan diariamente al torrente sanguíneo (273). A pesar de este llamativo dato, solo un porcentaje minúsculo - menos del 0,01% - se estima que propiciará el desarrollo de metástasis (274).

El fenómeno mediante el que las CTC colonizan un órgano y dan pie al desarrollo de una nueva lesión es complejo y poco conocido. El hecho de que muchos pacientes con diagnóstico de cáncer y detección de CTC en sangre periférica no lleguen a desarrollar metástasis o recidiva de la enfermedad tras el tratamiento sugiere que se trata de un proceso ineficiente. Se han desarrollado múltiples modelos en ratones a los que se inoculan células tumorales dirigidas frente a diferentes órganos diana sin que estas lleguen a desarrollar con éxito nuevos focos metastásicos (275,276). Luzzi et al (277), observaron que tan solo el 0,02% de las células tumorales inyectadas al torrente venoso portal conseguían formar micrometástasis. En otros trabajos se ha observado que la mayoría de las células tumorales de cáncer de mama sufrían apoptosis al alcanzar el pulmón o que las de cáncer colorrectal desaparecían rápidamente tras infiltrar el parénquima hepático (278).

Los pasos iniciales de la cascada metastásica (la invasión vascular y la migración de las células tumorales a través del torrente sanguíneo una vez franqueada la matriz extracelular) son conocidos (279). Las células tumorales pueden diferenciarse hacia fenotipos de TEM que les confiere mayor movilidad e invasividad, promoviendo de este modo el acceso al torrente sanguíneo (intravasación) y posteriormente desdiferenciarse hacia fenotipos célula madre que les facilite la colonización del nuevo tejido hospedador (280). Sin embargo estos fenómenos no explicarían por sí solos todo el proceso metastásico y, a pesar de que contribuyen a incrementar la agresividad y la quimiorresistencia de las células tumorales, se considera que no juegan un papel tan importante como se creía previamente (258,281). Una vez que se encuentran en la circulación sanguínea, las células tumorales se mueven en un terreno hostil

donde deben sobrevivir al sistema inmune y al estrés oxidativo antes de sobrepasar de nuevo los capilares de camino al órgano diana. Estas células quedan a menudo retenidas en el pulmón (si provienen de la circulación sistémica y previo paso por las cavidades derechas del corazón) o en el hígado (si provienen del lecho esplácnico, que desemboca en la vena porta), los dos órganos que se ven afectados con mayor frecuencia, si bien diferentes tipos de cáncer presentan cierta predilección por estos u otros órganos diana (282).

Por otra parte, en la localización tumoral primaria las células crecen en un microambiente estromal favorable que les permite esquivar la inmunovigilancia. Sin embargo estas condiciones no suelen estar presentes a su llegada a un nuevo tejido diana, donde la mayoría no logran prosperar, si bien se ha podido observar en modelos experimentales que señales sistémicas procedentes de un tumor primario pueden influir en las condiciones microambientales de órganos a distancia creando así un nicho premetastásico previo a la llegada de las células tumorales (277,277) Estos conceptos se han postulado en la teoría de "semilla y tierra" ("seed and soil") según la que la "siembra" de nuevos focos tiene preferentemente lugar un sustrato ("soil") favorable a su crecimiento. Se ha descrito en modelos experimentales con distintos tipos de cáncer (mama, colon y melanoma) una predilección de las CTC por focos preexistentes en detrimento de nuevos focos secundarios en ambientes menos acogedores, lo que se conoce como "self-seeding", entendiendo la cascada metastásica no como un proceso unidireccional sino bidireccional (255). La reinfiltración de la masa tumoral primaria por CTC selecciona aquellas subpoblaciones más agresivas (283). Esta interacción entre el estroma tumoral y CTC provoca la liberación de señales promotoras de crecimiento, angiogénesis e invasión, lo que perpetúa el proceso metastásico. Esto podría explicar la relación entre algunos factores como el tamaño tumoral, la anaplasia o la angiogénesis con la recurrencia local tras una exéresis completa y con un peor pronóstico (284).

En resumen, para que una célula tumoral tenga capacidad tumorigénica debe aunar una serie de cualidades: capacidad para infiltrar tejidos, evadir el sistema inmune, adaptarse al "tejido-hospedador" y sobrevivir como lesión latente hasta que se den las condiciones ideales. En algunos tipos de cáncer, como el luminal de mama, se ha descrito la aparición de metástasis tardías, tras años de evolución desde el diagnóstico y tratamiento del tumor primario, y se cree que tienen su origen en células circulantes que durante ese largo tiempo han permanecido acantonadas y aletargadas en un órgano a distancia, acumulando mutaciones hasta que se manifiestan (285,286).

Por lo tanto, el proceso metastásico de infiltración de un órgano específico podría definirse como la suma de varios factores: la presencia de señales provenientes del tejido tumoral, las características de las células tumorales circulantes, el tipo de circuito sanguíneo al que acceden y la estructura del órgano diana (255). A la hora de intentar prevenir la aparición de metástasis habría que tener todos en cuenta.

Ácidos nucleicos circulantes

Además del estudio de las CTC, hoy en día se están llevando a cabo numerosas investigaciones con ADN y ARN circulantes que provienen de células tumorales que han sido fagocitadas por macrófagos. Este ADN contiene mutaciones genéticas idénticas a las de sus células tumorales originales y puede utilizarse para identificar mutaciones específicas de un tumor y cambios epigenéticos, así como para monitorizar el comportamiento biológico del carcinoma, la respuesta a un tratamiento y la detección precoz de una recaída. Uno de los principales inconvenientes de estudiar el ADN es que es difícil establecer hasta qué punto representa el genotipo de las células tumorales que iniciarán el proceso metastásico. Cabe recordar que una neoplasia está compuesta por múltiples subpoblaciones celulares con distintas propiedades y que tal vez las células tumorales peor adaptadas sean las más propensas a ser destruidas y liberar su ADN.

1.2.3.1. Aplicaciones de las CTC

El estudio de las CTC mediante la biopsia líquida puede conducirnos a una mejor comprensión del proceso metastásico con múltiples aplicaciones clínicas: desde el diagnóstico temprano de una neoplasia maligna hasta la monitorización del tratamiento y posterior seguimiento, pudiendo predecir la recidiva precoz y establecer probabilidades de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Esto ha llevado a considerarlas uno de los novedosos biomarcadores del proceso metastásico con gran utilidad clínica:

1. **Selección de pacientes.** Se ha demostrado en múltiples estudios que los niveles de CTC se relacionan con variables clínicas como la supervivencia y permiten predecir el riesgo de recidiva (287). Los niveles de CTC podrían emplearse como factor pronóstico, establecer probabilidades de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global y estratificar de este modo a los pacientes en función del tratamiento más beneficioso en cada caso.

2. **Seguimiento.** La monitorización de las CTC a lo largo del tiempo permitiría identificar a aquellos pacientes que puedan estar sufriendo una recaída del mismo modo que hoy en día se emplean los marcadores tumorales.
3. **Monitorización de la respuesta a un tratamiento.** Se ha observado un descenso en los niveles de CTC tras el inicio de tratamientos adyuvantes (288). La determinación seriada de CTC en varios intervalos de tiempo podría indicar en tiempo real si el tratamiento recibido está siendo efectivo. Eso permitiría evitar tratamientos con alta toxicidad en casos en los que no son efectivos, así como ahorrar costes innecesarios en otras pruebas (TC, PET-TC, determinación de otros marcadores tumorales, etc).
4. **Diagnóstico precoz.** La biopsia líquida podría facilitar la detección precoz de una neoplasia, antes incluso de que sea visible mediante pruebas de imagen, al identificar en la sangre periférica elementos tumorales circulantes de una neoplasia no conocida previamente.
5. **Medicina a la carta.** Del mismo modo que en microbiología se emplean los antibiogramas para determinar a qué antibióticos es sensible una bacteria, las CTC podrían emplearse para determinar a qué tratamiento quimioterápico es sensible un tumor de modo que podamos ofrecer un tratamiento personalizado así como establecer dianas moleculares contra las que dirigir nuevos tratamientos.

1.2.3.2. Métodos de detección de CTC

A pesar de su futuro prometedor en el estudio del cáncer, no existe hoy en día una técnica de elección para la determinación y caracterización de las CTC, disponiendo de más de 40 sistemas diferentes (Tabla 11). La mayoría de estos procedimientos requieren llevar a cabo varios pasos:

1. Preservación de las CTC mediante centrifugación, lavado y adición de sustratos
2. Enriquecimiento. Consiste en aislar las CTC mediante técnicas basadas en propiedades biológicas o en propiedades físicas.
3. Identificación, enumeración y caracterización celular. Se aplican diversas técnicas sobre proteínas o ácidos nucleicos (inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa) y posteriormente se observan en dispositivos de imagen por personal cualificado. Hoy en día existe un gran interés no solo en determinar el número de CTC en sangre periférica sino en estudiar sus características genotípicas y

fenotípicas mediante el uso de diferentes marcadores. Esto nos permitiría conocer qué subpoblación es responsable del proceso metastásico.

Las características morfológicas y fenotípicas de las CTC están ampliamente aceptadas. Se entiende por CTC como aquella célula de forma redondeada, de tamaño medio o grande ($> 5 \mu\text{m}$), nucleada, con un ratio núcleo/citoplasma alto y que expresa citoqueratinas o EpCAM en ausencia de expresión para CD45 (marcado leucocitario). Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, existen subpoblaciones de CTC fenotípicamente diferenciables en función de los marcadores que expresan, que también podrían emplearse como dianas diagnósticas o terapéuticas **(254)**. Los principales marcadores conocidos hasta la fecha se resumen en la Tabla 12.

Tabla 11. Métodos de detección de CTC.

Método de detección	Tecnología empleada
CellSearch	Inmunomagnetismo antiEpCAM + inmunofluorescencia para CK8, 18,19 y CD45.
IsoFlux	Inmunomagnetismo antiEpCAM + inmunofluorescencia para CK, CD45 y Hoechst 33342.
Adnatest	Inmunomagnetismo + PCR cuantitativa en panel genético.
CytoTrack	Citometría de flujo e inmunofluorescencia (escaneado fluorescente sobre disco rotado a alta velocidad).
ImageStream	Inmunomagnetismo + citometría de flujo y conteo en microscopio fluorescente.
CTC-iChip	Inmunomagnetismo + microfluidos
LiquidBiopsy	Inmunomagnetismo + chip microfluídico
MACS	Inmunomagnetismo con varios anticuerpos
SERS	Inmunomagnetismo
MagSweeper	Inmunomagnetismo
iFISH	Inmunomagnetismo + hibridación <i>in situ</i>
NanoVelcro	Microfluidos anti-EpCAM, anti-GPC-3 y anti-ASGPR
ISSET	Microfiltración
CanPatrol	Microfiltración + hibridación ARN (CK, EpCAM, Twist y vimentina)
OncoCEE	Inmunocitoquímica
FAST	Escaneado con fibra óptica
OncoQuick	Membrana porosa + centrifugado en gradiente de densidad
EPISPOT	Secreción proteica
Vita-Assay	Centrifugado en gradiente de densidad
Ficoll-Paque PLUS	Gradiente de densidad

Tabla 12. Características fenotípicas de las diferentes subpoblaciones de CTC.

Subpoblación de CTC	Marcadores
CTC epitelial	CD176 EGFR HER2 Muc1 Citokeratinas CK8, CK18, CK19 EpCAM
CTC tipo célula madre	CD26 CD44 CD90 CD133 CXCR4 Nestina
CTC TEM	N-cadherina O-cadherina Vimentina Fibronectina Twist

La técnica ideal debería cumplir los siguientes requisitos:

- Validez analítica (capacidad para aislar verdaderamente CTC).
- Validez clínica (capacidad para predecir unos resultados clínicos específicos).
- Utilidad clínica (capacidad para mejorar los resultados clínicos cuando se use).

Algunas limitaciones generales de estos métodos son:

- La concentración de CTC en sangre periférica es ínfima. En una muestra de 10 ml de sangre es posible identificar en el mejor de los casos (y dependiendo del método de detección) varias decenas de CTC (289). En esa misma cantidad de sangre circulan, en comparación, millones de eritrocitos y linfocitos.
- Para el conteo de CTC suele requerirse un paso previo de “enriquecimiento” mediante el uso de marcadores específicos, por lo que solo se seleccionan las que son afines.
- El volumen sanguíneo que se puede analizar es escaso, de modo que la presencia de CTC no está garantizada.

Técnicas basadas en propiedades físicas

Las técnicas basadas en propiedades físicas tienen en cuenta el tamaño, la densidad, la maleabilidad, la capacidad migratoria y la carga eléctrica de las CTC. El principal inconveniente de estas técnicas es la heterogenicidad de las CTC, cuyo tamaño y demás cualidades físicas pueden variar enormemente tanto en un mismo tumor como en diferentes pacientes, en los que, además, algunas células sanguíneas pueden asemejarse a las CTC. Esto desemboca en una elevada tasa de falsos positivos que limita el uso de estas técnicas.

TAMAÑO

El método básico de enriquecimiento basado en el tamaño asume que las células tumorales son más grandes que el resto de células de la sangre (17-52 μm vs 6 - 15 μm) (290). Mediante unas membranas porosas a modo de filtro se logra retener células de un determinado tamaño, en este caso, las CTC. El más conocido es el filtro ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells*). Esta técnica ofrece la ventaja de ser rápida, sensible y preserva intactas las células. Sus principales inconvenientes son su baja especificidad y su alto coste.

DENSIDAD

Los métodos de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll permiten separar los distintos componentes de la muestra sanguínea. Las células tumorales se aíslan en la interfase celular creada y posteriormente se somete a un proceso de enriquecimiento y detección mediante métodos inmunológicos o moleculares (291). Son métodos rápidos aunque su sensibilidad es baja.

CARGAS ELÉCTRICAS

La dielectroforesis o movimiento de partículas a consecuencia de los efectos de la polarización de un campo magnético no uniforme se puede aplicar para separar los distintos componentes de una muestra sanguínea.

Técnicas basadas en propiedades biológicas

Las técnicas basadas en propiedades biológicas emplean anticuerpos específicos que se unen a marcadores de superficie de las CTC, como la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2), miembros de la familia de las citoqueratinas y marcadores mesenquimales (N-cadherina y vimentina) (292,293).

INMUNOMAGNETISMO BASADO EN LA EXPRESIÓN ANTIGÉNICA

Es la técnica más extendida. El método consiste en dirigir frente a un antígeno específico microesferas magnéticas conjugadas con el anticuerpo correspondiente. La unión entre el anticuerpo y el antígeno que expresa la célula diana permite, gracias a las microesferas magnéticas y aplicando un campo magnético, capturar las células deseadas (selección positiva). Estas partículas magnéticas pueden ser microesferas de óxido de hierro o microfluidos (solución coloide que contiene nanopartículas magnéticas tapizadas por los anticuerpos).

El marcador o antígeno de superficie más empleado es una glicoproteína transmembrana conocida como EpCAM, ya que está presente en todas las células epiteliales (y por tanto en las células tumorales derivadas de estas) (294). Las CTC EpCAM+ se han asociado a mal pronóstico

en una gran variedad de tumores, tanto en estadios tempranos como avanzados de la enfermedad (270,274,282,287,295–301).

A continuación, se emplearán técnicas de inmunofluorescencia para la identificación y conteo de CTC en el microscopio de fluorescencia. En este paso se emplean anticuerpos inmunofluorescentes dirigidos frente a CK, CD45 (expresado solo por los leucocitos) y el núcleo. (302).

La detección de CTC por Inmunomagnetismo proporciona una especificidad elevada y permite cuantificar sus niveles en sangre, estudiar su morfología e identificar diferentes antígenos.

El principal inconveniente, además de su alto coste, es que solo es capaz de capturar aquellas CTC que expresan un determinado antígeno contra el que se dirige el complejo anticuerpo-microesfera magnética. Por tanto, todas aquellas CTC que no expresan ese antígeno en concreto, pasarán inadvertidas.

En relación a este método existe otra limitación y es que hoy en día no se dispone de marcadores inmunocitoquímicos específicos de células tumorales que nos permitan, por ejemplo, diferenciarlas de células epiteliales no tumorales (por otra parte extremadamente raras en el torrente sanguíneo de un individuo sano) de modo que se entienda por célula tumoral circulante a toda célula epitelial aislada en el torrente sanguíneo que cumple las siguientes características: posee núcleo (a diferencia de los eritrocitos y las plaquetas), expresa en su superficie el marcador epitelial citoqueratina y carece del antígeno leucocitario CD45. Además, según los estudios más recientes, es sabido que no todas las células tumorales expresan citoqueratina, o lo que es lo mismo, son de estirpe epitelial, ya que se han identificado subpoblaciones que no expresan EpCAM y sí marcadores de perfil TEM o de célula madre (280,303).

INVASIÓN

Se basan en las propiedades invasivas de las CTC, que son capaces de invadir una matriz de adhesión celular marcada previamente con fluorescencia, de modo que estas células puedan luego identificarse en el microscopio de fluorescencia al contener fragmentos de dicha matriz.

SECRECIÓN PROTEICA

Detectan proteínas producidas por las células tumorales cuando se cultivan. Para ello se realiza en primer lugar un enriquecimiento inmunomagnético negativo mediante marcaje con CD45. Posteriormente la muestra se pone en contacto con una placa de cultivo que contiene anticuerpos fluorescentes frente a proteínas específicas. Esta técnica aporta información sobre el perfil de las CTC en base a las proteínas que secretan.

Principales inconvenientes de la biopsia líquida en la actualidad

Lograr aislar e identificar CTC supone un desafío técnico para el que se han desarrollado numerosos métodos, cada uno con su propio protocolo para la preparación, enriquecimiento y análisis de las muestras. Por consiguiente, la mayoría de los estudios son pequeños, de un solo centro y con datos demográficos muy variados; lo que dificulta mucho la validación externa de los resultados. Los siguientes pasos en la investigación irán encaminados a estandarizar un método que, con alta sensibilidad y especificidad, logre identificar el espectro completo de CTC. Para ello serán necesarios estudios prospectivos multicéntricos con un mayor tamaño muestral y utilizando una plataforma de detección de CTC uniforme. Además, la detección de células circulantes en sangre periférica procedentes del tumor original no siempre es a expensas de células efectivas con capacidad metastásica y este es un sesgo que hay que tener en cuenta si no se disponen de otras técnicas que permitan subclasificar a las CTCs en poblaciones con relevancia o no en el proceso biológico de la metástasis.

1.2.4. Papel de las CTC en el hepatocarcinoma

Aunque desde la década de los noventa se han llevado a cabo numerosos estudios con diferentes marcadores tumorales, el primer trabajo con CTC fue publicado en 2013 por Sun et al (304). Este grupo describió la posibilidad de detectar CTC EpCAM-positivas en la sangre periférica de pacientes con hepatocarcinoma y demostraron que en los pacientes sometidos a cirugía curativa (resección hepática), la detección preoperatoria de dos o más CTC en 7,5 ml de sangre periférica mediante el método CellSearch se asocia con un peor pronóstico al relacionarse significativamente con el tamaño tumoral, los niveles de AFP, la invasión vascular, el estadio TNM, la trombosis tumoral portal, la supervivencia libre de enfermedad y la

supervivencia global. Ese mismo año, Schulze et al (305) describieron una asociación entre la presencia de CTC y una supervivencia global más pobre, lo que sugiere un valor pronóstico. Dos años más tarde, Kelley et al (306) encontraron una correlación entre las CTC EpCAM-positivas y los niveles de AFP y la invasión vascular.

Estos trabajos, entre otros, fueron incluidos en un metaanálisis de 2017 en el que Sun et al (307) observaron que la presencia de CTC se asociaba con niveles más elevados de AFP (>400), presencia de trombosis tumoral portal, estadios más avanzados según la clasificación TNM (invasión ganglionar), mayor tamaño tumoral y peores tasas de supervivencia global y libre de enfermedad.

En otro trabajo más reciente, Wang et al (308) analizaron los niveles totales de CTC así como de distintas subpoblaciones (mesenquimales y mixtas) en el posoperatorio de 62 pacientes con HCC tratados con resección hepática. Observaron que las concentraciones de estas CTC eran significativamente mayores en los pacientes con recidiva y que la presencia de CTC mesenquimales se asociaba con un riesgo de recaída más alto. Curiosamente un año después, Chen et al (309), en un trabajo con 113 pacientes con HCC tratados con resección hepática o con ablación, las concentraciones de diferentes fenotipos de CTC (epiteliales, mesenquimales y TEM) no fueron predictores de recurrencia y tampoco encontraron una correlación con los estadios clínicos.

Además, la cantidad de CTC se correlaciona con el estadio tumoral (útil en la selección de pacientes para trasplante) y puede ser un indicador de existencia de enfermedad residual o metástasis (310,311). Por otra parte, las CTC no están presentes en pacientes con cirrosis, hepatitis crónicas o en individuos sanos (312).

El papel de las CTC en pacientes con CHC que se trasplantan ha sido poco estudiado. En un trabajo de 2018, Xue et al (313) analizaron la concentración de CTC mediante dos métodos (CellSearch y iFISH) en 30 pacientes sometidos a TOH y observaron que la supervivencia libre de enfermedad era significativamente mayor en aquellos pacientes con menos de 5 CTC pretrasplante, determinado con el método iFISH. Por otro lado, en otro trabajo de ese mismo año con 47 pacientes, Wang et al (314) no encontraron asociación entre las CTC y la tasa de recurrencia postrasplante.

Con respecto a los ácidos nucleicos circulantes, la expresión de ARNm de AFP en sangre periférica se ha sugerido como sustituto de la determinación de células tumorales circulantes y

se ha asociado con un mayor riesgo de recurrencia postrasplante (315). Sin embargo, su utilidad es controvertida y algunos autores lo consideran poco específico. También se ha investigado con otros ARN y ADN circulantes, pero ninguno de ellos ha sido ampliamente reconocido como un marcador valioso, probablemente por su baja especificidad (316). Otros trabajos han propuesto la utilidad de la determinación de microARN circulantes como predictores de mal pronóstico (317,318) aunque hasta la fecha no hay datos sobre su asociación con la recurrencia postrasplante. En la Tabla 13 se recogen los trabajos con CTC y CHC disponibles hasta la fecha.

Tabla 13. Estudios con CTC en pacientes con CHC.

Trabajo	Pacientes	Método	Hallazgos
Sun et al (304), 2013	123 CHC Qx	CellSearch	CTC+ 67% preQx y 28% 1 mes posQx. ≥ 2 CTC, >recidiva.
Schulze et al(305), 2013	59 CHC Qx	CellSearch	CTC+ 31%. Asociación con estadio, invasión vascular y peor SG.
Guo et al (319), 2014	299 CHC Qx, TACE y RT	MACS	> CTC pretratamiento, >progresión. Disminución niveles CTC si respuesta a tratamiento.
Kelley et al (306), 2015	20 CHC Qx	CellSearch	CTC+ 40% CHC metastásicos. Asociación ≥ 1 CTC e invasión vascular, AFP y peor SG.
Wang et al (320), 2016	42 CHC	CTC-BioT-Chip	CTC+ 60% y correlación con estadio TNM.
Zhou et al (321), 2016	49 CHC Qx	RosetteSep	> Concentración EpCAM mRNA CTC, > riesgo recurrencia inicial (67% vs 10%) y al año (50% vs 10%).
Ogle et al (322), 2016	69 CHC	Citometría de flujo	>CTC, >estadio tumoral, trombosis tumoral portal y peor supervivencia.
Von Felden et al (323), 2017	57 CHC Qx	CellSearch	CTC+ 15%. CTC+ asociación con >tasa recurrencia y <SLE.
Chen et al (324), 2017	195 CHC	CanPatrol	CTC mesenquimales asociación con edad, estadio BCLC, metástasis, AFP y recidiva.
Wang et al (308), 2018	62 CHC Qx	CanPatrol	CTC+ 84%. CTC mesenquimales (+), > riesgo recidiva

Xue et al (313), 2018	30 CHC TOH	CellSearch + iFISH	<5 CTC, > SLE (iFISH)
Wang et al (314), 2018	47 CHC TOH	CanPatrol	CTC(+) 70,2%. No asociación con recidiva postOH.
Shen et al (325), 2018	89 CHC TACE	CellSearch	CTC+ 56%. Asociación concentración CTC y mortalidad y progresión.
Yu et al (326), 2018	139 CHC Qx	CellSearch	≥2 CTC, < SLE y SG.
Qi et al (327), 2018	112 CHC Qx	CanPatrol	CTC+ 90%. ≥16 CTC y ≥2% CTC mesenquimales se asocia con recurrencia y metástasis.
Ou et al (328), 2018	165 CHC Qx	CanPatrol	CTC+ 71%. >CTC asociado con >AFP, varios tumores, estadio avanzado y émbolo tumoral.
Ye et al (329), 2018	42 CHC- VHB	CanPatrol	CTC posQx factor pronóstico independiente para recidiva.
Chen et al (309), 2019	113 CHC Qx o ablación	CanPatrol	No correlación CTC con recurrencia ni características clínicas.
Chen et al, 2020 (330)	50 CHC TOH	imFISH	CTC+ (52% pacientes) menor SLE 1 año (61,5% vs 91,6%)

CHC, carcinoma hepatocelular; CTC, células tumorales circulantes; Qx, resección quirúrgica; TACE, quimioembolización; RT, radioterapia; SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global; VHB, virus de la hepatitis B.

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

El hepatocarcinoma es una de las neoplasias más frecuentes y letales del mundo. Además, aparece con frecuencia en el seno de una hepatopatía crónica (1,2), en cuyo caso el trasplante hepático es la mejor opción potencialmente curativa en pacientes seleccionados (criterios de Milán) (3), en los que se alcanza una supervivencia global a 5 años del 70% (4). Sin embargo, la escasez de donantes alarga el tiempo en lista de espera, promoviendo la progresión de la enfermedad. A su vez, la reaparición del tumor postrasplante no es rara y alrededor del 20% de los pacientes sufrirá una recidiva, mermando considerablemente su supervivencia al extenderse el tumor a diferentes órganos y disminuir la probabilidad de disponer de un tratamiento curativo (5).

Se han descrito varios factores pronósticos asociados al fenómeno de recurrencia. Sin embargo, están basados en características macro y microscópicas tras el análisis histológico del hígado enfermo explantado. Estos factores pronósticos son fundamentalmente el tamaño y número de nódulos, el grado de diferenciación y la presencia de invasión microvascular. En los últimos años se han propuesto varios modelos que intentan predecir el riesgo de caída, pero se basan en estos mismos factores y en los niveles de AFP, cuya sensibilidad es limitada. Actualmente no existen marcadores eficientes de la actividad tumoral pretrasplante que permitan predecir de forma precoz la recidiva de la enfermedad.

Se ha postulado que en estos pacientes, en los que el tumor es eliminado completamente con el hígado enfermo, la responsabilidad de la recidiva recae sobre las células tumorales circulantes (CTC) existentes desde antes del trasplante y que por mecanismos no bien conocidos aún logran implantarse y extenderse por otros órganos o en el hígado injertado. Hoy en día existe tecnología que permite su detección y estudio a partir de una muestra en sangre periférica (biopsia líquida) y estas CTC se consideran biomarcadores emergentes del proceso metastásico, proporcionando información en tiempo real sobre el comportamiento del tumor.

El papel de las CTC en los CHC candidatos a TOH es muy poco conocido. Un mejor conocimiento sobre su evolución y relación con otras pruebas diagnósticas y factores pronósticos abriría la puerta a su empleo en la práctica clínica con multitud de aplicaciones: seleccionar pacientes en los que el procedimiento vaya a ser efectivo, monitorizar la respuesta al tratamiento y detectar precozmente la recurrencia de la enfermedad.

2.2. Hipótesis

- I. La concentración de CTC en sangre periférica en pacientes con CHC dentro de los criterios de Milán que se trata mediante trasplante hepático se asocia a la recidiva del tumor y a factores predictores de peor pronóstico.
- II. La evaluación oncológica mediante CTC, AFP y PET-TC es útil para predecir la recidiva tumoral tras el trasplante hepático y aporta información valiosa sobre el pronóstico de estos pacientes y la idoneidad del tratamiento.

2.3. Objetivos

Objetivo principal

Estudiar la evolución de las CTC antes y después del trasplante hepático en pacientes diagnosticados de CHC dentro de los criterios de Milán, analizar su papel en la recaída de la enfermedad y determinar su posible asociación con la captación en el PET-TC, los niveles de AFP y los factores de mal pronóstico conocidos.

Objetivos específicos

1. Estudio descriptivo de los niveles de CTC en distintos momentos evolutivos del curso clínico de estos pacientes: antes del TOH, al mes, 6 meses, 1 año y 2 años.
2. Comparar los niveles de CTC pretrasplante, con los obtenidos al mes, a los seis meses, al año y a los dos años tras el TOH.
3. Estudiar la posible asociación entre los niveles de CTC pretrasplante y otros marcadores como los niveles de AFP y la captación en el PET-TC. Comparar los niveles de CTC y AFP a lo largo de la evolución antes y después del TOH.
4. Estudiar la posible asociación entre los niveles de CTC, los niveles de AFP y la captación en el PET-TC con diferentes variables demográficas, clínicas e histológicas (edad, IMC, CHILD, MELD, etiología de la cirrosis, tiempo en lista de espera, número de TACE previas, tamaño y número de tumores, respuesta histológica, grado de diferenciación y presencia de invasión microvascular).

Justificación, Hipótesis y Objetivos

5. Estudiar la posible asociación entre los niveles de CTC, AFP y captación en el PET con la recidiva tumoral postrasplante. Analizar la supervivencia libre de enfermedad entre grupos con distintas características.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio analítico observacional sobre una cohorte de pacientes diagnosticados de CHC dentro de los criterios de Milán y que fueron tratados mediante TOH en la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia, España) desde septiembre de 2014. Para llevar a cabo el estudio se siguieron los criterios de la guía STROBE.

Se realizó un seguimiento de los pacientes desde el momento en el que se incluyeron en lista de espera para trasplante hasta el cierre de la base de datos en septiembre de 2020. Para la determinación de las CTC se tomaron muestras de sangre de cada paciente en las siguientes etapas: pretrasplante y al cabo de 1 mes, 6 meses, 1 año y 2 años del trasplante.

3.2. Pacientes

3.2.1. Criterios de inclusión

Se incluyeron en el estudio un total de 30 pacientes en lista de espera de TOH que cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- Edad comprendida entre 18-70 años.
- Diagnóstico no invasivo de CHC en base a los criterios radiológicos establecidos: nódulo mayor de 1 cm que presenta hipervascularización en fase arterial seguida de lavado precoz en fase venosa portal en una prueba de imagen dinámica (resonancia magnética o tomografía computerizada) sobre un hígado cirrótico (22). En los casos en los que el diagnóstico era dudoso, se recurrió a una segunda prueba de imagen o se confirmó histológicamente mediante biopsia hepática percutánea (19).
- Firma del consentimiento informado. Todos los pacientes incluidos en el estudio participaron de forma voluntaria y se obtuvo el consentimiento informado según las normas de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial (adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964, modificada en la 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013).

3.2.2. Criterios de exclusión

- Antecedentes de otra neoplasia intra o extrahepática.
- Diagnóstico de CHC avanzado (fuera de los criterios de Milán, metastásico).

3.2.3. Método de selección y seguimiento

Los pacientes se seleccionaron de forma consecutiva no aleatorizada en base a los criterios de inclusión descritos. Los pacientes incluidos en el estudio fueron evaluados periódicamente en las Consultas Externas de la Unidad de Trasplante Hepático para la recogida de las muestras sanguíneas y las entrevistas clínicas.

3.3. Variables del estudio

Variables clínicas

- **Edad, sexo e índice de masa corporal (IMC)** de todos los pacientes en el momento de su inclusión en lista de espera.
- Fecha de inclusión en lista de espera y fecha del trasplante hepático.
- **Tiempo en lista de espera.** Calculado en días entre la fecha del trasplante y la fecha de inclusión en lista de espera.
- Clasificación **CHILD** y **MELD** de cada paciente en el momento de su inclusión en lista de espera.
- **Etiología de la cirrosis.** Se tuvieron en cuenta las siguientes causas de cirrosis: infección crónica por VHC, cirrosis etanólica y cirrosis mixta (infección por VHC + etanólica). Las demás etiologías se agruparon en una misma categoría denominada “otras causas de cirrosis”.
- **Terapia puente.** La indicación de terapia puente se decidió según el criterio del Comité de Trasplante. El tratamiento elegido en todos los casos fue quimioembolización (TACE) selectiva con microesferas sintéticas cargadas con adriamicina. Se tuvieron en cuenta el número de sesiones.

- **Captación en el PET.** En todos los pacientes se realizó al menos un PET como parte del estudio pretrasplante. Se consideró PET positivo en los casos en los que existía una captación patológica. También se registró el valor de la captación en términos de SUVmax.
- Modelos pronósticos. Se emplearon los sistemas **RETREAT** score (167) y **AFP** model (170). En base a estos modelos se asignó una puntuación a cada paciente para cada modelo.
- **Recurrencia** de la enfermedad. El diagnóstico y la fecha de la recurrencia se estableció en función de la fecha de realización de la prueba de imagen (TC, RM o PET-TC) que demostró la aparición de nuevas lesiones compatibles con recidiva tumoral según los criterios radiológicos. En base a estos datos, se determinó el intervalo libre de enfermedad, definido como el periodo de tiempo (en meses) transcurrido entre el TOH y la reaparición del tumor en cualquier localización o hasta el cierre de la base de datos si no hubo recidiva.
- **Supervivencia** global. Tiempo transcurrido (en meses) entre la fecha del TOH y el fallecimiento del paciente o el cierre de la base de datos.

Variables analíticas

Alfafetoproteína. Niveles en sangre de AFP medidos en ng/ml.

Células tumorales circulantes. Niveles de CTC en 10 ml de sangre periférica mediante el sistema Isoflux (Fluxion Biosciences, South San Francisco, California).

Variables histológicas

Para las siguientes variables se consideró el informe patológico del hígado explantado.

- **Tamaño** (en centímetros) y **número de tumores.** Para contabilizar el número y el tamaño de las lesiones solo se tuvieron en cuenta las que fueron consideradas en el informe patológico definitivo como “tejido tumoral viable”. De este modo, las lesiones con una necrosis total se equipararon a una respuesta patológica completa y no se tuvieron en cuenta para la medición. En los casos en los que únicamente se describió una lesión necrótica, el diámetro y suma final fue de cero centímetros.
- **Invasión microvascular.** Se define como la presencia de émbolos tumorales dentro de la luz vascular (portal o suprahepática).

- **Respuesta a la terapia puente.** Se definió como respuesta completa a la presencia de necrosis en el 100% del tumor. En caso contrario se consideró como respuesta parcial.
- **Grado de diferenciación.** Los tumores fueron clasificados según el grado de diferenciación en bien diferenciado (grado 1), moderadamente diferenciando (grado 2) y pobremente diferenciado (grado 3) de acuerdo a los criterios de Edmonson y Steiner (331)

3.4. Método

Determinación de CTC mediante el sistema Isoflux

Para el análisis de las CTC mediante el sistema Isoflux se obtuvo en primer lugar una muestra de 10 ml de sangre periférica en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que es el empleado rutinariamente para la extracción de un hemograma. Las muestras se procesaron en las 36 horas siguientes a la extracción, conservándose hasta entonces a temperatura ambiente.

Enriquecimiento de CTC

La fase de enriquecimiento comenzó con la separación celular en gradiente con Ficoll. La fracción de células recuperada tras la centrifugación y aspirado del sobrenadante se incubó durante 2 horas a 40°C con una suspensión de partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos anti-EpCAM, incluidos en el kit Isoflux *Circulating Tumor Cell Enrichment* (Fluxion Biosciences, South San Francisco, California).

Aislamiento de CTC

A continuación, la muestra se procesó a través de los canales de microfluidos, donde la aplicación de un campo magnético permite aislar las CTC y transferirlas a un tubo de microcentrifugación mientras que las células restantes se recogen en un pocillo de desechos. (Figura 4).



Figura 4. Cartucho del sistema Isoflux con sus diferentes depósitos. Adaptada de <https://liquidbiopsy.fluxionbio.com/isoflux-ctc>.

Contaje de CTC

El último paso consiste en realizar una tinción con inmunofluorescencia con el fin de visualizar las CTC en el microscopio de fluorescencia. Para ello se empleó el kit de Isoflux *Circulating Tumor Cell Enumeration* (Fluxion Biosciences, South San Francisco, California), que incluye los siguientes reactivos: anti-CK-fluoroscéina isocianato (específico para la citoqueratina intracelular, característica de las células epiteliales), anti-CD45-indocarbocianina (específico para linfocitos) y Hoechst 33342 (dirigido frente al núcleo) (Figura 5).

Las imágenes de fluorescencia obtenidas se observaron a través de un microscopio de fluorescencia por dos expertos independientes empleando un software de imágenes (BioFlux Montage, Fluxion Biosciences Inc) y se identificaron y cuantificaron las CTC, entendiendo como tales aquellas células morfológicamente intactas, nucleadas (Hoechst 33342 positivo), que expresan CK y son CD-45 negativas.

Esta parte del análisis la llevó a cabo la Unidad de Células Tumorales Circulantes del Servicio de Oncología Médica del Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (Madrid, España).

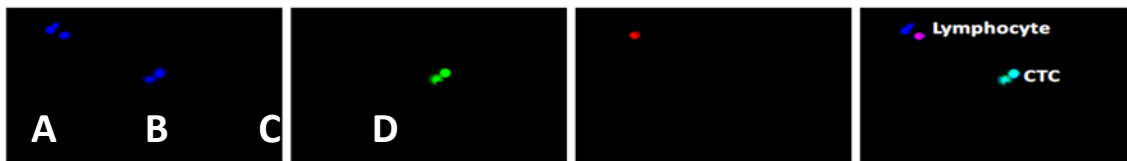


Figura 5. Tinción con inmunofluorescencia: A, Hoechst 33342+ (células nucleadas), B, anti-CK-fluoresceína isocianato+ (células epiteliales); C, CD-45+ (leucocitos), D, diferencia entre linfocitos y CTC (obtenida de <https://liquidbiopsy.fluxionbio.com/isoflux-ctc>).

PET-TC

El estudio 18F-FDG-PET/TC se realizó con un equipo híbrido PET-TC (Gemini GXL, Philips) siguiendo el método descrito en trabajos previos (332). En el momento de la realización de la prueba, todos los pacientes cumplieron al menos un ayuno de 6 horas y presentaron glucemias normales. La obtención de las imágenes se realizó entre 60 y 90 minutos después la administración de 5,2 MBq/kg de FDG (mediana de 370 MBq de FDG). En primer lugar se realizó una tomografía computarizada sin contraste desde la base del cráneo hasta el inicio de las extremidades inferiores y con los siguientes parámetros: 120 kV, 100 mA y cortes de sección de 5 mm para la corrección de atenuación y fusión de imágenes. A continuación se realizó la exploración de PET a razón de 3 minutos por posición de la cama. Las imágenes fueron procesadas por un algoritmo iterativo e interpretadas por un médico nuclear experto mediante un análisis visual cualitativo y semicuantitativo. Se consideraron patológicos aquellos focos de hipercaptación del trazador que no fueran atribuibles a captaciones fisiológicas. El grado de captación de la lesión se estableció determinando el índice SUV (Standard Uptake Value o valor de captación estándar) máximo del área de interés en relación a la dosis inyectada y el peso del paciente.

3.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v22.0 para Windows (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA), asumiendo diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Se realizó el test Shapiro-Wilk para comprobar la distribución de las variables. En el estudio descriptivo de la muestra, las variables cualitativas se expresaron en frecuencias y porcentajes mientras que las variables cuantitativas, en media y desviación estándar o mediana y rango intercuartílico según la distribución de cada variable.

Para estudiar la correlación entre la concentración de CTC, el SUVmax, niveles de AFP y las variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) o el test Rho de Spearman según la distribución de la muestra. Para estudiar la asociación entre los niveles de CTC y AFP y SUVmax y las variables categóricas se emplearon los test U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Para conocer la variación de los niveles de CTC y AFP, antes y después del trasplante, se empleó el test de Wilcoxon. El estudio del valor predictivo de las CTC, AFP y SUVmax se efectuó mediante el análisis ROC (*Receiver Operating Characteristic*), estimando el área bajo la curva (AUC) para comparar la eficacia de cada parámetro y calculando el punto de corte óptimo en base al índice de Youden máximo en cada caso. Finalmente, los análisis de supervivencia libre de enfermedad y global se llevaron a cabo mediante el método Kaplan-Meier y la comparativa de las curvas de supervivencia con el estadístico Log-Rank.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio descriptivo de las características de los pacientes y evolución clínica.

Se incluyeron un total de 30 pacientes con hepatocarcinoma dentro de los criterios de Milán y tratados mediante TOH. El 90% fueron varones, con una mediana de edad de 57 años. El alcohol y el VHC fueron, de forma combinada o aislada, la etiología más habitual de la cirrosis. Otras causas menos frecuentes de cirrosis fueron la NASH (2 casos), la cirrosis criptogenética (2 casos), la glucogenosis tipo III (1 caso) y el VHB (1 caso).

En la Tabla 14 se muestran las principales características demográficas, clínicas y radiológicas del grupo estudiado. Las características histológicas de los CHC pueden verse en la Tabla 15 mientras que las determinaciones analíticas de AFP y CTC se expresan en la Tabla 16.

La mediana del seguimiento fue de 57 meses (RI: 45 - 62), siendo el tiempo mínimo de seguimiento 7 meses y el máximo 71 meses. Del total de 30 pacientes, 4 de ellos (13,3%) presentaron recidiva del tumor. En 3 de los casos la recaída tuvo lugar durante el primer año de seguimiento mientras que la más tardía sucedió a los 20 meses del trasplante. El tumor reapareció en todos los casos en múltiples localizaciones, siendo hígado y hueso los lugares predilectos (constante en los 4 casos), seguida de la recaída pulmonar (2 casos) y adrenal (1 caso). Durante el seguimiento fallecieron 7 pacientes (23,3%). Cuatro lo hicieron a consecuencia de eventos relacionados con la progresión tumoral. Un paciente falleció al año del TOH tras sufrir varias reintervenciones relacionadas con una estenosis biliar con absceso hepático asociado y rechazo celular del injerto. Otro paciente falleció a los 10 meses del TOH por un absceso hepático que desembocó en shock séptico. El último paciente falleció algo más de 3 años después del trasplante por un evento cardiovascular.

Tabla 14. Características demográficas, clínicas y radiológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Variable	Cohorte (n = 30)	
Edad	57 (RI: 54-62)	
Sexo (varón/mujer) (%)	27/3 (90/10)	
IMC	27,8 (RI: 25,1-29,9)	
Etiología de la cirrosis	VHC	12 (40%)
	Alcohol	6 (20%)
	VHC + alcohol	6 (20%)
	Otras	6 (20%)
CHILD	A	19 (63,3%)
	B	7 (23,3%)
	C	4 (13,3%)
MELD	9 (RI: 8-11)	
Tiempo en LEQ (días)	186 (RI: 104-427)	
Terapia puente (TACE)	26 (86,7%)	
Número de TACE	1 (RI: 1-2)	
PET positivo	10 (33,3%)	
SUVmax	2,5 (0 - 3,4)	
RETREAT score	1 (RI: 1 - 3)	
RETREAT score \geq 5	3 (10%)	
AFP model	0 (RI: 0 - 2)	
AFP model > 2	2 (6,7%)	
Recidiva	4 (13,3%)	
SLE (meses)	57 (RI:41 - 62)	
Fallecimiento	7 (23,3%)	
SG (meses)	57 (RI: 45 - 62)	

IMC, índice de masa corporal; VHC, virus de la hepatitis C; LEQ, lista de espera quirúrgica; TACE, quimioembolización transarterial; SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global.

Tabla 15. Características histológicas de los hepatocarcinomas analizados.

Variable		Cohorte (n = 30)
Tamaño (cm)		2 (RI: 1-3)
Número de tumores		1 (RI: 1-3)
Suma diámetro de tumores viables (cm)		3 (RI: 1-5,1)
Grado de diferenciación	Grado 1	6 (20%)
	Grado 2	13 (43,3%)
	Grado 3	2 (6,7%)
	Necrosis completa	9 (30%)
Invasión microvascular		3 (10%)

Tabla 16. Niveles de AFP (ng/ml) y de CTC (CTC/10 ml) antes del trasplante y durante el seguimiento.

Variable	Pre-TOH	Pos-TOH			
		1 mes	6 meses	1 año	2 años
AFP (ng/ml)	6 (RI: 2 - 16,5)	2 (RI: 1 - 4)	2 (RI: 2 - 5)	2 (RI: 1,3 - 4)	2 (RI: 1 - 4)
CTC/10 ml	9 (RI: 0 - 93)	4 (RI: 1 - 22)	3 (RI: 0 - 20)	2 (RI: 0 - 6)	3 (RI: 1 - 9)

4.2. Correlación entre los niveles de CTC pretrasplante y variables demográficas, clínicas, radiológicas e histológicas.

Para comprobar la existencia de una asociación entre los niveles de CTC pretrasplante y las variables cuantitativas continuas se utilizó el test de correlación de Spearman. Se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa con las siguientes variables: tiempo en lista de espera ($r_s = 0,550$; $p = 0,002$), SUVmax ($r_s = 0,401$; $p = 0,028$), tamaño tumoral ($r_s = 0,570$; $p = 0,001$), suma del diámetro de los tumores viables ($r_s = 0,487$; $p = 0,006$), puntuación en el modelo RETREAT ($r_s = 0,576$; $p = 0,001$) y puntuación en el modelo AFP ($r_s = 0,384$; $p = 0,044$). Los resultados del análisis pueden verse en la Tabla 17.

Para estudiar la asociación entre los niveles de CTC pretrasplante con las variables categóricas se emplearon los test U de Mann-Whitney (para variables categóricas dicotómicas) y la prueba de Kruskal Wallis (para variables categóricas policotómicas). Los niveles de CTC fueron significativamente superiores en los varones ($U = 7,5$; $z = - 2,304$; $p = 0,021$), cuando el PET fue positivo ($U = 25$; $z = - 2,250$; $p = 0,024$), cuando la puntuación en el modelo RETREAT fue superior a 5 ($U = 8$; $z = - 2,210$; $p = 0,027$) y en presencia de invasión microvascular ($U = 10$; $z = - 2,130$; $p = 0,033$). No se encontró una correlación significativa entre los niveles de CTC pretrasplante y la reaparición del tumor. Los resultados de la comparativa se expresan en las tablas 18 y 19.

Tabla 17. Test de correlación de Rho de Spearman para el estudio de la asociación entre los niveles pretrasplante de CTC y variables cuantitativas demográficas, clínicas, radiológicas e histológicas.

Variable	Mediana y RI	Rho de Spearman (rs)	p
CTC preTOH	9 (RI: 0 - 93)	-	-
Edad	57 (RI: 54-62)	- 0,096	0,613
IMC	27,8 (RI: 25,1-29,9)	0,186	0,324
MELD	9 (RI: 8-11)	- 0,038	0,841
Tiempo en LEQ	186 (RI: 104-427)	0,550	0,002
Número de TACE	1 (RI: 1-2)	0,164	0,388
SUVmax	2,5 (0 - 3,4)	0,401	0,028
RETREAT score	1 (RI: 1 - 3)	0,576	0,001
AFP model	0 (RI: 0 - 2)	0,384	0,044
AFP preTOH	6 (RI: 2 - 16,5)	- 0,097	0,609
Tamaño (cm)	2 (RI: 1-3)	0,570	0,001
Número de tumores	1 (RI: 1-3)	0,279	0,136
Suma tamaño tumores	3 (RI: 1-5,1)	0,487	0,006
SLE (meses)	57 (RI:41 - 62)	0,252	0,180
SG (meses)	57 (RI: 45 - 62)	0,322	0,083

IMC, índice de masa corporal; VHC, virus de la hepatitis C; LEQ, lista de espera quirúrgica; TACE, quimioembolización transarterial; SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global.

Tabla 18. Test U de Mann-Whitney para evaluar la asociación entre los niveles de CTC pretrasplante y las variables categóricas dicotómicas.

Variable		Número de pacientes	CTC preTOH	U de Mann-Whitney	p
Sexo	Varón	27 (90%)	13 (RI: 1 - 99)	U = 7,5	0,021
	Mujer	3 (10%)	0	z = - 2,304	
Terapia puente (TACE)	Sí	26 (86,7%)	23 (RI: 3 - 99)	U = 21,5	0,060
	No	4 (13,3%)	0	z = - 1,880	
PET positivo	Sí	10 (33,3%)	95 (RI: 15 - 253)	U = 42,5	0,011
	No	20 (66,7%)	3 (RI: 0 - 21)	z = - 2,555	
RETREAT score ≥ 5	Sí	3 (10%)	99 (RI: 95 - 319)	U = 8	0,027
	No	27 (90%)	13 (RI: 1 - 44)	z = - 2,210	
AFP model > 2	Sí	2 (6,7%)	56 (RI: 20 - 91)	U = 16	0,368
	No	28 (23,3%)	18 (RI:1 - 99)	z = - 0,900	
Invasión microvascular	Sí	3 (10%)	99 (RI: 95 - 319)	U = 10	0,033
	No	27 (90%)	13 (RI: 1 - 44)	z = - 2,130	
Recidiva	Sí	4 (13,3%)	59 (RI: 14 - 97)	U = 31	0,196
	No	26 (86,7%)	6 (RI: 0 - 65)	z = - 1,294	
Fallecimiento	Sí	7 (23,3%)	10 (RI: 1 - 91)	U = 77	0,862
	No	23 (76,7%)	8 (RI: 0 - 102)	z = - 0,173	

Tabla 19. Test de Kruskal Wallis para evaluar la asociación entre los niveles de CTC pretrasplante y las variables categóricas policotómicas.

	Variable	Número de pacientes	CTC preTOH	Kruskal Wallis	p
Causa de la cirrosis	VHC	12 (40%)	27 (RI: 10 - 72)	$\chi^2 (3) = 0,490$	0,921
	Alcohol	6 (20%)	307 (RI: 165 - 448)		
	VHC + alcohol	6 (20%)	10 (RI: 5 - 275)		
	Otras	6 (20%)	6 (RI: 2 - 11)		
CHILD	A	19 (63,3%)	20(RI: 6 - 95)	$\chi^2 (3) = 2,295$	0,317
	B	7 (23,3%)	270 (RI: 0 - 539)		
	C	4 (13,3%)	44 (RI: 23 - 49)		
Grado de diferenciación	Grado 1	6 (20%)	23 (RI: 0 - 53)	$\chi^2 (3) = 2,040$	0,564
	Grado 2	13 (43,3%)	17 (RI: 2 - 95)		
	Grado 3	2 (6,7%)	275 (RI: 10 - 539)		
	NC	9 (30%)	0		

NC, necrosis completa

4.3. Correlación entre los niveles de AFP pretrasplante y variables demográficas, clínicas, radiológicas e histológicas.

Se realizó el test de correlación de Spearman para evaluar la asociación entre los niveles de AFP pretrasplante y las diferentes variables cuantitativas incluidas en el estudio. No se encontró una correlación estadísticamente significativa en ningún caso.

Se realizaron los test U de Mann-Whitney y Kruskal Wallis para estudiar la asociación entre los niveles de AFP pretrasplante y las variables cualitativas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

4.4. Evolución de los niveles de CTC y AFP

Evolución de los niveles de CTC

A todos los pacientes se les extrajo una muestra sanguínea para la determinación de CTC antes del trasplante y en 24 de ellos (80%) se contabilizó al menos una célula tumoral. En un total de 9 pacientes se realizaron todas las determinaciones hasta los 2 años. Al cabo de un mes del procedimiento, el análisis de CTC se repitió en 27 pacientes, detectando CTC en 21 casos (77,8%). A los 6 meses del TOH, se obtuvo una muestra de sangre de 18 pacientes, logrando identificar CTC en 13 pacientes (72,2%). Al año del TOH, se logró analizar la concentración de CTC en 20 pacientes, siendo positivos un total de 13 (65%). Finalmente, a los 2 años del TOH, se extrajo una muestra en 17 casos, de los que 14 presentaron células tumorales (82,4%). La concentración mediana de CTC en cada punto se expresa en la Tabla 20.

Se aplicó el test de Wilcoxon para comparar la evolución de los niveles de CTC antes y después del TOH y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles preTOH y los niveles de CTC al año ($Z = - 2,375$; $p = 0,018$) y a los 2 años ($Z = - 2,076$; $p = 0,038$). En la Figura 6 se representan los niveles medianos de CTC en cada punto evolutivo.

Tabla 20. Test de Wilcoxon para muestras relacionadas con el fin de comparar los niveles de CTC en los distintos momentos del seguimiento.

	Cuantificación de CTC				
	Pretrasplante	1 mes	6 meses	1 año	2 años
Número de muestras	30	27	18	20	17
CTC + (%)	24 (80%)	21 (77,8%)	13 (72%)	13 (65%)	14 (82,4%)
Mediana de CTC	9 (RI: 0 - 93)	4 (RI: 1 - 22)	3 (RI: 0 - 20)	2 (RI: 0 - 6)	3 (RI: 1 - 9)
Wilcoxon	-	Z = - 1,333	Z = - 0,782	Z = - 2,375	Z = - 2,076
p	-	0,183	0,434	0,018	0,038

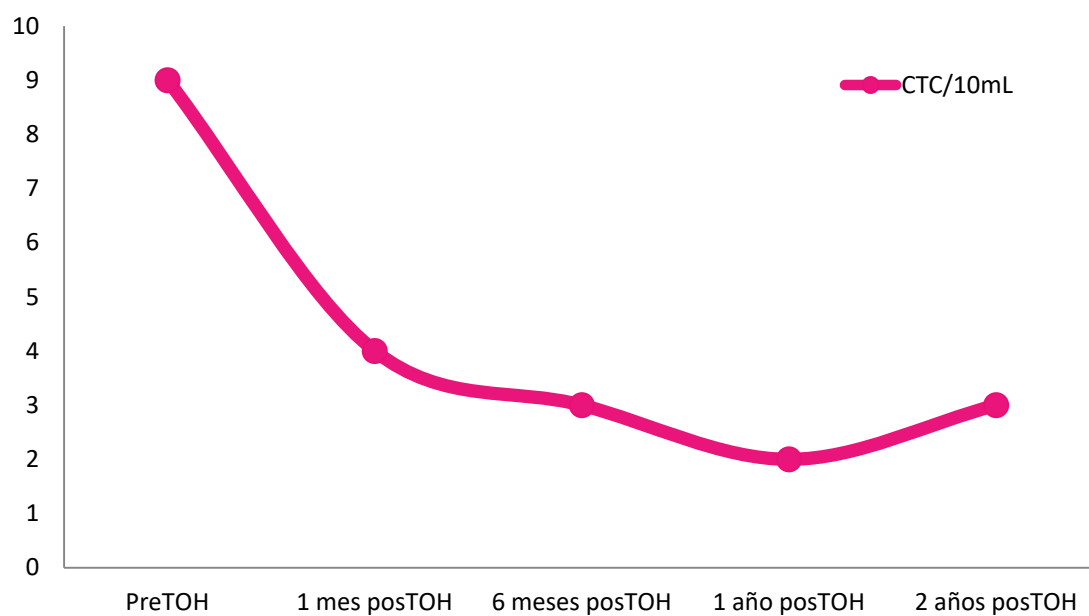


Figura 6. Evolución de los niveles medianos de CTC antes y después del TOH.

Patrones evolutivos de los niveles de CTC

Para estudiar la evolución de los niveles de CTC se tuvieron en cuenta todas las determinaciones tanto pre como postrasplante. Para simplificar el análisis, los niveles de CTC postrasplante se reunieron en dos grupos, los correspondientes al posoperatorio temprano (1 y 6 meses postrasplante) y los correspondientes al posoperatorio tardío (1 y 2 años postrasplante). Para cada grupo, se tuvo en cuenta la determinación más alta de CTC en cada caso.

En base a lo anterior, se identificaron tres patrones de comportamiento. Un grupo de 10 pacientes presentó un patrón descendente. En este grupo, se detectaron niveles iniciales elevados y, tras el trasplante, un descenso hasta concentraciones mínimas. Otro grupo constituido por 9 pacientes presentó unos niveles intermedios de CTC durante todo el seguimiento con un incremento en el posoperatorio inicial (al mes o a los 6 meses, patrón en “cresta”). El resto de pacientes mostró un patrón plano, con niveles bajos o indetectables en todo momento.

Para determinar si la concentración de CTC fue diferente entre los tres patrones evolutivos se recurrió a la prueba Kruskal Wallis. Se encontraron diferencias significativas en los niveles de CTC pretrasplante ($X^2(2) = 16,5$; $p < 0,001$) y en el posoperatorio inicial ($X^2(2) = 15,6$; $p < 0,001$). En el análisis *post-hoc* se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles pretrasplante del patrón descendente (mediana = 173) y el patrón plano (mediana = 1) ($p < 0,001$), entre los niveles en el posoperatorio inicial del patrón decreciente (mediana = 13) y del patrón en pico (mediana = 84) ($p = 0,046$) y entre los niveles en el posoperatorio inicial del patrón plano (mediana = 4) y el patrón en cresta (mediana = 84) ($p < 0,001$).

También se estudió la asociación entre los diferentes patrones y las variables clínicas e histológicas. Para este análisis se emplearon el test Chi cuadrado y la prueba Kruskal Wallis según procediera. El PET fue positivo en una mayor proporción de pacientes del patrón descendente respecto a los otros dos grupos (60% vs 33,3% vs 9,1%; $p = 0,047$). También se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño tumoral ($X^2(2) = 6,6$; $p = 0,036$). En el análisis *post-hoc* se halló una diferencia estadísticamente significativa en el tamaño tumoral entre el grupo con patrón decreciente y el grupo con patrón plano (mediana 3 vs 1, $p = 0,047$).

Resultados

En la Figura 7 se representan gráficamente los tres patrones de comportamiento. Los resultados del estudio de asociación se expresan en la Tabla 21 junto a los niveles medianos de CTC correspondientes a cada patrón evolutivo en cada momento de la evolución de los pacientes.

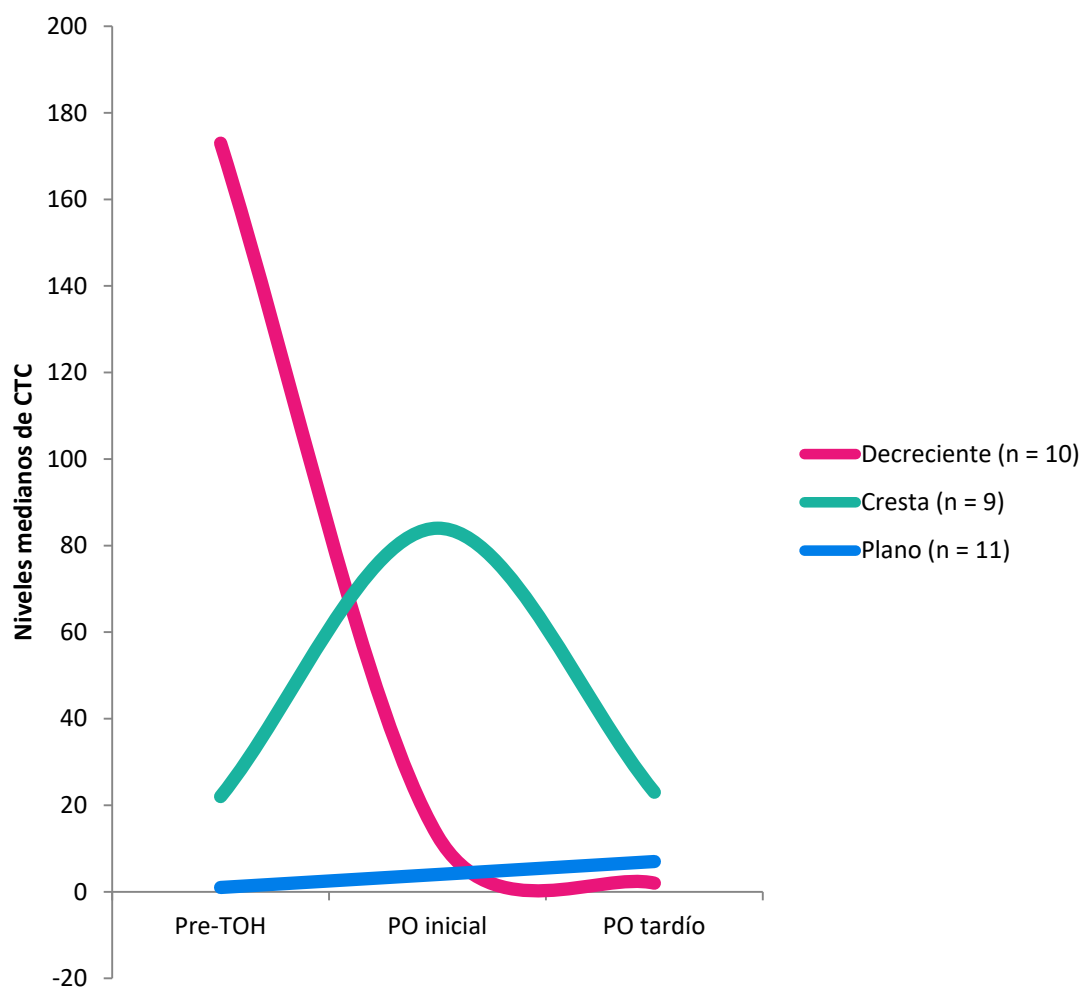


Figura 7. Patrones evolutivos de CTC durante el seguimiento.

Tabla 21. Niveles medianos de CTC antes del trasplante y en el posoperatorio inicial y tardío correspondientes a cada uno de los patrones evolutivos.

Variable	Patrón CTC			
	Decreciente (n = 10)	Cresta (n = 9)	Plano (n = 11)	p
CTC pre-TOH	173 (RI 23 - 383)	22 (RI 0 - 59)	1 (RI 0 - 3)	< 0,001
CTC PO inicial (1 y 6 meses)	13 (RI 4 - 59)	84 (RI 27 - 448)	4 (RI 2 - 6)	< 0,001
CTC PO tardío (1 y 2 años)	2 (RI 1 - 3)	23 (RI 1 - 65)	7 (RI 1 - 10)	0,315
AFP pre-TOH	6 (RI: 2 - 37,5)	4 (RI: 1 - 7)	4,6 (RI: 5 - 15)	0,077
PET positivo	6 (60%)	3 (33,3%)	1 (9,1%)	0,047
SUVmax	3 (RI: 0 - 5,2)	3 (RI: 0 - 3,4)	0 (RI: 0 - 2,6)	0,084
Tamaño	3 (RI: 1,4 - 5)	2,5 (RI: 2 - 3)	1 (RI: 0 - 1,8)	0,036
Número de nódulos	1,5 (RI: 1 - 3)	1 (RI: 1 - 2)	1 (RI: 0,5 - 3,5)	0,647
Suma diámetro tumores	4,6 (RI: 1,2 - 5,9)	3 (RI: 2,5 - 8,9)	3,3 (RI: 0 - 5,2)	0,254
Invasión microvascular	2 (20%)	1 (11,1%)	0	0,309
Recidiva	3 (30%)	1 (11,1%)	0	0,127

Evolución de los niveles de AFP

Para comparar la evolución de los niveles de AFP antes y después del TOH en los 30 pacientes se aplicó de nuevo el test de Wilcoxon y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles AFP y todos los niveles postrasplante: al mes ($Z = -3,650$; $p < 0,001$), 6 meses ($Z = -2,009$; $p = 0,045$), 1 año ($Z = -2,226$; $p = 0,026$) y 2 años ($Z = -2,486$; $p = 0,013$). Los resultados se muestran en la Tabla 21 y la Figura 8.

Tabla 22. Test de Wilcoxon para comparar los niveles de AFP antes y después del TOH.

	AFP (ng/ml)				
	Pretrasplante	1 mes	6 meses	1 año	2 años
Mediana de AFP	6 (RI: 2 - 16,5)	2 (RI: 1 - 4)	2 (RI: 2 - 5)	2 (RI: 1,3 - 4)	2 (RI: 1 - 4)
Wilcoxon	-	$Z = -3,650$	$Z = -2,009$	$Z = -2,226$	$Z = -2,486$
p	-	< 0,001	0,045	0,026	0,013

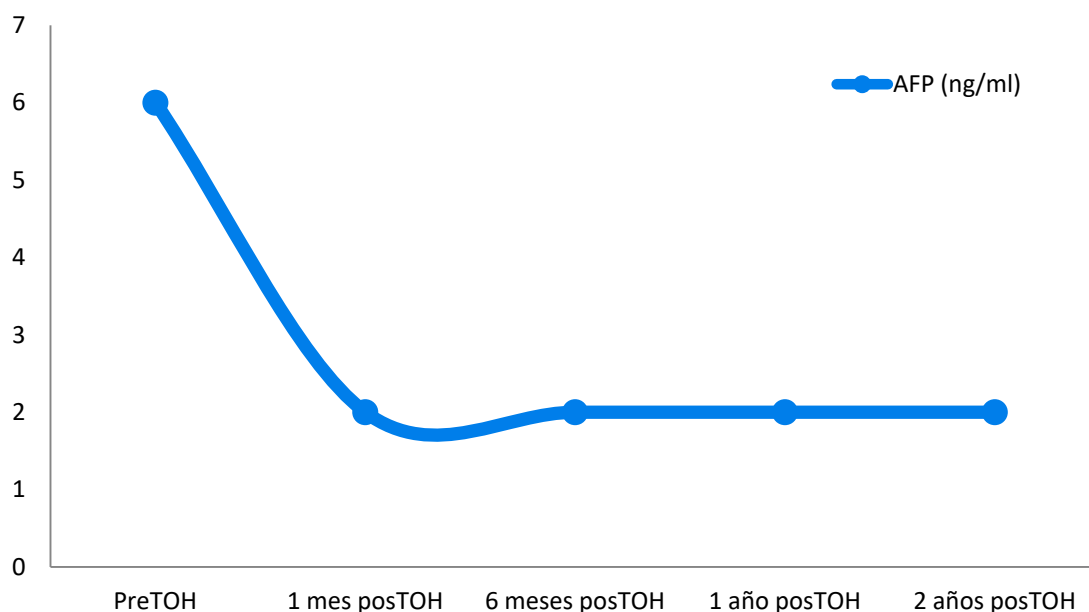


Figura 8. Evolución de los niveles medianos de AFP antes del TOH y durante los dos primeros años tras la intervención.

4.5. Correlación entre la captación en el PET y variables demográficas, clínicas e histológicas.

Para estudiar la asociación entre un resultado positivo en el PET y las variables cuantitativas se empleó el test U de Mann-Whitney. Se encontraron diferencias significativas con el número de TACE ($U = 48,5$; $z = -2,432$; $p = 0,015$), con la suma de los diámetros de los tumores viables ($U = 43,5$; $z = -2,503$; $p = 0,012$), con la puntuación en los modelos RETREAT ($U = 18$; $z = -3,517$; $p = 0,001$) y AFP ($U = 21,5$; $z = -1,285$; $p = 0,001$) y con los niveles pretrasplante de CTC ($U = 42,5$; $z = -2,555$; $p < 0,001$).

La asociación entre el PET positivo y las variables categóricas se analizó mediante el test Chi cuadrado y la prueba exacta de Fisher cuando procediera. En los pacientes con PET positivo, fue más frecuente la presencia de invasión microvascular (30% vs 0; $p = 0,03$). Los resultados de este análisis se manifiestan en la Tabla 23.

El estudio del PET no solo se tuvo en cuenta un resultado positivo o negativo, sino que también se analizó la captación en términos de SUVmax. Para comprobar la existencia de una asociación entre el SUVmax y las variables cuantitativas se utilizó la correlación de Spearman. Se encontró una correlación estadísticamente significativa con las siguientes variables: niveles de CTC pretrasplante ($r_s = 0,401$; $p = 0,028$), suma del diámetro de tumores viables ($r_s = 0,389$, $P = 0,034$) y puntuación en los modelos pronósticos RETREAT ($r_s = 0,654$; $p < 0,001$) y AFP ($r_s = 0,666$; $p < 0,001$).

El estudio de la asociación entre el SUVmax y las variables cualitativas del estudio se efectuó mediante los test U de Mann-Whitney y Kruskal Wallis según correspondiera. Los pacientes que sufrieron recidiva presentaron una mayor captación en el PET en términos de SUVmax ($U = 17$; $z = -2,472$; $p = 0,013$). El SUVmax también fue mayor en los pacientes con invasión microvascular ($U = 9$; $z = -2,521$; $p = 0,012$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el resto de variables.

Tabla 23. Análisis de la asociación entre un resultado positivo en el PET y las variables incluidas en el estudio mediante los test U de Mann-Whitney y Chi cuadrado según procediera.

Variable		PET positivo (n = 10)	PET negativo (n = 20)	p
Edad		62 (RI: 57,5 - 64)	61 (RI: 54,5 - 62,5)	0,692
Sexo varón (%)		10 (100%)	17 (85%)	0,532
IMC		26,8 (RI: 25,4-26,8)	31,6 (RI: 31-32,6)	0,428
Causa cirrosis	VHC	5 (50%)	7 (35%)	0,771
	Alcohol	2 (20%)	4 (20%)	
	VHC + alcohol	1 (10%)	5 (25%)	
	Otras*	2 (20%)	4 (20%)	
CHILD	A	7 (70%)	12 (60%)	0,860
	B	2 (20%)	5 (25%)	
	C	1 (10%)	3 (15%)	
MELD		10 (RI: 8,5 - 10)	9 (RI: 8,5 - 12)	0,893
Tiempo en LEQ		413 (RI: 104 - 593)	174 (RI: 101 - 268)	0,140
Terapia puente (TACE)		10 (100%)	16 (80%)	0,272
Número de TACE		2,5 (RI: 2,5 - 3)	1 (RI: 1 - 1,5)	0,015
RETREAT score		2 (RI: 1,5 - 2,5)	1 (RI: 1 - 1,5)	0,001
RETREAT score ≥ 5		3 (30%)	0	0,095
AFP model		2 (RI: 0 - 2)	0	< 0,001
AFP model > 2		1 (25%)	1 (4,2%)	0,095
Recidiva		3 (30%)	1 (5%)	0,095
Fallecimiento		3 (30%)	4 (20%)	0,657
SLE		68 (RI: 67 - 69,5)	64 (RI: 61,5 - 64)	0,808
SG		68 (RI: 67 - 69,5)	64 (RI: 61,5 - 64)	0,494
Tamaño (cm)		4 (RI: 3,3 - 4,7)	2,5 (RI: 2,3 - 2,8)	0,062
Número de tumores		1 (RI: 1 - 2,5)	1 (RI: 1 - 2)	0,076
Suma tamaño de tumores		5,3 (RI: 3,9 - 7,1)	3 (RI: 2,5-4,1)	0,012

Resultados

Grado de diferenciación	Grado 1	2 (20%)	4 (20%)	0,824
	Grado 2	5 (50%)	8 (40%)	
	Grado 3	1 (10%)	1 (5%)	
	NC	2 (20%)	7 (35%)	
Invasión microvascular		3 (30%)	0	0,030
AFP preTOH		7 (RI: 6,5 - 18)	2 (RI: 1,5 - 3,5)	0,199
AFP 1 mes		3 (RI: 2 - 3,5)	3 (RI: 2 - 3,5)	0,320
AFP 6 meses		2 (RI: 1,5 - 18,5)	2 (RI: 2 - 3,5)	0,374
AFP 1 año		3 (RI: 2 - 3,5)	2 (RI: 2 - 3)	0,900
AFP 2 años		4 (RI: 2,5 - 4,5)	2 (RI: 1 - 2,5)	0,394
CTC preTOH		93 (RI: 10 - 177)	34 (RI: 16 - 73)	0,011
CTC 1 mes		14 (RI: 3 - 78)	6 (RI: 0 - 581)	0,820
CTC 6 meses		10 (RI: 5 - 40)	58 (RI: 8 - 157)	0,537
CTC 1 año		2 (RI: 1 - 54)	2 (RI: 2 - 6)	0,900
CTC 2 años		6 (RI: 2 - 26)	31 (RI: 4 - 73)	0,613

4.6. Pacientes con recidiva

Para estudiar la asociación entre la recidiva y las variables cuantitativas se empleó el test U de Mann-Whitney. Se encontró una asociación significativa con las siguientes variables: la captación en el PET en términos de SUVmax (U = 15; z = - 1,213; p = 0,048), el tamaño tumoral (U = 18; z = - 2,094; p = 0,036), la suma de los diámetros de los tumores viables (U = 17; z = - 2,150; p = 0,031), la puntuación en el RETREAT score (U = 6; z = - 2,867; p = 0,004), la puntuación en el modelo AFP (U = 18; z = - 2,200; p = 0,028), AFP a los 6 meses (U = 15; z = - 2,096; p = 0,047), AFP al año (U = 0; z = - 2,353; p = 0,007), AFP a los 2 años (U = 0; z = - 2,367; p = 0,007), la supervivencia libre de enfermedad (U = 3; z = - 2,995; p = 0,003) y supervivencia global (U = 13; z = - 2,384; p = 0,017).

Para estudiar la asociación entre la recidiva y las variables categóricas se empleó el test Chi Cuadrado y la prueba exacta de Fisher cuando procediera. Los siguientes parámetros fueron más frecuentes entre los pacientes con recidiva: invasión microvascular (50% vs 3,8%; p = 0,039), puntuación RETREAT mayor o igual a 5 2 (50% vs 4,2%; p = 0,045) y el haber fallecido (100% vs 11,5%; p = 0,001). Los resultados del análisis de los factores relacionados con la recidiva pueden verse en la Tabla 24.

Tabla 24. Análisis de los factores que se asocian a la recidiva.

Variable		Recidiva (n = 4)	No recidiva (n = 26)	p
Edad		54,5 (RI: 49,5 - 56,5)	60 (RI: 54 - 63)	0,119
Sexo varón (%)		4 (100%)	23 (88,5%)	0,999
IMC de receptor		27,6 (RI: 26,4-28,5)	29 (RI: 25,1-31,7)	0,951
Causa cirrosis	VHC	3 (75%)	9 (34,6%)	0,345
	Alcohol	0	6 (23,1%)	
	VHC + alcohol	1 (25%)	5 (19,2%)	
	Otras*	0	6 (23,1%)	
CHILD	A	4 (100%)	15 (57,7%)	0,263
	B	0	7 (26,9%)	
	C	0	4 (15,4%)	
MELD		7,5 (RI: 6 - 9,8)	9 (RI: 8 - 12)	0,225

Resultados

Tiempo en LEQ	460 (RI: 138 - 564)	174 (RI: 104 - 319)	0,314
Terapia puente (TACE)	4 (100%)	22 (84,6%)	0,999
Número de TACE	2,5 (RI: 1,3 - 3,8)	1 (RI: 1-2)	0,083
PET positivo	3 (75%)	7 (26,9%)	0,095
SUVmax	5,2 (1 - 7,6)	1,1 (0 - 2,7)	0,031
RETREAT score	5 (RI: 3 - 5)	1 (RI: 1 - 2)	0,004
RETREAT score ≥ 5	2 (50%)	1 (4,2%)	0,045
AFP model	2 (RI: 0 - 2)	0 (RI: 0 - 2)	0,028
AFP model > 2	1 (25%)	1 (4,2%)	0,270
Fallecimiento	4 (100%)	3 (11,5%)	0,001
SLE	8 (5 - 14)	59,5 (46 - 62)	0,003
SG	22 (10 - 40)	59,5 (46 - 62)	0,017
Tamaño (cm)	5 (RI: 2,3 - 6,5)	2 (RI: 0,8 - 3)	0,038
Número de tumores	2 (RI: 1,3 - 4,3)	1 (RI: 1 - 3)	0,207
Suma tamaño de tumores	8,3 (RI: 2,7 - 11,6)	2,8 (RI: 0,8-4,3)	0,031
Grado de diferenciación	Grado 1	0	6 (23,1%)
	Grado 2	2 (50%)	11 (42,3%)
	Grado 3	1 (25%)	3 (3,8%)
	NC	1 (25%)	8 (30,8%)
Invasión microvascular	2 (50%)	1 (3,8%)	0,039

Evolución de los niveles de CTC y AFP en relación con la recidiva.

El estudio de la asociación entre la recidiva y los niveles de CTC y AFP se efectuó con el test U de Mann-Whitney. En los pacientes que presentaron recidiva se observó una tendencia descendente en los valores medianos de CTC. Estos pacientes partieron de niveles pretrasplante elevados (mediana = 59 vs 6) y en el posoperatorio inicial se igualaron a los niveles de CTC de los pacientes sanos. Sin embargo, esta discrepancia pretrasplante no presentó significación estadística. La Tabla 25 y la Figura 8 ilustran estos resultados.

Tabla 25. Niveles de CTC en los pacientes que presentaron recidiva y los que no.

Variable	Recidiva (n = 4)	No recidiva (n = 26)	p
CTC preTOH	59 (RI: 14 - 97)	6 (RI: 0 - 65)	0,196
CTC 1 mes	1 (RI: 1 - 766)	4 (RI: 1 - 22)	0,531
CTC 6 meses	1 (RI: 0 - 2)	9 (RI: 0 - 24)	0,254
CTC 1 año	1	2 (RI: 0 - 4)	0,597
CTC 2 años	-	6 (RI: 1 - 9)	NA

NA, no aplicable.

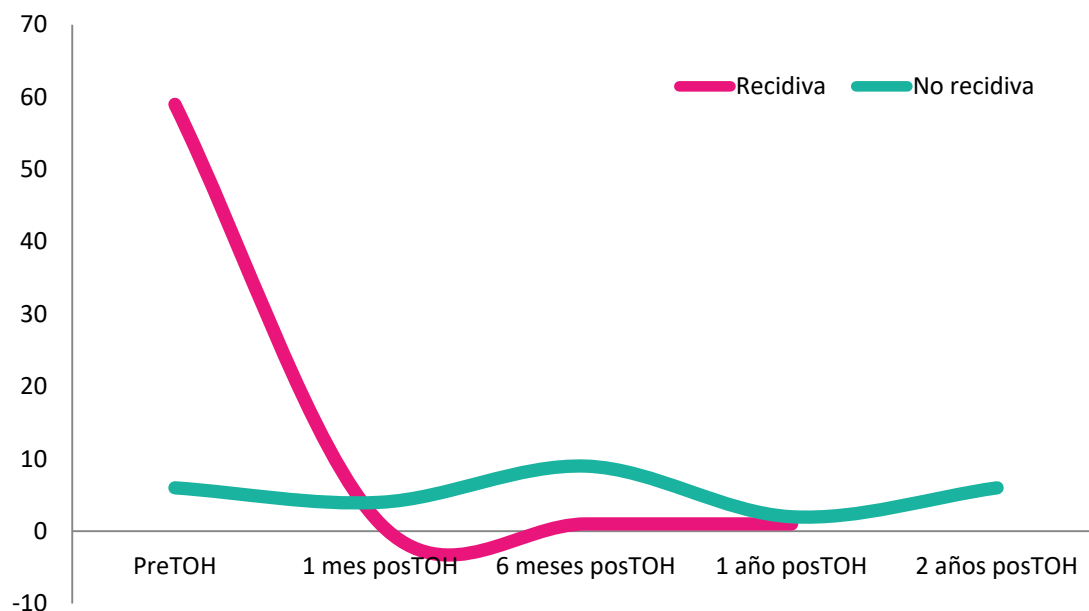


Figura 8. Evolución de los niveles de CTC en los pacientes con y sin recidiva.

En el caso de la AFP se pudo constatar el fenómeno inverso, una tendencia ascendente de los valores medianos de AFP en los pacientes con recidiva. Esta diferencia fue estadísticamente significativa a partir del sexto mes postrasplante. Los resultados se reflejan en la Tabla 26 y la Figura 9.

Tabla 26. Niveles de AFP en los pacientes con y sin recidiva.

Variable	Recidiva (n = 4)	No recidiva (n = 26)	p
AFP preTOH	3 (RI: 2 - 4)	6 (RI: 2 - 18)	0,580
AFP 1 mes	7,5 (RI: 1,3 - 16)	3 (RI: 1 - 4)	0,331
AFP 6 meses	57,5 (RI: 22 - 93)	2 (RI: 2 - 3)	0,047
AFP 1 año	96 (RI: 61 - 131)	2 (RI: 1,5 - 3,5)	0,007
AFP 2 años	295,5 (RI: 198 - 393)	2 (RI: 1 - 2,5)	0,007

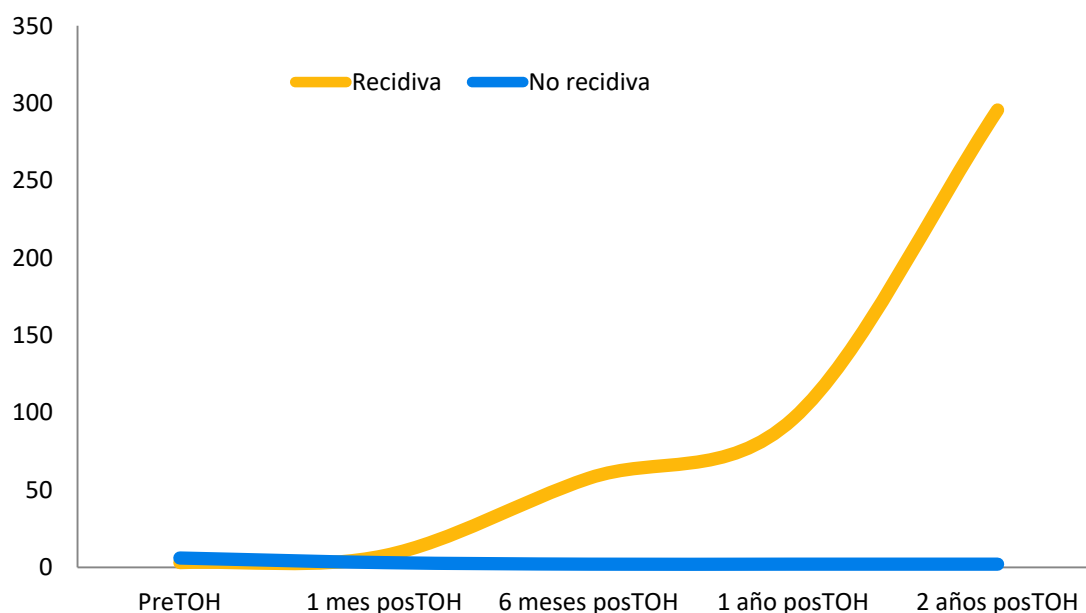


Figura 9. Evolución de los niveles de AFP en los pacientes con y sin recidiva.

Eficacia en la predicción de la recidiva.

El estudio de la eficacia en la predicción de la recidiva después del trasplante se realizó mediante curvas ROC. El mejor punto de corte en cada caso se calculó en base al máximo índice de Youden.

De entre las variables determinadas antes del TOH, se incluyeron en el análisis las consideradas clínicamente relevantes, independientemente de su asociación significativa o no con la recidiva en el análisis previo. De este modo, se eligieron los niveles pretrasplante de CTC y de AFP y la captación en el PET en términos de SUVmax. El mejor predictor de recidiva fue el SUVmax, observando en su caso el mayor área bajo la curva (AUC = 0,837; IC 95% 0,539 - 1; p = 0,033). El punto de corte óptimo se situó en un SUVmax $\geq 3,5$, con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 96,2%. El segundo mejor predictor de recidiva fueron los niveles pretrasplante de CTC y su mejor punto de corte para predecir la reaparición del tumor correspondió a unos niveles de CTC ≥ 9 CTC/10 ml. Por último, los niveles pretrasplante de AFP fueron la variable menos discriminatoria y por tanto, menos eficaz. Los resultados del análisis se expresan en la Tabla 27.

Tabla 27. Capacidad de predicción de recidiva de los niveles pretrasplante de CTC, AFP y SUVmax.

Parámetro	AUC	IC 95%	p	Punto de corte	S (%)	E (%)
SUVmax	0,837	0,539 - 1	0,033	3,5	75	96,2
CTC	0,719	0,535 - 0,902	0,168	9	100	57,7
AFP	0,594	0,248 - 0,940	0,555	22,5	50	83,3

AUC, área bajo la curva; IC, intervalo de confianza; S, sensibilidad; E, especificidad.

Resultados

Las variables postrasplante estudiadas se eligieron entre las que presentaron asociación significativa con la recidiva, siempre y cuando fuesen determinadas en el posoperatorio temprano, es decir, en los 6 primeros meses. De este modo fueron incluidos el tamaño tumoral, la suma de diámetros de tumores viables, la puntuación en los modelos RETREAT y AFP y los niveles de AFP a los 6 meses. Todas ellos presentaron un alto poder discriminativo en las curvas ROC, con áreas bajo la curva superiores a 0,7 en todos los casos y alcanzando la significación estadística. Los resultados del análisis se representan en la Tabla 28.

Tabla 28. Capacidad de predicción de recidiva de las variables postrasplante.

Parámetro	AUC	IC 95%	p	Punto de corte	S (%)	E (%)
RETREAT	0,937	0,846 - 1	0,006	2,5	100	83,3
Suma tamaño	0,823	0,537 - 1	0,042	6,25	75	95,8
AFP 6 meses	0,821	0,549 - 1	0,045	11	75	95,2
AFP model	0,813	0,641 - 0,984	0,049	0,5	100	66,7
Tamaño	0,813	0,288 - 0,691	0,049	4,5	75	95,8

AUC, área bajo la curva; IC, intervalo de confianza; S, sensibilidad; E, especificidad.

4.7. Análisis de supervivencia

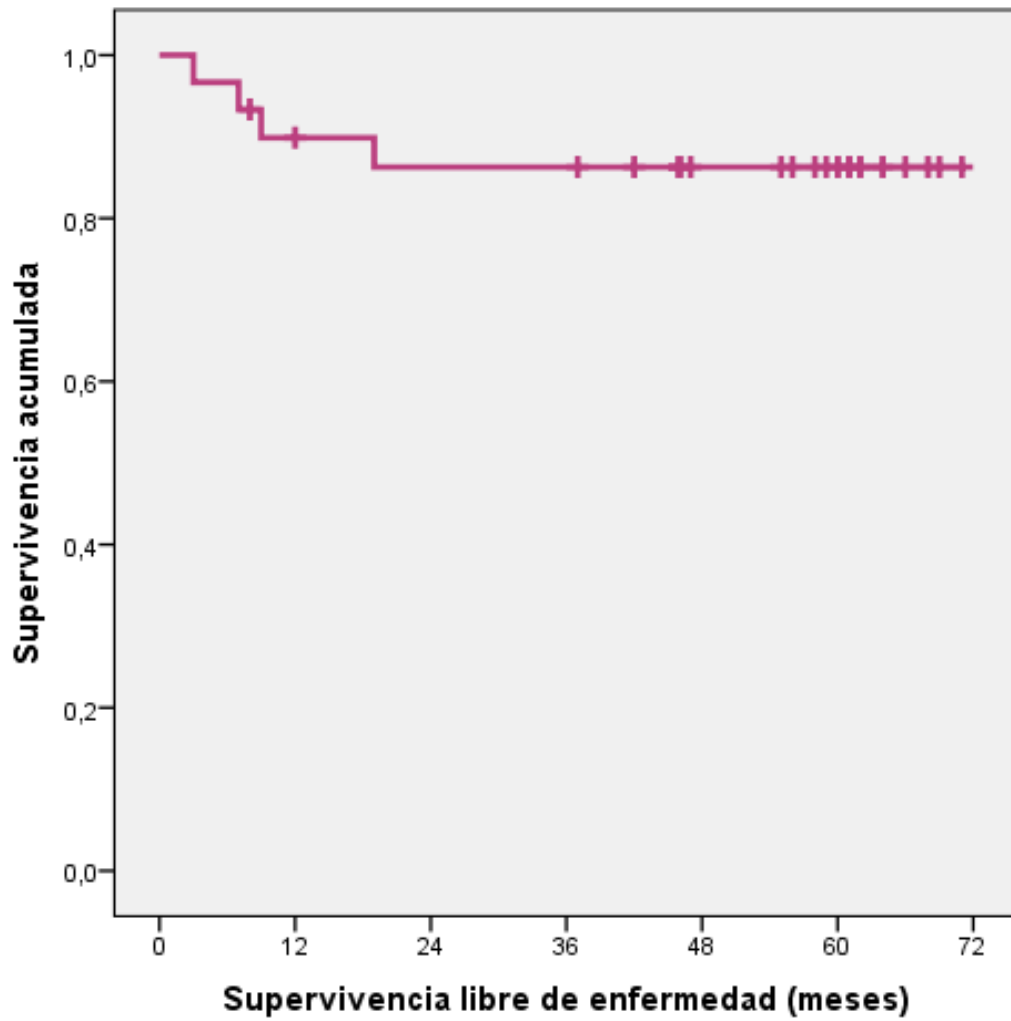
El estudio de la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global se efectuó mediante el método de Kaplan-Meier. Para el conjunto de la serie (n = 30), se estimaron una supervivencia media libre de enfermedad de 62,6 (54,9 - 70,3) meses y una supervivencia media global de 59,4 (51,6 - 67,3) meses. Los porcentajes de supervivencia a 1, 3 y 5 años se expresan en la Tabla 29. En las figuras 10 y 11 se representan gráficamente sendas curvas de supervivencia.

Además, se realizó una comparación mediante la prueba log-rank de las curvas de supervivencia en función de los niveles pretrasplante de CTC y de AFP y la captación en el PET (SUVmax). El punto de corte en cada caso se estableció en base a los resultados del análisis de las curvas ROC expuesto en el apartado anterior. Para cada variable se establecieron dos grupos, uno constituido por los pacientes con valores iguales o superiores al punto de corte de esa variable y otro con los pacientes con valores menores al punto de corte.

Tabla 29. Supervivencia libre de enfermedad y global de los 30 pacientes estudiados.

Supervivencia	1 año	3 años	5 años
SLE	89,9%	86,3%	86,3%
SG	90%	80%	75,6%

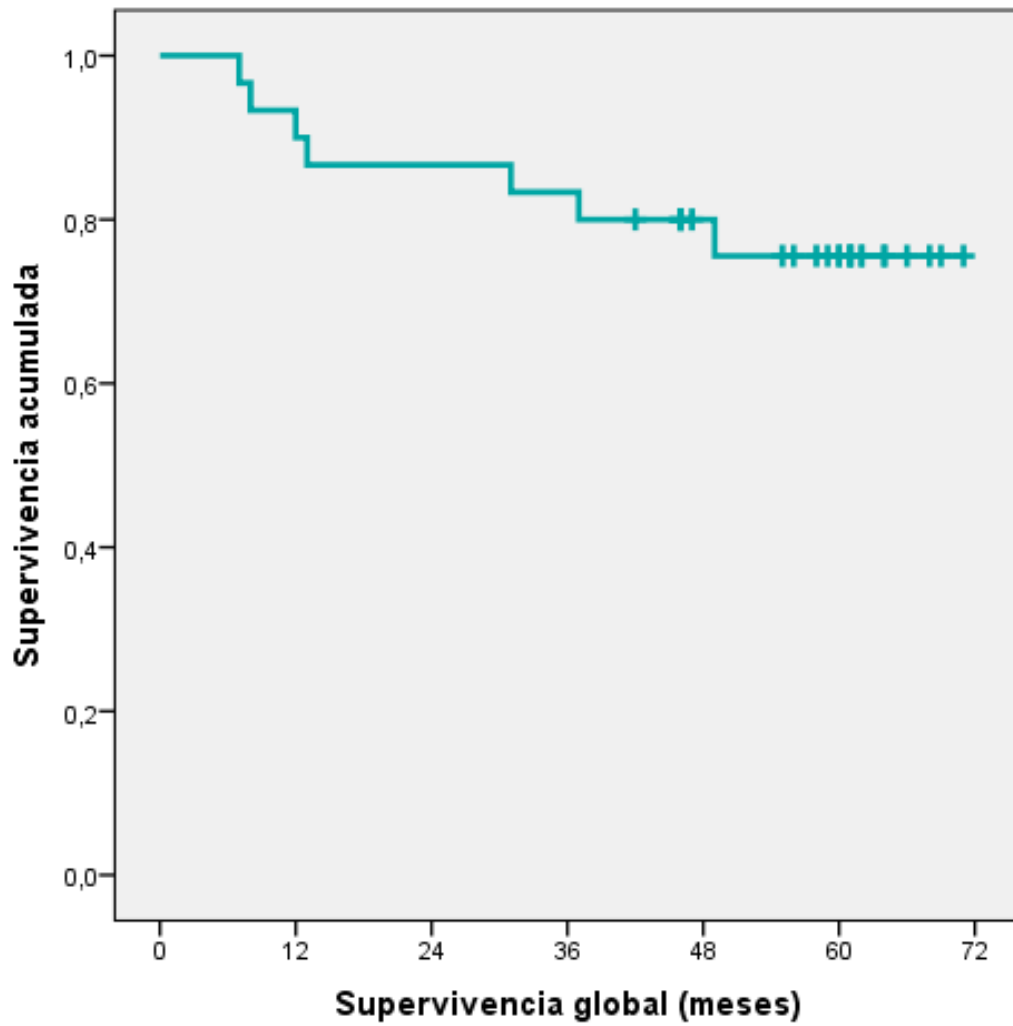
SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global.



Número de pacientes expuestos al riesgo

SLE	30	27	26	25	18	12	0
-----	----	----	----	----	----	----	---

Figura 10. Curva de supervivencia libre de enfermedad de los 30 pacientes estudiados. SLE, supervivencia libre de enfermedad.



Número de pacientes expuestos al riesgo

SG 30 25 23 23 16 12 0

Figura 11. Curva de supervivencia global de los 30 pacientes estudiados. SG, supervivencia global.

Análisis de supervivencia en función del PET

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en función del PET se realizó por un lado en base al resultado positivo o negativo en la prueba y por el otro según el valor SUVmax = 3,5 como punto de corte.

En el análisis en función de un resultado positivo o negativo, el grupo con captación patológica lo integraron 10 pacientes, de los que 3 recidivaron y 3 fallecieron (los mismos); el grupo con PET negativo lo conformaron los 20 pacientes restantes, entre los que uno recidivó y 4 fallecieron.

En el caso del análisis de supervivencia según el SUVmax, un grupo lo constituyeron los pacientes con valores iguales o superiores a SUVmax = 3,5 (5 pacientes) y otro grupo con pacientes con valores inferiores (25 pacientes). De los 5 pacientes con un SUVmax \geq 3,5, 3 presentaron recidiva por tan solo un caso en el grupo con menor captación. En cuanto a los fallecimientos, 3 tuvieron lugar en el grupo de mayor captación (los tres pacientes que habían recidivado) y 4 en el otro grupo.

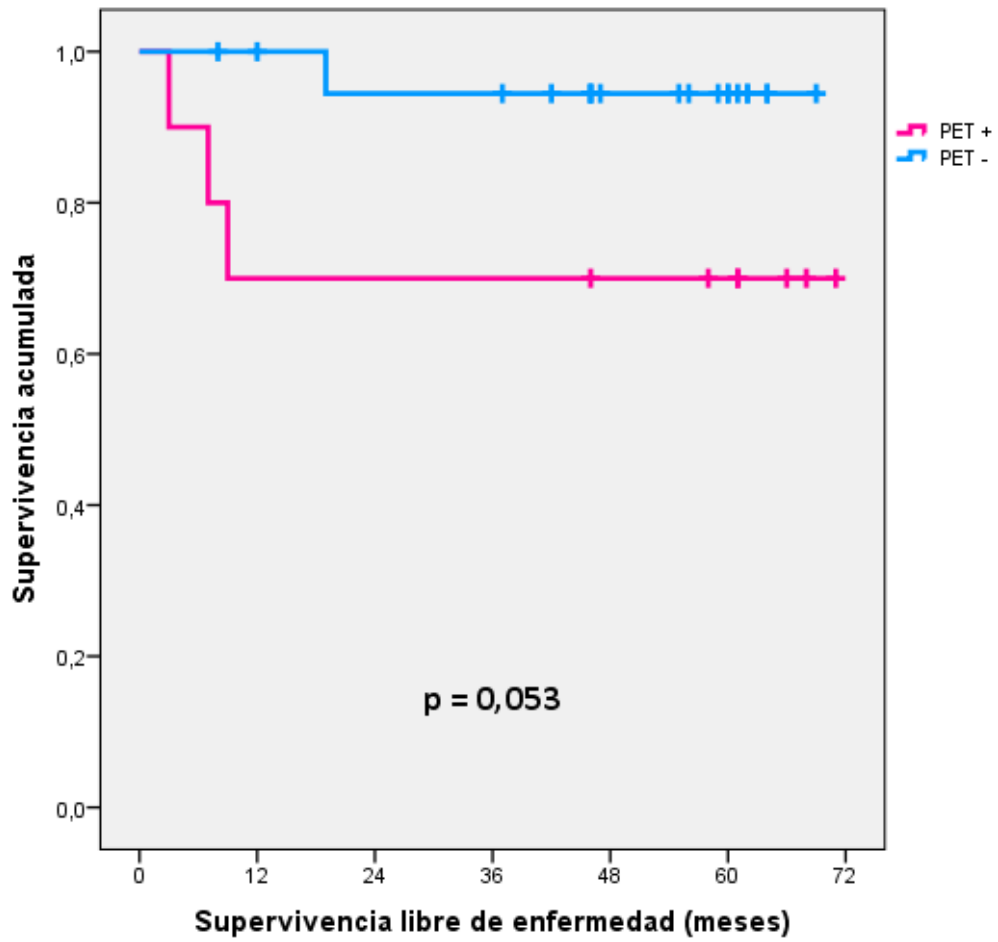
Con la prueba log-rank se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tanto en la SLE como en la SG de los pacientes que habían presentado un SUVmax mayor o igual a 3,5 respecto a los que no. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en la SLE ni en la SG cuando el análisis se efectuó según el resultado positivo o negativo en el PET. La SLE y SG a 1, 3 y 5 años en cada caso se representan en las tablas 30 y 31. Las curvas de SLE y SG pueden verse en las figuras 12 a 15.

Tabla 30. Supervivencia libre de enfermedad y global en función del PET positivo o negativo.

SLE	PET positivo (n = 10)	PET negativo (n = 20)	Log-rank
1 año	70%	100%	3,7; p = 0,053
3 años	70%	94,4%	
5 años	70%	94,4%	
SG	PET positivo (n = 10)	PET negativo (n = 20)	Log-rank
1 año	90%	90%	0,3; p = 0,582
3 años	80%	85%	
5 años	68,6%	80%	

Tabla 31. Supervivencia libre de enfermedad y global en función de SUVmax mayor o menor a 3,5.

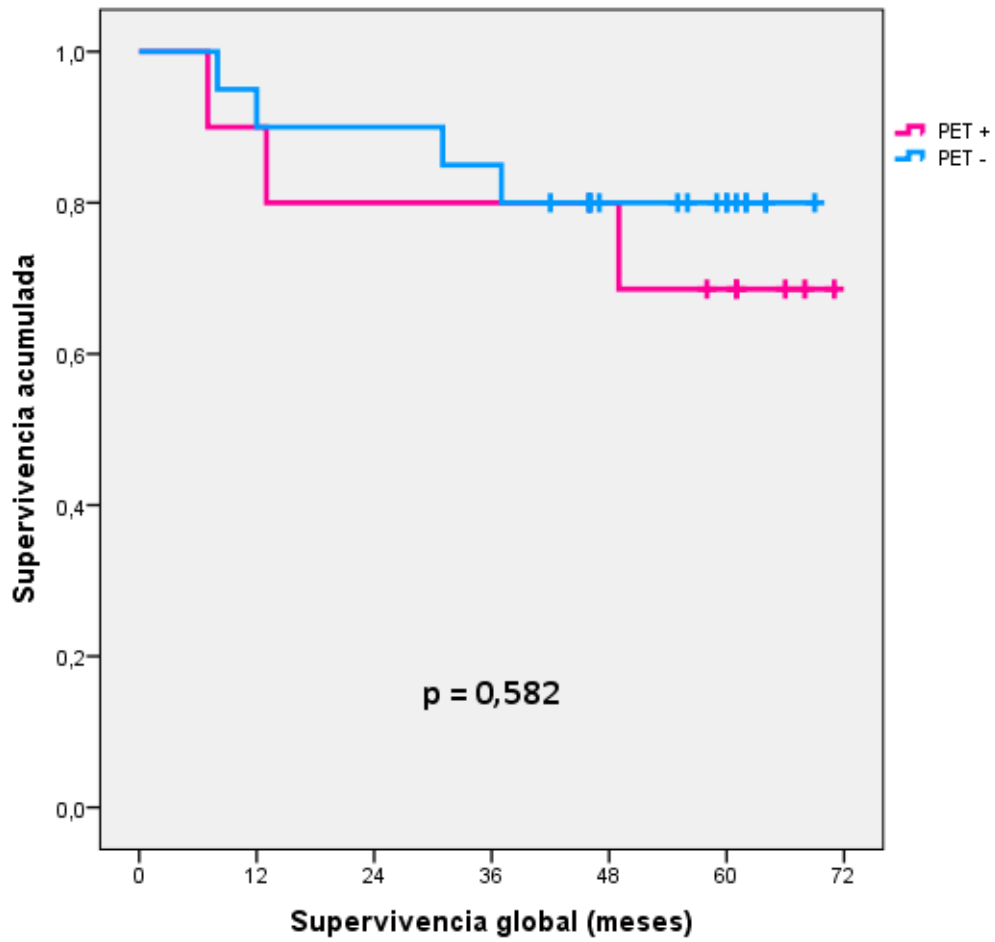
SLE	PET-SUVmax \geq 3,5 (n = 5)	PET-SUVmax < 3,5 (n = 25)	Log-rank
1 año	40%	100%	14,6; p < 0,001
3 años	40%	95,7%	
5 años	40%	95,7%	
SG	PET-SUVmax \geq 3,5 (n = 5)	PET-SUVmax < 3,5 (n = 25)	Log-rank
1 año	80%	92%	4,7; p = 0,030
3 años	60%	88%	
5 años	40%	84%	



Número de pacientes expuestos al riesgo

PET +	10	7	7	7	6	5	0
PET -	20	18	17	17	11	7	0

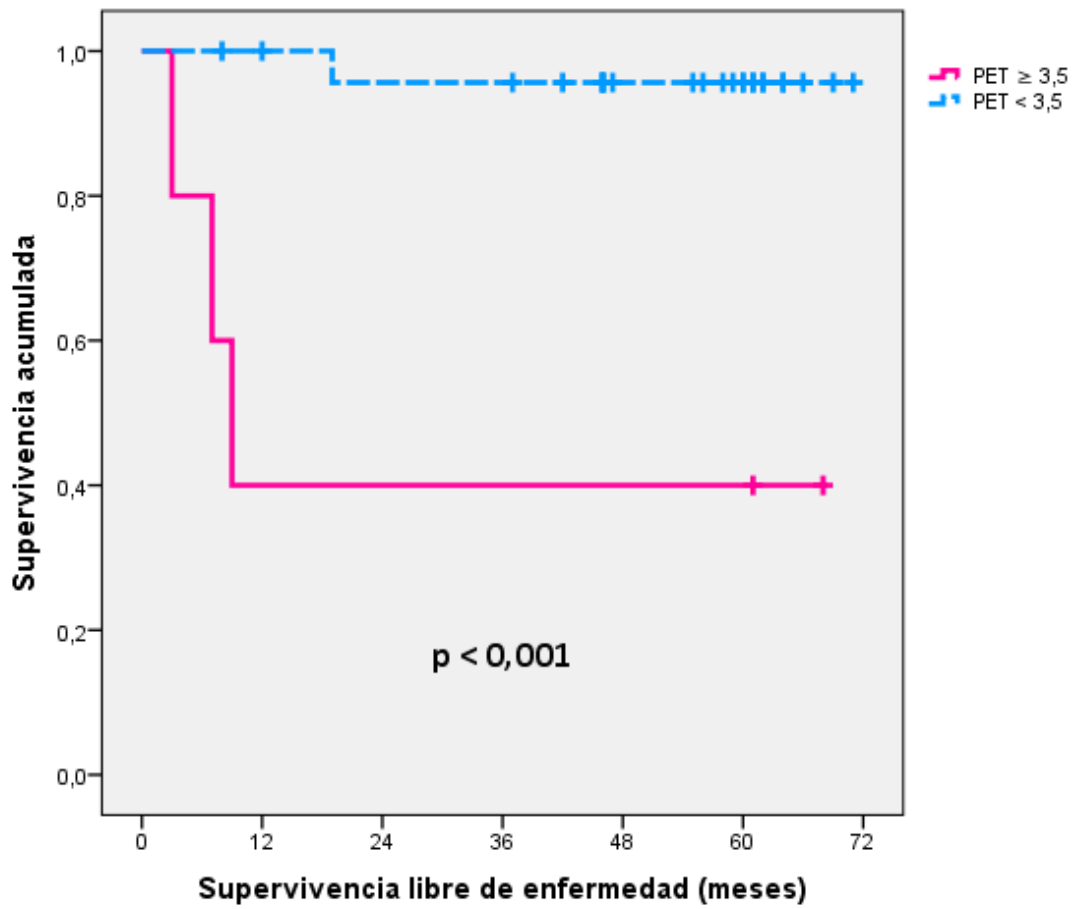
Figura 12. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con PET positivo o negativo.



Número de pacientes expuestos al riesgo

PET +	10	9	8	8	7	5	0
PET -	20	18	18	17	11	7	0

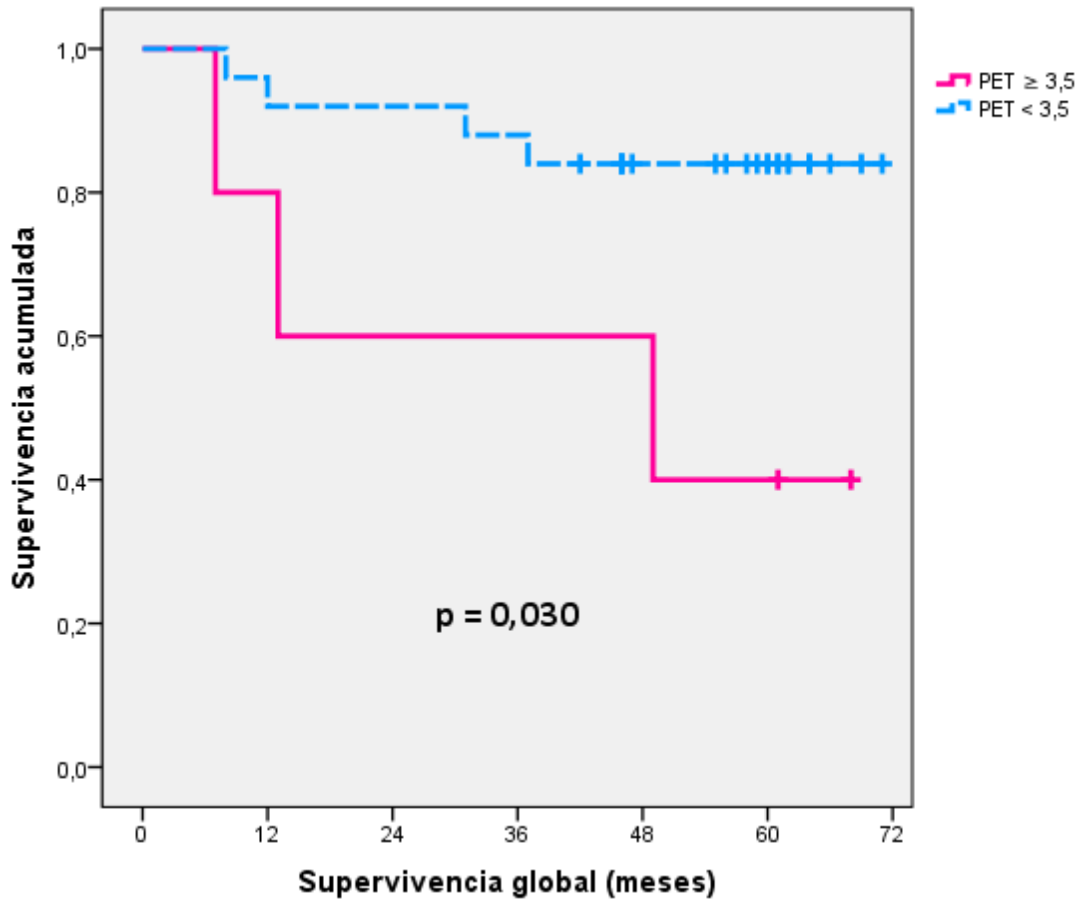
Figura 13. Supervivencia global en pacientes con PET positivo o negativo.



Número de pacientes expuestos al riesgo

PET ≥ 3,5	5	2	2	2	2	1	0
PET < 3,5	25	23	22	21	14	9	0

Figura 14. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con SUVmax mayor o igual a 3,5 o menor a 3,5.



Número de pacientes expuestos al riesgo

PET ≥ 3,5	5	4	3	3	2	1	0
PET < 3,5	25	24	22	21	14	10	0

Figura 15. Supervivencia global en pacientes con SUVmax mayor o igual a 3,5 o menor a 3,5.

Análisis de supervivencia en función de los niveles pretrasplante de CTC

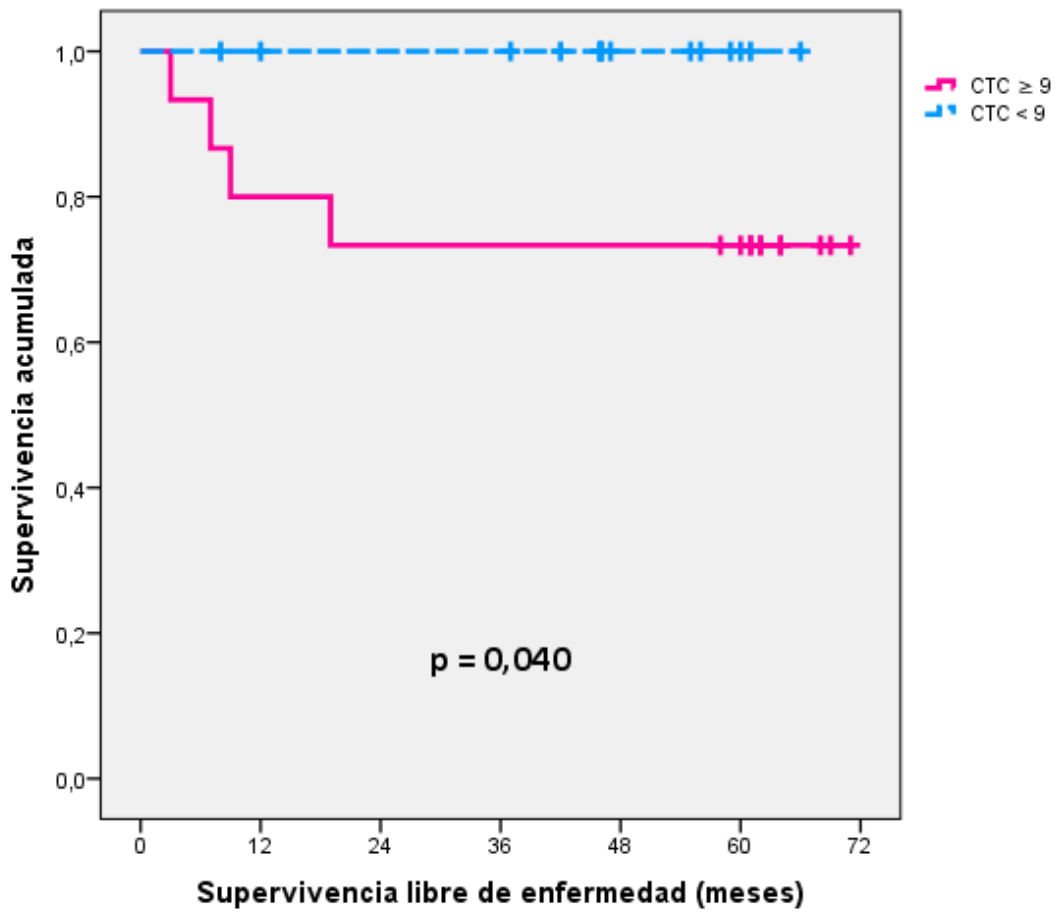
En el caso de los niveles pretrasplante de CTC, el punto de corte elegido fue 9 CTC/10 ml, obteniendo de esta forma dos grupos de 15 pacientes. Todos los casos de recidiva se encontraron en el grupo con niveles más elevados de CTC que, además, fueron los 4 pacientes que fallecieron en dicho grupo por los 3 fallecidos en el grupo con niveles más bajos.

Mediante la prueba de log-rank, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la SLE entre los pacientes con niveles pretrasplante de CTC iguales o superiores a 9 CTC/10 ml respecto a los que presentaron niveles inferiores. Por el contrario, no se apreciaron diferencias en cuanto a supervivencia global.

La SLE y SG a 1, 3 y 5 años en cada grupo puede verse en la Tabla 32. Las curvas de SLE y SG se ilustran en las figuras 16 y 17.

Tabla 32. Supervivencia libre de enfermedad y global en función de los niveles pretrasplante de CTC.

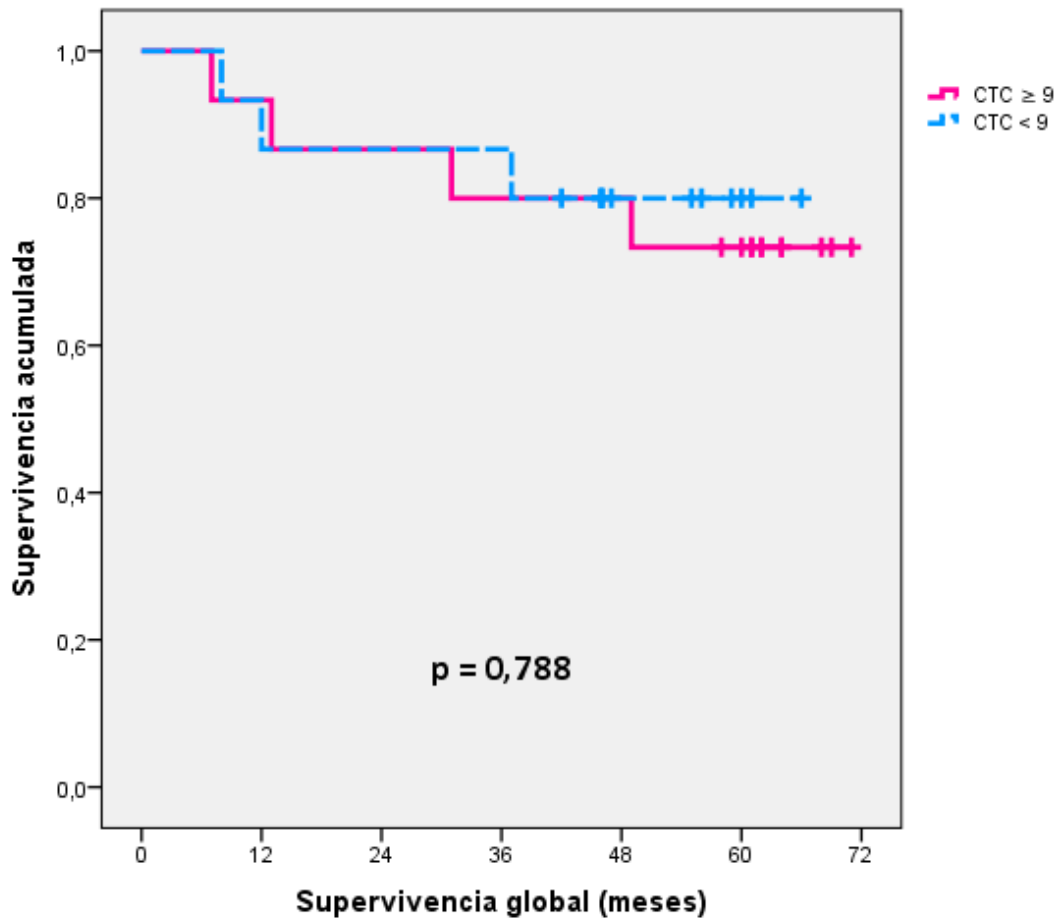
SLE	CTC ≥ 9 (n = 15)	CTC < 9 (n = 15)	Log-rank
1 año	80%	100%	4,2; p = 0,040
3 años	73,3%	100%	
5 años	73,3%	100%	
SG	CTC ≥ 9 (n = 15)	CTC < 9 (n = 15)	Log-rank
1 año	93,3%	86,7%	0,072; p = 0,788
3 años	80%	80%	
5 años	73,3%	80%	



Número de pacientes expuestos al riesgo

CTC ≥ 9	15	12	10	10	10	9	0
CTC < 9	15	13	12	12	6	2	0

Figura 16. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con CTC ≥ 9 y CTC < 9.



Número de pacientes expuestos al riesgo

CTC ≥ 9	15	13	12	11	10	9	0
CTC < 9	15	13	13	12	5	2	0

Figura 17. Supervivencia global en pacientes con CTC ≥ 9 y CTC < 9.

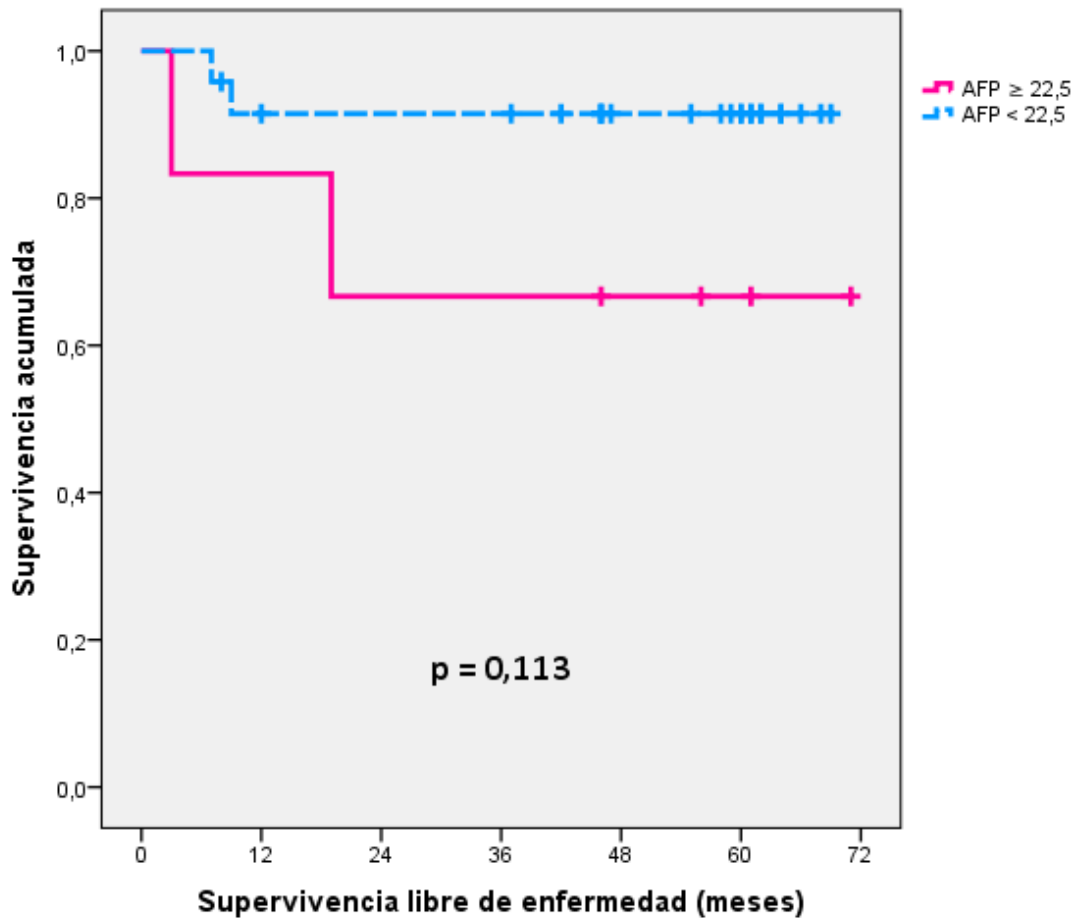
Análisis de supervivencia en función de los niveles pretrasplante de AFP

Para el análisis de supervivencia en función de los niveles pretrasplante de AFP se establecieron dos grupos: por un lado 6 pacientes con niveles iguales o superiores a 22,5 ng/ml y por otro, 24 pacientes con niveles menores a esa cantidad. Los casos de recidiva fueron los mismos en cada grupo (2 casos en cada uno). De los pacientes que fallecieron, 2 pertenecían al grupo con AFP \geq 22,5 (los pacientes que recayeron) y los otros 5, al grupo con niveles de AFP menores a 22,5.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prueba log-rank en la SLE ni en la SG. Los resultados del análisis y las curvas de supervivencia se manifiestan en la Tabla 33 y las figuras 18 y 19 respectivamente.

Tabla 33. Supervivencia libre de enfermedad y global en función de los niveles pretrasplante de AFP.

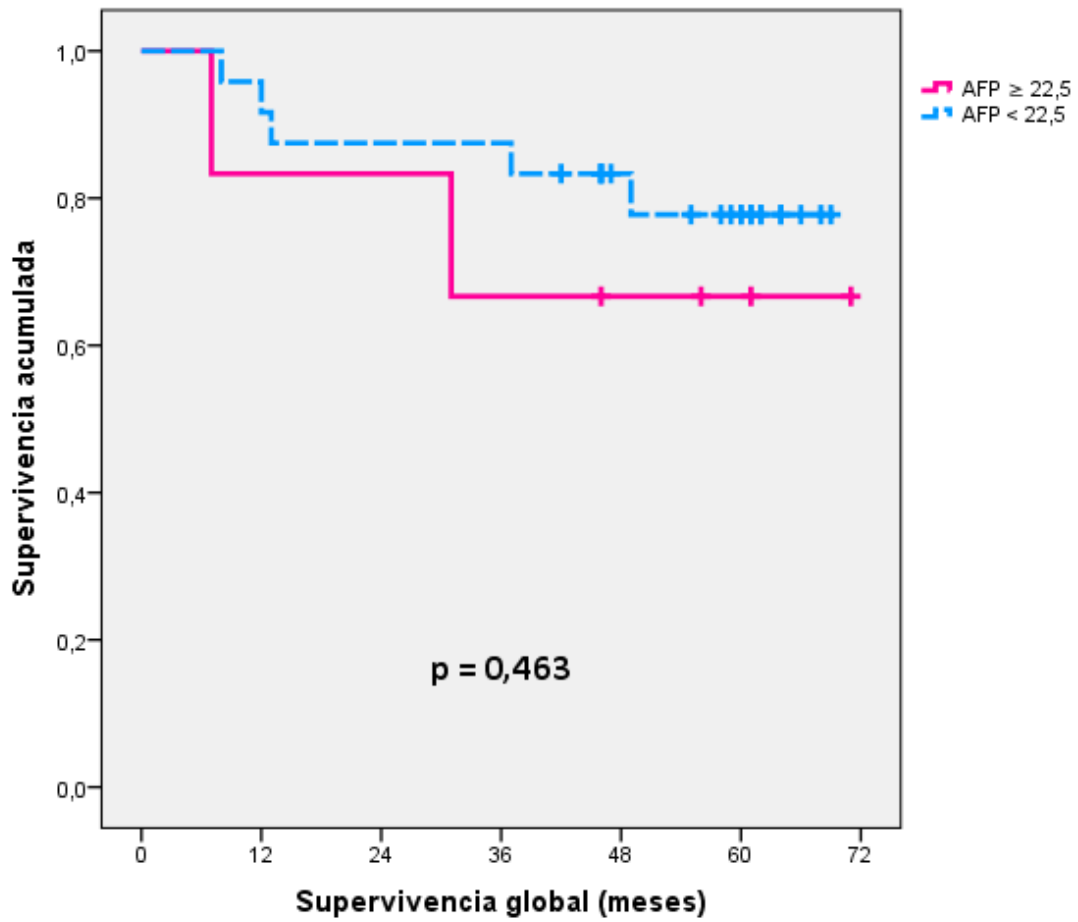
SLE	AFP \geq 22,5 (n = 6)	AFP < 22,5 (n = 24)	Log-rank
1 año	83,3%	91,5%	2,5; p = 0,113
3 años	66,7%	91,5%	
5 años	66,7%	91,5%	
SG	AFP \geq 22,5 (n = 6)	AFP < 22,5 (n = 24)	Log-rank
1 año	83,3%	91,7%	0,539; p = 0,463
3 años	66,7%	87,5%	
5 años	66,7%	77,8%	



Número de pacientes expuestos al riesgo

AFP ≥ 22,5	6	5	4	4	3	2	0
AFP < 22,5	24	20	20	20	13	10	0

Figura 18. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con AFP ≥ 22 y AFP < 22.



Número de pacientes expuestos al riesgo

AFP ≥ 22,5	6	5	5	4	3	2	0
AFP < 22,5	24	22	21	21	15	9	0

Figura 19. Supervivencia global en pacientes con AFP ≥ 22 y AFP < 22.

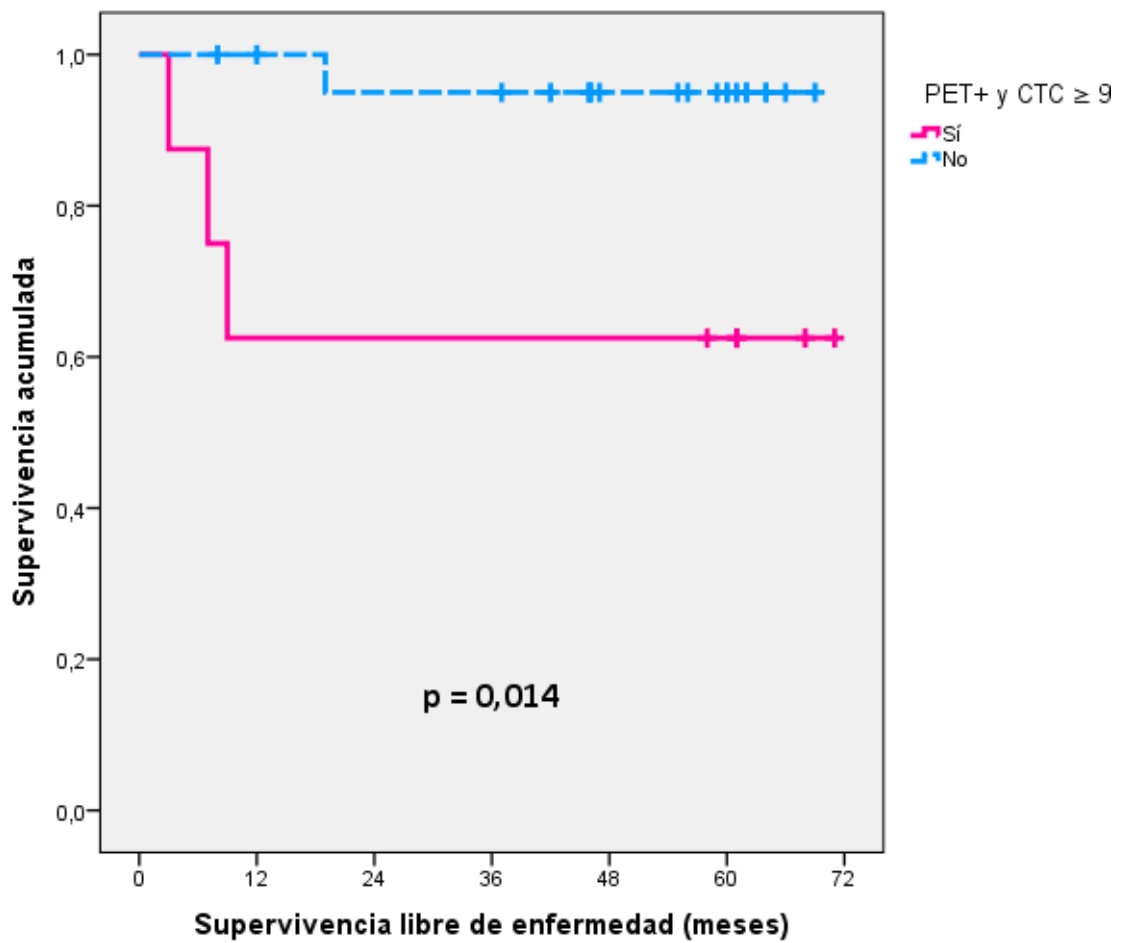
Análisis de supervivencia en función de la combinación de los niveles pretrasplante de CTC y el resultado en el PET-TC

Por último, se llevó a cabo un análisis de supervivencia combinando el resultado del PET-TC y los niveles pretrasplante de CTC. Un grupo lo compusieron los pacientes con un resultado positivo en el PET y al menos 9 CTC en la biopsia líquida ($n = 8$) y el otro grupo lo formaron el resto de pacientes ($n = 22$). La recidiva se presentó en 3 casos del primer grupo y un caso del segundo grupo.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prueba log-rank en la SLE. Los resultados del análisis y las curvas de supervivencia se manifiestan en la Tabla 34 y las figuras 20 y 21 respectivamente.

Tabla 34. Supervivencia libre de enfermedad y global en pacientes con PET positivo y CTC mayor o igual a 9 y los que no.

SLE	PET positivo + CTC ≥ 9		Log-rank
	Sí ($n = 8$)	No ($n = 22$)	
1 año	62,5%	100%	6,0; $p = 0,014$
3 años	62,5%	95%	
5 años	62,5%	95%	
SG	Sí ($n = 8$)	No ($n = 22$)	Log-rank
1 año	87,5%	95,5%	1,0; $p = 0,309$
3 años	75%	86,4%	
5 años	62,5%	81,8%	

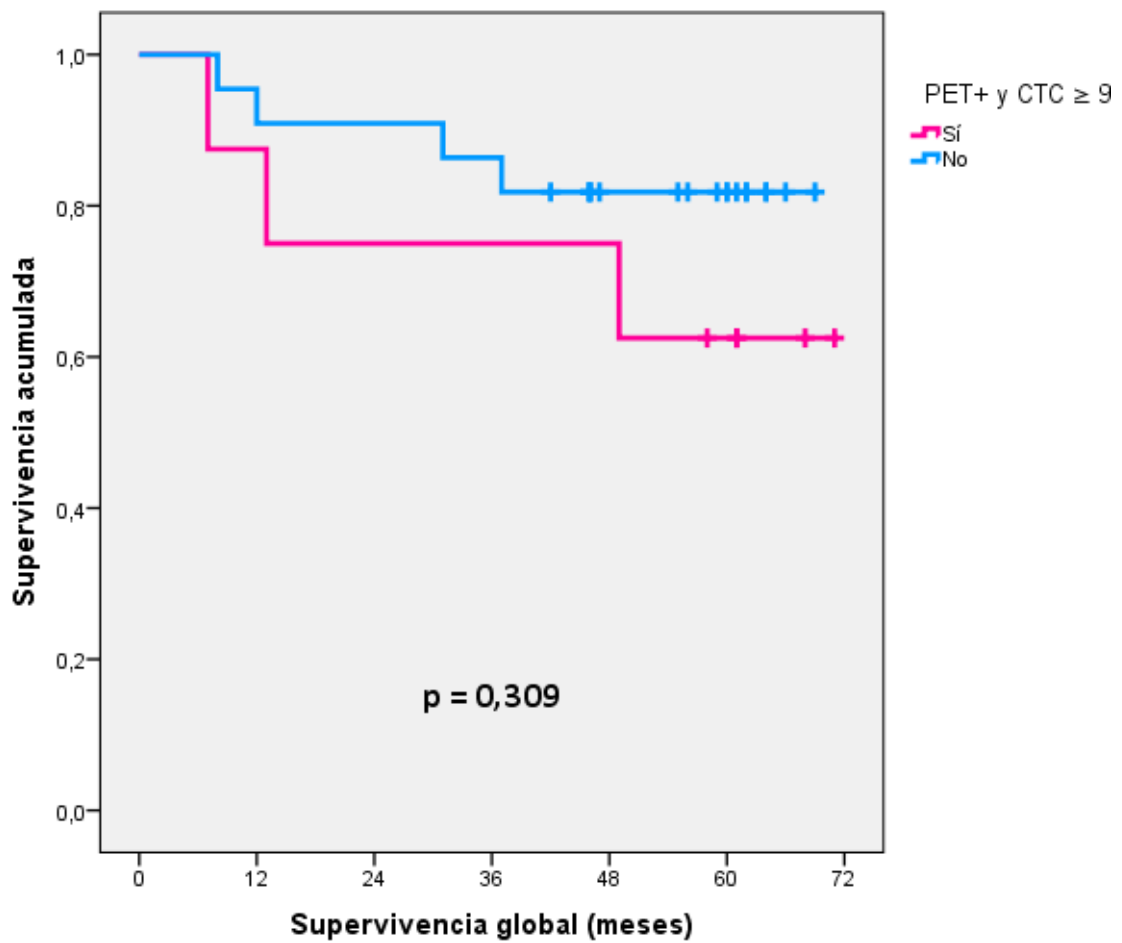


Número de pacientes expuestos al riesgo

PET positivo + CTC \geq 9

Sí	8	5	5	5	5	3	0
No	22	20	20	18	11	8	0

Figura 20. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con PET positivo y CTC mayor o igual a 9 y los que no.



Número de pacientes expuestos al riesgo

PET positivo + CTC ≥ 9

Sí	8	7	6	6	6	4	0
No	22	20	20	19	12	7	0

Figura 21. Supervivencia global en pacientes con PET positivo y CTC mayor o igual a 9 y los que no.

5. DISCUSIÓN

El TOH sigue considerándose hoy en día el tratamiento de elección en pacientes con CHC y hepatopatía crónica cuidadosamente seleccionados. Sin embargo, el método de selección se sustenta fundamentalmente en criterios morfológicos basados en las pruebas de imagen. Considerar únicamente el tamaño y número de nódulos en un momento puntual de la historia natural de la enfermedad sin tener en cuenta otros factores biológicos, como el grado de diferenciación, biomarcadores o los hallazgos en el PET-TC, puede excluir del TOH a pacientes que en realidad podrían beneficiarse del mismo.

Características de los pacientes

El CHC es un tumor que se asienta habitualmente sobre una hepatopatía crónica avanzada (cirrosis) (12). En España, el principal factor de riesgo asociado a la aparición de CHC es la infección crónica por VHC (11,15). En esta serie de 30 pacientes cirróticos, el VHC estuvo presente en el 60% de los casos (de los que un tercio presentaba una cirrosis mixta por VHC y alcohol). La mayoría de pacientes fueron varones (90%), lo que refleja la mayor incidencia de este tumor en el sexo masculino, y con una mediana de edad de 57 años (RI: 54 - 62), década de la vida en la que se ha descrito su mayor incidencia (12). La mayor parte de los pacientes presentaron una cirrosis en estadios iniciales, que se traduce en un predominio de CHILD A (63,3% de los pacientes) y puntuaciones MELD bajas (hay que recordar que, según los criterios BCLC el trasplante no es la primera opción terapéutica en los CHC con cirrosis avanzada).

La gran mayoría de pacientes se sometió al menos a una sesión de quimioembolización (TACE) como terapia puente hasta el trasplante, lo que ha sido descrito como una estrategia válida a la hora de prevenir la progresión tumoral mientras el paciente aguarda un hígado. En el centro en el que se realizó el estudio, la terapia puente es una estrategia habitual para minimizar el impacto de la progresión tumoral cuando se alarga el tiempo en lista de espera. En este caso, la mediana del tiempo en lista de espera de la serie fue de 186 días (algo más de 6 meses), motivo por el que casi el 90% de los pacientes recibieron al menos una sesión de quimioembolización. Esta estrategia cuenta con el respaldo de las guías españolas, en las que se aceptan los tratamientos locorregionales, como la quimioembolización, a modo de tratamiento previo al trasplante cuando se prevé un tiempo de espera superior a 6 meses. Los pacientes con menos tiempo en lista de espera no llegaron a recibir ninguna sesión.

El estudio histológico del hígado explantado reveló un tamaño tumoral mediano de 2 cm, con una suma del diámetro de los tumores viables de 3 cm y una mediana de 1 tumor por paciente. Estos resultados entran dentro de lo esperable, ya que los 30 pacientes incluidos en el estudio cumplían los criterios de Milán, lo que equivaldría a los estadios I y II de la clasificación TNM y los estadios iniciales de la BCLC. En cuanto a la agresividad de los tumores según el grado de diferenciación de Edmonson Steiner, predominó el grado 2 (43,3%), seguido del grado 1 (20%). Además, se evidenció una necrosis completa del tumor en 9 casos, lo que quiere decir que en más de un tercio de los pacientes que recibieron al menos una sesión de quimioembolización (34,6%), la respuesta fue excelente. Esta cifra es similar a la observada en este centro en trabajos previos (332) y a los resultados comunicados por otros grupos (333,334). La invasión microvascular estuvo presente en 3 casos (10%). Los resultados del análisis histológico muestran una concordancia adecuada con los criterios de Milán, no encontrando tumores más avanzados de lo estimado con las pruebas preoperatorias. Se puede afirmar que, al menos en los pacientes de esta serie, no existió una infraestadificación que pudiera influir en la supervivencia libre de enfermedad.

Los criterios de selección basados únicamente en características morfológicas han sido criticados por diversas razones. Se basan únicamente en el tamaño y número de tumores en un momento concreto y no tienen en cuenta otros factores relacionados con el comportamiento del tumor, como el grado de diferenciación tumoral, los biomarcadores moleculares, la captación en el PET-TC y la respuesta a la terapia puente. Además, los parámetros de imagen empleados a menudo no son consistentes: se ha observado hasta un 40% de pacientes que, cumpliendo los criterios de Milán, presentan tumores más avanzados (fuera de los criterios de Milán) en el análisis histopatológico del hígado y la situación opuesta, hasta un 34% de pacientes más allá de los criterios de Milán que sí se cumplen en el análisis (4). Sotiropoulos et al (335), encontraron que la precisión en la interpretación de las pruebas de imagen empleadas en los criterios de Milán no superaba el 60%, lo que pone de manifiesto la regular correlación entre la estadificación radiológica y patológica.

En definitiva, el carácter restrictivo de estos criterios excluye a numerosos pacientes que, de otro modo, se habrían beneficiado del TOH con un bajo riesgo de recurrencia del CHC. Esto ha impulsado la elaboración de nuevos criterios que incluyan el uso del PET-TC y biomarcadores como la AFP o, conforme a lo propuesto en este trabajo, las células tumorales circulantes.

Pacientes con recidiva

El método de selección de pacientes para TOH se sustenta fundamentalmente en los resultados de las pruebas de imagen y no siempre se correlaciona con precisión con las características definitivas del tumor, obtenidas tras el análisis del hígado enfermo. Además, tampoco tiene en cuenta parámetros que informen de la actividad tumoral en cada momento. Es posible que estos factores expliquen por qué la tasa de recurrencia postrasplante sigue siendo elevada y uno de los principales condicionantes para la supervivencia a largo plazo. Entre el 10 y 20% de los pacientes sufrirá recidiva postrasplante, lo que se asocia con un peor pronóstico (111,135,136). Aproximadamente el 75% de las recidivas tienen lugar durante los primeros dos años postrasplante y solo el 10% aparecen más allá del cuarto año (136). La recidiva se considera una enfermedad sistémica ya que suele afectar a múltiples órganos (pulmón, hígado, hueso, ganglios linfáticos y glándula suprarrenal sobre todo) (136,139). La supervivencia tras la recaída oscila entre los 7 y 16 meses (136,137). Los pacientes con CHC que son tratados mediante TOH presentan una SG del 75-85% y una SLE de 80-90% a 5 años (132-134). En la serie que concierne este trabajo se obtuvieron resultados similares a 5 años con una SG de 75,6% y SLE de 86,3%.

En esta serie y con el fin de detectar todos los casos de recidiva que se pudieran presentar, se realizó un seguimiento de los pacientes durante un periodo de tiempo largo, de al menos 4 años; sobrepasando los 5 años en casi la mitad del grupo. En el transcurso de este periodo, 4 pacientes fueron diagnosticados de recidiva. Este porcentaje (13,3%), es similar al descrito en la literatura (111,135,136). La reaparición de la enfermedad tuvo lugar durante el primer año postrasplante en 3 pacientes mientras que en el cuarto se diagnosticó durante el segundo año. En todos ellos afectó a varios órganos lo que, como se ha apuntado, es *modus operandi* habitual de los tumores que reaparecen.

Atendiendo a todo lo comentado hasta ahora, cabe esperar que en esta serie los pacientes que sufren recidiva presenten características que sugieran de entrada un peor pronóstico (criterios morfológicos, invasión microvascular, etc), si bien la pequeña muestra estudiada hace que el análisis y las conclusiones obtenidas de este trabajo se adopten con cautela. Independientemente de la significación estadística alcanzada, los pacientes con recaída tumoral presentaron tumores más agresivos desde el punto de vista morfológico, es decir, tumores de mayor tamaño y mayor sumatorio de su diámetro ($p < 0,05$ en ambos casos) y mayor número de lesiones. La invasión microvascular también fue más frecuente en estos

cuatro pacientes (50% vs 3,8%, $p = 0,039$). En lo que respecta al grado de diferenciación, aunque no se encontraron diferencias significativas, es reseñable que el 75% de los pacientes con recidiva presentaron tumores con un grado de diferenciación mayor o igual a 2 según la clasificación de Edmonson-Steiner, mientras que en el otro grupo fueron menos de la mitad (46,1%). Estos resultados son esperables, puesto que la relación entre los factores citados y la recidiva es de sobra conocida.

Otro de los pilares fundamentales de este estudio es el análisis del PET-TC en el pronóstico de los pacientes. El 75% de los pacientes con recidiva presentó una captación patológica en el PET-TC (positivo), porcentaje que se redujo al 26,9% en los pacientes libres de enfermedad. Aunque esta diferencia observada no alcanzó la significación estadística, es un indicador de la relevancia de esta prueba en la predicción de la recurrencia, algo ya señalado por otros grupos con anterioridad (51). Además, la cuantificación de esta captación en términos de SUVmax también reveló que los pacientes con recidiva asociaron valores más elevados. Al fin y al cabo, estos pacientes presentan tumores más agresivos desde un punto de vista morfológico e histológico, lo que se traduce en resultados patológicos en el PET-TC. De estos resultados se desprende que el PET-TC tiene relación con la reaparición de la enfermedad.

Otra de las bases de este trabajo, junto con el estudio de las características morfológicas e histológicas y la captación en el PET, ha sido la determinación de los niveles de AFP y CTC.

AFP es un marcador ampliamente utilizado en el manejo de los pacientes con CHC. Sin embargo, ateniéndonos a la presente serie, el papel que desempeña como marcador pronóstico es discreto y no observamos una asociación con la recidiva. Más interesante resulta el análisis de sus determinaciones seriadas durante el seguimiento, donde se pudo observar un ascenso significativo entre los pacientes que presentaron recaída, mientras que los pacientes libres de enfermedad presentaron unos niveles de AFP estables durante el seguimiento. Otros grupos ya han propuesto con antelación que la elevación de 15-50 ng/ml al mes o 0,1 ng/ml al día asocia un mayor riesgo de recidiva (73–76).

¿Por qué un porcentaje no desdeñable de enfermos presenta recidiva postrasplante? Para intentar responder a esta cuestión hay que tener presente que se parte de pacientes en los que, *a priori*, se ha extirpado completamente el tumor y además el hígado enfermo ha sido sustituido por uno sano. Si se asume que la estadificación preoperatoria ha sido correcta, la reaparición de la enfermedad tanto en el injerto como en otros órganos puede atribuirse a la

presencia de células tumorales extrahepáticas ya existentes desde antes del TOH como CTC o acantonadas en otros tejidos. Esta hipótesis se sustenta en trabajos como el de Fan et al (310), y Schulze et al (305). Nuestra serie cumple esta premisa ya que, en base al informe patológico del hígado explantado, se puede afirmar que verdaderamente los pacientes cumplían los criterios de Milán, por lo que en los casos con recidiva, habría que decantarse por la teoría de las CTC.

De todas las determinaciones de CTC que se realizan durante el seguimiento de un paciente con cáncer, la cuantificación previa a la intervención es la que presenta un mayor valor predictivo de recurrencia (mejor que los niveles de CTC tras la cirugía) (336). Sin embargo, en este trabajo no se ha podido constatar este hecho ya que, si bien los niveles de CTC preTOH sí se han asociado a otros factores predictores de recurrencia y aparecen más elevados en este subgrupo de pacientes, no se ha establecido una relación significativa con la reaparición de la enfermedad. A pesar de no obtener diferencias estadísticamente significativas, sí parece existir una tendencia a presentar niveles preTOH superiores en aquellos pacientes que posteriormente sufren recidiva, como se puede apreciar en la Figura 7. Sin embargo, y dado que el tamaño muestral es muy pequeño, no se puede establecer una relación entre los niveles de CTC y la progresión de la enfermedad. La asociación entre los niveles de CTC y la reaparición del cáncer sí ha sido descrita en otros trabajos previos. En un estudio prospectivo, Fan et al (337) describieron una asociación entre los niveles de CTC y la recidiva local tras la resección quirúrgica. En otro trabajo posterior, Zhou et al (321), también establecieron una asociación entre la concentración preoperatoria de CTC EpCAM+ y la recurrencia tras la cirugía hepática. Esta asociación también podría existir en pacientes con CHC tratados mediante TOH, aunque la evidencia que lo sustenta es baja. Chen et al (330) observaron que la SLE al año era significativamente inferior en los pacientes en los que se habían detectado CTC pretrasplante.

En dos de los pacientes se detectaron unos niveles de CTC al mes por encima de 1.000 CTC/10 ml. Uno de ellos presentó a los 9 meses del TOH recidiva tumoral en varias localizaciones (hígado, pulmón y hueso) y falleció al cabo de 50 meses. En el análisis microscópico del hígado explantado se detectó invasión microvascular. Sin embargo, el otro paciente, a pesar de presentar unos niveles de CTC postTOH elevados, se encuentra actualmente libre de enfermedad, asintomático y con un descenso en los niveles de CTC hasta la detección de una única célula al año. La dispar evolución de sendos casos apoyaría, de acuerdo a como se ha postulado en otros trabajos, que el número de CTC por sí mismo no supone un factor pronóstico para la reaparición del tumor y que la recidiva, cuando se produce

en estos casos, tal vez guarde relación con las características o cualidades de las CTC presentes en ese momento (así como otros muchos factores) y no necesariamente con su concentración en sangre. En este segundo paciente, la elevación de CTC tras el TOH podría explicarse por la propia manipulación durante el procedimiento quirúrgico, lo que desencadena la liberación masiva de CTC al torrente sanguíneo. Lamentablemente, no dejan de ser conjeturas que difícilmente se pueden extrapolar partiendo de un grupo de pacientes tan pequeño. Por otro lado, al comparar los niveles de CTC antes y después del TOH en el grupo completo, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de CTC.

Además del paciente descrito, otros tres sufrieron recidiva. En dos casos tuvo lugar antes del primer año de seguimiento y en el último se diagnosticó a los 20 meses del TOH. En todos ellos afectó a varios órganos (hígado implantado y hueso en todos los casos, pulmón en dos de ellos y glándula suprarrenal en uno). Como se ha comentado anteriormente, el comportamiento evolutivo de las CTC en estos cuatro pacientes no difirió del resto del grupo, siendo la tónica habitual el descenso progresivo de los niveles y partiendo de una concentración de CTC similar. Los cuatro pacientes con recidiva fallecieron. Además, otros tres pacientes de la serie fallecieron durante el seguimiento: dos de ellos por sepsis biliar (absceso hepático) y otro por otra causa ajena al TOH (evento cardiovascular).

La relación entre la recidiva y la puntuación en los sistemas predictores de recurrencia RETREAT (166) y AFP (170) también merece ser comentada. La puntuación mediana obtenida fue significativamente mayor en los pacientes que presentaron posteriormente recidiva. Esto demuestra la buena capacidad predictora de estos modelos, algo que ya ha sido probado en trabajos previos (165,167,172,173). Hay que tener presente que, a pesar de su validez, estos modelos se basan, entre otros, en criterios morfológicos obtenidos del análisis histológico del hígado enfermo y no en parámetros que se puedan determinar antes del trasplante, por lo que no resultan de ayuda a la hora de seleccionar pacientes candidatos a TOH. En este sentido, cobra especial interés el estudio de nuevos parámetros que sí puedan determinarse con anterioridad a la intervención, como la captación en el PET-TC o el análisis de las CTC.

Existen varios estudios previos en los que se ha estudiado esta asociación. En lo que respecta a las CTC, Sun et al (304) establecieron el mejor punto de corte en la predicción de recurrencia tras la resección quirúrgica con concentraciones de CTC iguales o superiores a 2 CTC/7,5 ml determinadas mediante el sistema CellSearch. Otros grupos han publicado

posteriormente puntos de corte similares en un rango de 2 - 16 CTC, aunque con diferentes métodos de selección de pacientes y cuantificación de CTC (313,326,327). En el presente trabajo, el mejor punto de corte se obtuvo para unos niveles de CTC iguales o superiores a 9 CTC/10 ml, aunque con un método diferente al empleado por otros grupos (Isoflux) y en una muestra de pacientes sometidos a TOH en lugar de a resecciones quirúrgicas. La captación en el PET-TC en términos de SUVmax demostró ser un mejor predictor de recidiva que las CTC, obteniendo en su caso mejor área bajo la curva de forma significativa. El punto de corte se situó en 3,5, valor similar al establecido por Hsu et al (30), que lo situaron en 4,8. Aunque el uso del PET se encuentra cada vez más extendido, hoy por hoy no existe un consenso sobre qué parámetros utilizar y existen estudios con el SUVmax, la relación entre el SUV en el tejido sano y el tejido tumoral, o el simple análisis visual, distinguiendo entre PET positivo y PET negativo, por mencionar algunos de los parámetros más empleados.

Papel del PET

El PET es una herramienta diagnóstica que está cobrando cada vez más importancia en el manejo de los pacientes con CHC gracias a la información que aporta sobre la actividad biológica y agresividad del tumor. Se ha demostrado que en los tumores pobremente diferenciados (alto grado), existe un mayor acúmulo del trazador (FDG-6-P) debido a una menor actividad de la glucosa-6-fosfatasa. Este fenómeno no sucede en los CHC bien diferenciados, con características semejantes a los hepatocitos del parénquima sano (41). Además, los CHC con una captación elevada (los de alto grado) se asocian con la expresión de determinados genes particularmente relacionados con la capacidad de adhesión e invasión de las células tumorales, lo que refuerza la idea de una naturaleza más agresiva en estos tumores hipercaptantes (338).

Parece razonable asumir que el PET debe poseer una asociación significativa con el pronóstico en tanto que se relaciona estrechamente con el grado de diferenciación y la agresividad. Varios estudios han corroborado esta postura y hoy en día es conocida la asociación entre el PET y algunos factores de mal pronóstico en pacientes que se trasplantan por TOH, como la invasión microvascular, el grado de diferenciación tumoral, el tamaño y número de nódulos o la respuesta a la TACE (46–49).

En el presente trabajo y como parte del estudio pretrasplante, se realizó un PET-TC en todos los casos. En 10 pacientes (33,3%) se detectó una captación patológica, un porcentaje que es similar a los resultados comunicados por otros grupos (29,30,56).

En el PET-TC, además del análisis visual para determinar si existe una captación patológica, también se emplean técnicas para cuantificar esta captación. El parámetro empleado con más frecuencia es el SUVmax, pero también se han empleado el cociente entre la captación en tumor y en el hígado sano o TNR (tumor-to-non-tumor liver uptake ratio) y el cociente entre el SUVmax en el tumor y en el parénquima circundante o Tmax/Lmax. En el presente trabajo se empleó el índice SUVmax y la captación mediana fue de 2,5.

En el CHC, la relación entre el grado de diferenciación y la actividad de las enzimas glucolíticas es conocida. Los tumores poco diferenciados tienen una actividad de glucosa-6-fosfatasa baja y una alta captación de 18F-FDG (41). En el presente trabajo, el 60% de los pacientes con PET-TC positivo presentaron un grado de diferenciación de 2 o 3, aunque la diferencia observada no fue estadísticamente significativa. La asociación entre el PET-TC y otros aspectos histológicos es también conocida. Boussouar et al (32) encontraron una asociación entre un ratio Tmax/Lmax superior a 1,15 y el tamaño tumoral y una pobre diferenciación tumoral. En otro estudio, Kobayashi et al (58) observaron una asociación entre un resultado positivo en el PET-TC y la presencia de invasión vascular. Lin et al (33) concluyeron en un estudio con 65 pacientes que el SUVmax y el ratio Tmax/Lmax eran factores predictor de invasión vascular, estableciendo en 3,8 y 1,49 sendos puntos de corte. En otro trabajo más reciente, Ling et al (64) determinaron que un TLR ≥ 2 es predictor de histología desfavorable. En la misma línea, Bailly et al (60), en un estudio con 34 pacientes con CHC y sometidos a TOH, observaron que los pacientes con ratios Tmax/Lmax superiores a 1,15 presentaron tumores poco diferenciados (más agresivos). En este último estudio, un total de 10 pacientes presentaron una captación patológica en el PET-TC, resultados similares a los observados en el presente trabajo. En nuestra serie, la presencia de invasión microvascular se asoció de forma estadísticamente significativa a una captación anómala en el PET-TC y a un SUVmax más elevado; en ningún paciente con un PET-TC negativo se encontró invasión microvascular en el análisis patológico (0 vs 30%). Es importante señalar que la invasión microvascular es el predictor más fiable de recidiva (5,143); por tanto, la capacidad predictora del PET-TC es muy valiosa en este escenario al ser la única prueba complementaria que aporta información sobre este factor de mal pronóstico, con la ventaja añadida de que está disponible antes del posible TOH, facilitando la selección de los pacientes que más se pueden beneficiar

del tratamiento. El PET también ha demostrado su utilidad para detectar la progresión tumoral después de la terapia puente durante el tiempo en lista de espera. Refaat et al (63) observaron que la realización del PET-TC en pacientes con terapia puente y en LEQ para TOH y un ascenso en los niveles de AFP fue útil para detectar la progresión tumoral. Por tanto, el PET-TC realizado tras las TACE y antes del TOH, como ha sido el caso en este trabajo, parece ser un elemento adecuado para seleccionar pacientes en función del riesgo de progresión.

El peso de la biología tumoral en los criterios de selección para TOH, que clásicamente se han basado en aspectos morfológicos, es cada vez mayor y la influencia del PET-TC y los niveles de AFP aumenta. Hsu et al (30) propusieron combinar el resultado del PET-TC y los criterios UCSF para predecir el riesgo de recurrencia en base a los resultados de un estudio con 147 pacientes en el que la tasa de recidiva postrasplante era similar entre los pacientes que cumplían los criterios UCSF y los que no los cumplían pero tenían un PET-TC negativo. Por otro lado, Kornberg et al (54) propusieron el uso del PET-TC en combinación con los criterios *Up-to-seven* al observar en una serie de 116 pacientes que la SLE a 5 años de los que cumplían los criterios *Up-to-seven* era similar a la de los que, a pesar de no cumplirlos, presentaban un PET-TC negativo. Siguiendo esta corriente de resultados, en un estudio multicéntrico japonés, mientras que los pacientes más allá de los criterios de Milán presentaron una recurrencia significativamente mayor en comparación con aquellos dentro de los criterios de Milán, en el subgrupo de los primeros con PET-TC negativo y AFP < 115 ng/ml se observó una tasa de recurrencia similar a la de los pacientes que cumplían los criterios de Milán (61).

En el presente trabajo, constituido íntegramente por pacientes que cumplen los criterios de Milán, se encontró que la suma del diámetro de tumores viables fue mayor en los pacientes con PET-TC positivo, correlacionándose también de forma positiva significativa con el SUVmax. Por otra parte, aunque los pacientes con PET-TC positivo presentaron tumores de mayor tamaño, no se alcanzó la significación estadística. El número de tumores tampoco difirió entre ambos grupos. La escasa asociación entre la captación en el PET-TC y los criterios morfológicos sugiere, como ya se ha propuesto en los trabajos citados más arriba, que el tamaño y número de tumores no siempre tienen relación con un comportamiento tumoral agresivo, siendo entonces indispensable recurrir a nuevos métodos que perfeccionen los criterios de selección y los conviertan en herramientas más precisas a la hora de optimizar el tratamiento de cada paciente. Siguiendo esta línea, en el presente trabajo se estudió la asociación entre el PET-TC y algunos de los nuevos modelos predictores de recurrencia que sí tienen en cuenta marcadores biológicos (AFP) y se observó que los pacientes con PET-TC positivo presentaban puntuaciones

más altas en los modelos RETREAT y AFP. Además, se encontró una correlación positiva entre el SUVmax y estas puntuaciones.

En base a lo anteriormente expuesto, se puede afirmar que la relación entre el PET-TC y la recidiva postrasplante parece clara. En nuestra serie, la tasa de recidiva fue más alta en los pacientes con PET-TC positivo (30% vs 5%), aunque no alcanzó la significación estadística. Estos resultados son similares a los descritos previamente por otros grupos. Por ejemplo, Kornberg et al (51) describieron una tasa de recurrencia de 33,3% vs 0 en pacientes dentro de los criterios de Milán y con PET positivo o negativo respectivamente. En términos de SUVmax sí se encontró una mayor captación significativa en los pacientes que sufrieron recidiva. Estos resultados están en sintonía con los descritos en la literatura y ensalzan el papel del PET-TC en el manejo de estos pacientes.

La SLE a 5 años de los pacientes con PET positivo vs negativo fue 70% vs 94,4% ($p = 0,053$), mientras que la SG, 68,6% vs 80% ($p = 0,582$). Cuando se compararon las supervivencias en función del SUVmax, estableciendo el punto de corte en 3,5, se encontró que la SLE a 5 años en los pacientes con $SUV_{max} \geq 3,5$ fue 40% y 95,7% en los de menor captación ($p < 0,001$). La SG a 5 años fue de 40% vs 84%. Estos resultados ponen de manifiesto la conocida relación entre el PET-TC y la supervivencia. Aunque en este caso, el PET-TC positivo no se asoció significativamente a una menor SLE a 5 años, esta fue inferior a la de los pacientes con PET-TC negativo. No sucede lo mismo si la comparativa se realiza en función del SUVmax, donde tanto la SLE como la SGE son significativamente inferiores. Las SLE y SG descritas por los diferentes grupos que han estudiado la utilidad del PET-TC en pacientes que se trasplantan por CHC son dispares. Esto es debido a la heterogeneidad de los estudios y las propias series de pacientes, ya que distintos grupos emplean diferentes criterios de selección, incluyendo habitualmente pacientes más allá de los criterios de Milán. En estos trabajos, si nos atenemos tan solo a los pacientes que cumplen los criterios de Milán, podemos encontrar resultados similares. Lee et al (56), en un estudio que incluyó 133 pacientes dentro de los criterios de Milán, describieron una SLE a 5 años de 76,3% vs 92,3% en función del PET-TC positivo o negativo respectivamente. Hsu et al (30) describieron una SLE a 5 años significativamente más pobre en los pacientes con mayor captación en el PET-TC (29,6% vs 85%).

La relación entre el PET-TC y la supervivencia libre de enfermedad queda patente en numerosos trabajos. Algunos grupos han dado un paso más y han estudiado la combinación del PET-TC con otros factores y su relación con la supervivencia. Lee et al (29) describieron

tasas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global inferiores en los pacientes que presentaban captación en el PET. Esta asociación se veía a su vez potenciada si se combinaba con los niveles de AFP, constituyendo una parte del sistema de selección de pacientes susceptibles de TOH. Y es que la importancia que están adquiriendo el PET-TC y los biomarcadores en el manejo de los pacientes con CHC candidatos a TOH se hace patente en el cada vez mayor número de trabajos sobre el tema. Por ejemplo, Kang et al (48), en un estudio con 239 pacientes, encontraron que la combinación de los criterios morfológicos (tamaño y número de tumores), la captación en el PET y los niveles de AFP era más efectiva a la hora de predecir la recidiva que los modelos tradicionales. Hong et al (31), en una serie de 123 pacientes no encontraron una correlación entre la captación patológica en el PET y los niveles de AFP, aunque ambos parámetros fueron los únicos factores pronósticos pretrasplante que se asociaron a las tasas de SLE y SG, de modo que la combinación de AFP mayor o igual a 200 y PET positivo predijeron mejor los resultados postrasplante en comparación con los criterios de Milán. En el presente trabajo, al igual que en este último estudio citado, tampoco se ha encontrado una correlación entre el PET-TC y los niveles de AFP; correlación que si existe en el caso de los niveles de CTC, lo que conduce a considerar la biopsia líquida como un biomarcador más útil que los empleados en la actualidad, como AFP.

Esta asociación entre el PET-TC y los niveles pretrasplante de CTC resulta especialmente interesante y puede repercutir en los criterios a tener en cuenta en el manejo de estos pacientes. En la serie que atañe este trabajo, los pacientes con un PET-TC positivo presentaron una concentración de CTC pretrasplante significativamente superior. A su vez, se encontró una correlación positiva significativa entre la captación medida en SUVmax y el número de CTC contabilizadas. Esta relación entre los niveles de CTC y el resultado en el PET-TC se hace patente en el análisis de supervivencia: los pacientes con PET-TC positivo y ≥ 9 CTC/10 ml ($n = 8$) mostraron una SLE a 5 años significativamente menor (62,5% vs 95%) que el resto del grupo. Esta asociación abre camino al uso combinado de ambos parámetros en el futuro a la hora de predecir el pronóstico de cada paciente y elegir el tratamiento más beneficioso en cada caso.

La asociación entre el PET-TC y las CTC es poco conocida, aunque ya ha sido descrita en otras estirpes tumorales (339). Por lo que sabemos, la asociación entre las CTC y la captación en el PET no ha sido descrita previamente en la literatura en pacientes con CHC sometidos a TOH. Estos resultados nos conducen a considerar la inclusión de ambos parámetros entre los criterios de selección de pacientes candidatos a TOH, ofreciendo la ventaja de que ambos se

pueden determinar antes del procedimiento y aportan información útil sobre la biología tumoral y su agresividad en base a sus características histológicas.

Niveles de AFP y de CTC

AFP: niveles pretrasplante, evolución y correlación con otras variables

La AFP es considerada un buen marcador pronóstico en pacientes candidatos a trasplante y varios modelos predictores de recurrencia se apoyan en su cuantificación. Sin embargo, no existe un punto de corte consensuado que permita discernir con precisión qué pacientes tienen peor pronóstico. Por lo general, se acepta que valores inferiores a 15 ng/ml se asocia con un pronóstico excelente mientras que valores superiores a 1.000 ng/ml deberían significar la exclusión del trasplante como tratamiento; siendo 400 ng/ml el punto de corte más extendido (72). En la serie estudiada se observaron unos niveles de AFP antes del trasplante bajos por lo general. La mediana fue de 6 ng/ml y ningún paciente sobrepasó la cifra de 400 ng/ml. Por una parte, es lógico pensar que pacientes tan seleccionados y considerados de buen pronóstico presenten unos niveles bajos de AFP. Sin embargo, la ausencia de asociación estadística de este marcador con las variables incluidas en el estudio (incluyendo la recidiva y la supervivencia libre de enfermedad), siembra la duda sobre su utilidad discriminatoria a la hora de identificar qué pacientes tendrán un peor pronóstico. Esta idea también se sustenta en otro pilar importante: tampoco se encontró una correlación entre los niveles de CTC y de AFP. Este resultado es similar al descrito en estudios previos (340,341), aunque difiere de otros trabajos en los que sí se ha observado asociación (304–306). Si asumimos que, al menos desde un punto de vista teórico, las CTC son un indicador más preciso de la actividad tumoral, estos resultados sugieren que la correlación entre los niveles de AFP y la biología tumoral no es fuerte, a pesar de que varios grupos han propuesto la inclusión de los niveles de AFP en varios modelos de selección de pacientes (166,167,170). Esto nos lleva a considerar como una opción atractiva la inclusión de la biopsia líquida en los modelos de selección de pacientes.

Los niveles pretrasplante de AFP no mostraron una asociación significativa con la SLE. Sin embargo, es reseñable que los pacientes con niveles iguales o mayores a 22,5 ng/ml propendieron a un SLE más pobre. Aunque los niveles de AFP no parecen ser un buen marcador pronóstico, su determinación seriada durante el seguimiento sí arroja resultados

interesantes. Después del TOH, los niveles medianos de AFP disminuyeron de forma significativa. En cambio, sí se constató una tendencia ascendente significativa en los pacientes con recidiva. Esto demuestra que tiene un papel útil en el seguimiento tras el trasplante al permitir monitorizar la evolución y sospechar la presencia de recidiva cuando sus niveles ascienden. La determinación seriada de AFP tras el trasplante como predictor de recidiva va en consonancia con lo ya propuesto en otros trabajos en los que se ha observado una asociación entre un incremento de 15-50 ng/ml al mes o 0,1 ng/ml al día y mayor riesgo de recidiva y supervivencia más pobre (73–76). En otro trabajo reciente en pacientes con CHC que se trasplantan, se observó que un cociente mayor de 5 entre la AFP en el momento de la recidiva y la AFP determinada 3 meses antes fue predictiva de supervivencia después de la recurrencia del CHC (342). Aunque AFP se considera el marcador pretrasplante más útil a la hora de predecir el riesgo de recidiva postrasplante, cabe recordar que su utilidad se ve restringida por la existencia de tumores no secretores de AFP. Esta desventaja no está presente en el caso de la biopsia líquida y por tanto las CTC son un biomarcador más específico.

CTC: niveles pretrasplante, evolución y correlación con otras variables

Niveles pretrasplante de CTC

En lo referente a las CTC, todos los pacientes fueron sometidos a una biopsia líquida pretrasplante. De las 30 muestras procesadas, se identificaron CTC en 24 casos (80%). Este porcentaje es ligeramente superior al descrito por otros grupos que, mediante el sistema CellSearch, lograron identificar CTC en el 60-70% de los casos (304,313,314). El número de CTC contabilizadas por muestra fue también superior al comunicado en esos mismos trabajos, con una mediana de 9 CTC/10 ml y un rango amplio, identificando en algunos casos varios centenares de células.

La etiología de la cirrosis y la fase de la hepatopatía (evaluada mediante CHILD y MELD) no influyeron en la concentración de CTC. Esto concuerda con lo descrito en otros trabajos, en los que se postula que una vez que la cirrosis se ha establecido, e independientemente la causa que la haya motivado, el riesgo de desarrollar un CHC aumenta hasta el punto que el 90% de los CHC aparecen en el seno de un hígado cirrótico (8,12). Clásicamente, la cirrosis de etiología vírica por VHC se ha asociado a un peor pronóstico tras el trasplante debido a la presencia de

tumores más avanzados y una función hepática más deteriorada, lo que merma la SLE y SG (144). En la serie estudiada, al seleccionar pacientes dentro de los criterios de Milán, las características de los tumores y la gravedad de la hepatopatía son homogéneas y no se ven influenciadas por la etiología de la cirrosis que, en caso contrario, podría ejercer de factor de confusión. Por tanto, se presume que los niveles de CTC dependen únicamente del comportamiento biológico de cada tumor.

Tampoco se encontró una correlación en el número de TACE y la concentración de CTC. Por una parte, parece lógico pensar que a mayor número de TACE, menor tumor viable y por tanto menor concentración de CTC. El número de TACE podría ser interpretado como un factor de confusión, alterando la biología tumoral y por tanto el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, la ausencia de correlación con los niveles de CTC o con la evolución de los pacientes (tampoco se asoció a la recidiva) es una prueba de que la biopsia líquida parece ser un marcador independiente y que, al menos en nuestra serie, el número de TACE no influyó en el pronóstico de los pacientes.

El análisis de la relación de estos niveles con otras variables reveló una asociación estadísticamente significativa en varios casos. En este trabajo se ha podido observar una correlación positiva entre los niveles de CTC y el tiempo en LEQ; es decir, a mayor tiempo aguardando un hígado, mayor concentración de CTC. El tiempo en LEQ es un factor que influye en el pronóstico de los pacientes. Inicialmente, no existía un criterio homogéneo para la gestión de la LEQ en pacientes con CHC candidatos a TOH. Algunos grupos trasplantaban a estos pacientes de forma preferente (en detrimento de los pacientes con patologías benignas) mientras que en otros centros se seguía estrictamente la fecha de inclusión, aumentando el riesgo de exclusión por progresión tumoral al dejar de cumplir los criterios de Milán. Hoy en día, la asociación entre el tiempo en lista de espera y la tasa de recurrencia está bien establecida y tanto un tiempo corto (< 6 meses) como largo (> 18 meses) en LEQ se asocian a un mayor riesgo de recidiva (153). Una estrategia de priorización extendida en la actualidad consiste en la estratificación de los pacientes en función del riesgo. Un ejemplo es el sistema de priorización de la United Network for Organ Sharing (UNOS), que divide a los pacientes cumplidores de los criterios de Milán en dos grupos de bajo y alto riesgo respectivamente: T1 (tumores únicos menores de 2 cm) y T2 (tumores únicos mayores de 2 a 5 cm y tumores múltiples hasta 3, todos ellos menores de 3 cm) y se confiere prioridad únicamente a los T2 mediante la asignación de puntos adicionales en el modelo MELD (343). La mayor presencia de CTC en los pacientes con más tiempo en LEQ demuestra que existe una actividad tumoral

constante y permite cuantificarla, algo que podría ser interesante como criterio de estratificación, posibilitando priorizar a los pacientes con mayor actividad tumoral y, por tanto, mayor riesgo de progresión.

En esta serie de 30 casos, los niveles de CTC pretrasplante en los pacientes que posteriormente sufrieron recidiva no fueron significativamente más elevados que en el resto. Sin embargo, a pesar de esta ausencia de asociación entre las CTC y la reaparición de la enfermedad, sí se ha encontrado una relación con los criterios morfológicos así como otros conocidos factores de riesgo de recidiva; esto es, los pacientes con niveles más elevados de CTC presentaron tumores más grandes, un mayor diámetro total de tumores viables e invasión microvascular con más frecuencia. En pacientes con CHC sometidos a TOH, esta asociación es poco conocida, ya que apenas existen estudios previos y la evidencia más sólida proviene de trabajos con pacientes sometidos a resecciones hepáticas (304–306). La asociación con otros criterios morfológicos, como el número de tumores, fue menos consistente aunque también podría existir; otros grupos han descrito niveles superiores de CTC en pacientes con más tumores, pero no de forma estadísticamente significativa (310).

Los criterios morfológicos han sido criticados por no proporcionar información real sobre la agresividad del tumor en muchos casos, algo que ha sido evaluado de forma indirecta mediante pruebas complementarias como el PET-TC. Como se ha comentado anteriormente, el pronóstico de algunos pacientes con tumores avanzados (fuera de los criterios de Milán) pero con PET-TC negativo es en ocasiones equiparable al de otros pacientes que sí cumplen los criterios de Milán (61). A pesar de ello, la correlación entre los niveles de CTC y los criterios morfológicos encontrada en el presente trabajo demuestra la relación que tienen estos criterios, por lo general, con la biología tumoral. De este modo, la biopsia líquida proporciona información valiosa que puede completar la obtenida mediante los estudios convencionales. Tal vez, futuros estudios que incluyan tumores avanzados en los que se determinen las CTC podrían ayudar al entendimiento del comportamiento tumoral y permitir identificar de forma precisa a aquellos pacientes con lesiones menos agresivas de lo que sugiera el estudio convencional y viceversa.

La asociación entre la captación en el PET-TC y los niveles de CTC es también otro hallazgo interesante, como se ha comentado en el apartado correspondiente al papel del PET-TC. Si bien la asociación del PET-TC a otros factores de mal pronóstico ya ha sido estudiada, nuestros

resultados demuestran que la actividad tumoral, cuantificada mediante CTC, es mayor en los pacientes con PET-TC positivo y mayor captación en términos de SUVmax.

Por otro lado, la buena correlación entre los niveles de CTC y la puntuación obtenida en algunos modelos predictores de recidiva (RETREAT y AFP), abre la ventana a incluir en un futuro los niveles de CTC como un parámetro a tener en cuenta en el manejo de estos pacientes y afianza la idea de que los niveles de CTC pueden desempeñar un papel importante a la hora de establecer el riesgo de recidiva y el pronóstico de estos pacientes.

En definitiva, la asociación entre las CTC y las distintas variables sugiere la buena correlación con los factores de mal pronóstico y señala en qué situaciones podemos encontrar tumores más activos, cuantificándolo mediante las CTC. En base a esta relación entre los niveles de CTC y algunos factores de mal pronóstico conocidos, cabría suponer que los pacientes con menores niveles de CTC tendrán una evolución más favorable tras el TOH desde el punto de vista oncológico de modo que su determinación antes de la intervención permitiría seleccionar y priorizar a los pacientes en lista de espera con más probabilidades de éxito así como desestimar el TOH en favor de otras terapias en aquellos con alto riesgo de recurrencia tumoral. Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados obtenidos en el análisis de supervivencia en función de los niveles pretrasplante de CTC. Si tomamos como punto de corte la concentración igual o superior a 9 CTC/10 ml pretrasplante, podemos observar que la SLE a 5 años es significativamente menor entre los pacientes con niveles más altos (73,3% vs 100%, $p = 0,04$). Estos datos están en consonancia con los resultados de otros grupos. Por ejemplo, Xue et al (313), en 2018, en un trabajo con 30 pacientes con CHC sometidos a TOH y conteo de CTC mediante el sistema iFISH observaron que los pacientes con niveles inferiores a 5 CTC, presentaban una mayor SLE. En otros trabajos con pacientes tratados mediante resección quirúrgica y conteo mediante CellSearch se han descrito resultados similares: Von Felden et al (323) encontraron en 57 pacientes que aquellos con niveles detectables de CTC tenían una SLE más pobre y Yu et al (326), en un estudio con 139 pacientes, describieron una menor SLE si el número de CTC era igual o mayor a 2.

Evolución de las CTC

Otro objetivo de este trabajo ha sido la determinación seriada de CTC tras el TOH con el fin de evaluar la utilidad que pueda tener la biopsia líquida en el seguimiento de estos pacientes y la detección temprana de la recidiva, algo para lo que actualmente se recurre a los niveles de AFP y las pruebas de imagen. En un total de 9 pacientes se realizaron todas las determinaciones hasta los 2 años. En el posoperatorio temprano, entendiendo como tal los 6 primeros meses, se logró detectar CTC en más del 70% de los pacientes analizados. Esta proporción de pacientes con niveles detectables de CTC es similar en el posoperatorio tardío, incluso 2 años después del TOH. Conforme avanza el seguimiento de los pacientes se ha podido constatar un descenso de los niveles medianos de CTC de forma generalizada, independientemente de si estos presentan recidiva o no. Este descenso en la concentración de CTC alcanza significación estadística al año y 2 años del TOH.

La detección de CTC inmediatamente después del TOH (primer mes) podría estar motivada por el procedimiento en sí. En trabajos previos con pacientes sometidos a resecciones hepáticas ya se ha documentado el mismo fenómeno y se ha postulado que la manipulación durante la propia cirugía, las terapias puente y la isquemia (con la consecuente liberación de citoquinas) podrían ser las responsables de la liberación de CTC al torrente sanguíneo (304).

La persistencia de CTC a largo plazo es un fenómeno que plantea algunas incógnitas. Teóricamente, como resultado de la exéresis completa del tumor, los niveles de CTC postrasplante deberían terminar siendo indetectables. Sin embargo, según nuestros resultados, las CTC perviven en la sangre periférica en un elevado porcentaje de pacientes incluso en años posteriores. El origen de estas células tumorales es incierto: ¿se trata de células provenientes del tumor original que permanece inermes en la sangre periférica durante un tiempo indefinido? ¿o más bien proceden de focos metastásicos que han pasado desapercibidos tal vez incluso desde antes del TOH? Para decantarnos por una u otra opción, puede ser de ayuda considerar que la repercusión de este fenómeno en la reaparición de la enfermedad parece baja. Al cabo de 2 años postrasplante, más del 80% de los pacientes en los que se realizó la medición presentaron CTC en sangre periférica. Sin embargo, en ninguno de ellos se diagnosticó recidiva tumoral durante el seguimiento completo (5 años). Además, todas las recidivas aparecieron antes de los dos primeros años. Por ello, parece más razonable inclinarse por la primera opción, que tal vez estas CTC son células residuales con escasa capacidad para desarrollar focos metastásicos. Siguiendo esta corriente, otro aspecto que

habría que tener en cuenta en futuros estudios es la viabilidad de estas células tumorales. Es decir, independientemente del momento en el que se hayan liberado al torrente sanguíneo, ¿estas células circulantes tienen potencial invasor o son células apoptóticas (anoikis)? Este fenómeno de muerte celular programada conocido como anoikis tiene lugar en aquellas células que se desprenden de la matriz extracelular y pasan al torrente sanguíneo, momento en el que se pierden las interacciones habituales. Este “desarraigo” induce la apoptosis celular. Sin embargo, las células tumorales invasoras sobreviven a este proceso por mecanismos que son prácticamente desconocidos hoy día (344). Con la metodología actual de detección de CTC, cabe la posibilidad de que parte de las células que se logran capturar se correspondan con células de estas características, cuyo potencial tumorigénico probablemente sea nulo. Los próximos pasos en el campo de las CTC deberían orientarse a la caracterización de las CTC. De este modo, futuros estudios podrían arrojar luz sobre la cuestión, con el fin de conocer más detalladamente las células que se están analizando e identificar los fenotipos más agresivos.

La persistencia de CTC años después de que el tumor original haya desaparecido sin que esto condicione la reaparición del cáncer es una prueba más de la complejidad de la cascada metastásica y de lo que resta por conocer acerca de la biología de los tumores. La formación de metástasis y la reaparición de la enfermedad es un proceso complejo en el que influyen múltiples factores que en parte desconocemos, más allá de la presencia o no en sangre de una determinada célula tumoral. La cuantificación de CTC posiblemente no sea la solución pero alumbra un camino sobre el que continuar investigando para que, conforme se afiance el conocimiento sobre la biología tumoral y la cascada metastásica, seamos capaces de detectar con precisión aquellas células o sucedáneos (ADN, ARN, etc) que aporten de forma fidedigna información en tiempo real sobre la situación oncológica de cada paciente.

Patrones evolutivos

Como se ha comentado en el apartado anterior, los niveles de CTC después del TOH no parecen estar relacionados por sí solos ni con la recidiva ni el pronóstico de los pacientes. De forma individual, el comportamiento de estas CTC puede parecer abigarrado, con fluctuaciones en su concentración y persistencia de niveles detectables a lo largo del tiempo sin que esto se relacione con la recurrencia; sin embargo al observar de forma conjunta la evolución de las CTC en los pacientes de la serie, se han identificado distintos patrones evolutivos de los niveles de CTC. En un grupo de pacientes se observó un patrón descendente

que se caracterizó por partir de unos niveles de CTC elevados antes del TOH para posteriormente disminuir a cantidades mínimas. Otro grupo de pacientes presentó concentraciones iniciales más bajas pero, tras el trasplante, se observó un ascenso en los niveles de CTC uno o seis meses después. Finalmente, el último grupo lo constituyeron los pacientes con un patrón plano, ya que en todo momento presentaron unos niveles bajos de CTC. La tasa de recidiva fue más elevada en los pacientes con patrón descendente (pero partiendo de unos niveles más altos). Quizás el grupo más interesante sea el que presentó un pico central. En estos pacientes se detectaron niveles superiores de CTC los primeros meses tras el TOH (siendo la concentración inicial preTOH baja). Las circunstancias que motivaron en cada caso el repunte de CTC se desconocen pero se pueden barajar varias hipótesis. Una explicación podría estar relacionada con la propia intervención, ya que durante la manipulación del hígado enfermo puede verse favorecido el paso de CTC al torrente sanguíneo, fenómeno documentado en la literatura y ya descrito en el apartado anterior. Otra opción plausible sería que los cambios que se producen en el organismo tras el trasplante (debido a la inmunosupresión, etc), hubiesen favorecido el crecimiento (gracias a la presión selectiva) de subpoblaciones de CTC resistentes y con potencial tumorigénico, lo que podría justificar la recidiva en uno de los pacientes. Que este repunte no se asocie necesariamente a la reaparición del tumor sugiere de nuevo que la formación de nuevos nichos de enfermedad es un proceso en el que participan muchos factores y no depende ni mucho menos de la cantidad de CTC presentes en un momento concreto.

Finalmente, los pacientes con un patrón plano de CTC tuvieron un mejor pronóstico al no observar recidiva en ningún caso. Aunque es difícil aventurarse a generalizar este comportamiento de las células tumorales, las tendencias observadas en los niveles de CTC sugieren la capacidad que tiene la biopsia líquida como factor predictor del pronóstico y como método para monitorizar la respuesta a un tratamiento.

¿Estamos identificando la célula correcta?

Hasta hace pocos años, se definía como CTC a aquella célula aislada en sangre periférica que expresaba EpCAM y citoqueratina (CK) en ausencia de CD45 (lo que la diferencia de los linfocitos). Sin embargo, posteriores investigaciones han ido revelando que las células tumorales no son clones entre sí, sino que representan una población heterogénea de células de diferentes focos tumorales, con capacidad para cambiar sus características fenotípicas y

moleculares bajo la presión selectiva del microambiente estromal y los tratamientos. Esta variabilidad ha propiciado el desarrollo de técnicas de enriquecimiento positivo dirigidas a marcadores de células madre (CD133), marcadores mesenquimales (vimentina) y antígenos específicos del cáncer (HER2, PSMA, etc). Hoy en día se desconocen con precisión las características de las células que realmente están involucradas en el proceso metastásico.

En el CHC se ha demostrado que las células EpCAM+ son las más invasivas y tumorigénicas (345). A pesar de la evidente relación entre los niveles de CTC EpCAM+ y un peor pronóstico, hay que tener presente que la expresión de EpCAM solo tiene lugar, de forma genérica, en el 30-40% de los carcinomas (294) y que se está obviando la detección de otros tipos de células tumorales que han dejado de expresar EpCAM, como las de perfil TEM, relacionadas con la invasividad y cuyo papel en el proceso metastásico podría ser importante. En todo este proceso tampoco se tienen en cuenta los émbolos tumorales. Agregados de CTC, plaquetas, fibroblastos y factores de coagulación activados que poseen un potencial metastásico significativamente mayor y una mayor capacidad de supervivencia en comparación con las CTC individuales (346).

Sistemas de detección de CTC en pacientes con CHC.

En la actualidad, uno de los problemas sin resolver en la investigación con CTC es la gran variedad de métodos de detección disponibles, lo que influye en la variabilidad de los resultados y dificulta obtener conclusiones sólidas. Hoy por hoy, CellSearch es el método más extendido para el estudio de CTC EpCAM+, aun cuando su sensibilidad y pureza son cuanto menos mejorables. En el presente trabajo se optó por el método Isoflux para la determinación de las CTC y no tenemos constancia de que se haya empleado previamente por otros grupos. Isoflux se trata de una novedosa técnica microfluídica que según estudios recientes en líneas celulares tumorales de mama y próstata con expresión EpCAM baja y media respectivamente, muestra una mayor capacidad de recuperación de CTC en comparación con CellSearch (295,347). Aunque la evidencia es baja, en pacientes con CHC también parece ser más sensible que CellSearch. Nuestro grupo, en un trabajo previo, pudo observar que el sistema IsoFlux confiere mayor sensibilidad que el sistema CellSearch (capturando un mayor número de CTC), a pesar de utilizar anticuerpos similares para el aislamiento y la identificación de las células, supuestamente gracias al sistema de canales microfluídicos (340).

Utilidad de las CTC

Incluir la determinación de las CTC como parte de los protocolos de estudio y manejo de los pacientes con CHC candidatos a TOH podría ser una herramienta útil que facilitaría identificar a aquellos pacientes con un peor pronóstico y mayor riesgo de recidiva. En esta línea, varios trabajos han sugerido que las CTC son un factor decisivo en la reaparición del CHC (258,337). No obstante, la relevancia clínica y el valor pronóstico que se les confiere es controvertido. Aunque la concentración de CTC podría ser un factor predictor de recidiva útil en la práctica clínica, la gran heterogeneidad de los trabajos (con diferentes sistemas de detección y caracterización de CTC) y de las propias células tumorales, impide que ningún método se alcance como “patrón oro” hoy en día. Como ya se ha mencionado, existen múltiples subpoblaciones de CTC con distintos grados de agresividad. Por ejemplo, se ha descrito que aquellas que expresan CD133 y CD44 son más tumorigénicas, resistentes a la quimioterapia e inductoras de metástasis hematógenas (348). Estos marcadores también se han asociado a niveles superiores de AFP y tumores poco diferenciados, constituyendo un factor de riesgo de recidiva junto con la invasión microvascular (349). En otro trabajo reciente, Wang et al (314) realizaron una caracterización de CTC con marcadores epiteliales (EpCAM) y marcadores intersticiales (vimentina). Sin embargo, no encontraron asociación entre ninguno de los distintos fenotipos morfológicos, celulares y moleculares estudiados y la recurrencia de la enfermedad tras el TOH.

En el presente trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de CTC y la reaparición de la enfermedad. Sin embargo, únicamente se llevó a cabo un conteo de CTC, sin caracterizar las células tumorales identificadas. En este sentido, futuros estudios de subpoblaciones de CTC con expresión de diferentes marcadores podrían arrojar algo de luz sobre los mecanismos involucrados en la recidiva de un tumor.

La heterogeneidad tanto de las células tumorales como de los sistemas de medición unido al desconocimiento de parte de la biología tumoral y de los mecanismos involucrados en la progresión de un tumor difuminan el papel que puede desempeñar hoy en día la biopsia líquida en el manejo de los pacientes oncológicos. Sin embargo, no cabe duda de que en el futuro adquirirá mayor relevancia.

La biopsia líquida, en definitiva, es una forma novedosa de mejorar el conocimiento sobre la variabilidad de las células tumorales que se diseminan por el organismo y que

habitualmente difieren significativamente de las células tumorales que integran la neoplasia original. Un mejor método de detección y aislamiento de CTC podría favorecer la implementación de la medicina a la carta al revelar las características moleculares del tumor e identificar marcadores para la terapia dirigida, logrando así un tratamiento efectivo.

Nuestro trabajo demuestra que los niveles pretrasplante de CTC se asocian a los principales factores de mal pronóstico conocidos y que por tanto su determinación (biopsia líquida) puede ser muy útil en el futuro con el fin de mejorar la selección de pacientes candidatos a TOH y priorizar a aquellos con mayor riesgo de progresión durante la LEQ.

En cuanto a la monitorización mediante CTC de la evolución postrasplante, podemos extraer pocas conclusiones. El papel que puede jugar la biopsia líquida a la hora de detectar cambios en la biología tumoral que favorezcan la reaparición de la enfermedad sigue sin esclarecerse. En algunos modelos en ratones ya ha quedado reflejada su utilidad a la hora de monitorizar la eficacia de la quimioterapia (sorafenib) (350) y el futuro en este campo es prometedor.

Fortalezas y debilidades del estudio

Un punto fuerte del trabajo y posiblemente el aporte más novedoso es el número de determinaciones de CTC por paciente y el seguimiento a largo plazo realizado. La mayoría de los pacientes han cumplido un seguimiento de 5 años y es razonable considerar como curados a aquellos en los que no ha reaparecido el tumor. No hemos encontrado en la literatura revisada trabajos con un seguimiento tan largo y con determinaciones seriadas de CTC en pacientes con CHC candidatos a TOH. El estudio de la asociación entre los niveles de CTC y el PET-TC realizado en este trabajo supone también una contribución importante al estudio de la biología tumoral y su relación con nuevos parámetros cuya trascendencia en la práctica clínica no deja de crecer.

Por otra parte, este trabajo adolece de las mismas limitaciones que la mayoría de estudios que se han realizado con CTC: los datos provienen de un único centro, con un pequeño tamaño muestral y un método para la detección de CTC que no ha sido estandarizado. Aunque la determinación pretrasplante se llevó a cabo en todos los casos, durante el posterior seguimiento no se pudieron realizar todas las mediciones en todos los pacientes, por lo que la fotografía obtenida sobre la evolución de los niveles de CTC resulta incompleta. Además, no se

han caracterizado las diferentes subpoblaciones de CTCs, no todas con la misma capacidad metastásica y algunas, ineficaces.

La aplicabilidad del análisis de las CTC en la práctica clínica diaria es aún un objetivo distante. Uno de los principales desafíos consiste en encontrar un método de detección que sea altamente sensible, específico y capaz de detectar la gama completa de CTC. El principal inconveniente es la gran variabilidad de estudios, en los que se emplean diferentes sistemas de detección sobre pequeños tamaños muestrales en centros únicos, lo que merma su validez externa (316). Además, los biomarcadores específicos de CHC deben validarse y debe probarse la evidencia de su asociación con la recurrencia postrasplante. En este sentido, son necesarios estudios a mayor escala, multicéntricos y con el suficiente tamaño muestral, el desarrollo y validación de un método estandarizado con alta sensibilidad y especificidad para la detección de CTC y un seguimiento prolongado de los pacientes.

Las discrepancias que existen actualmente entre los distintos métodos de selección de pacientes (criterios de Milán, uso de AFP, uso de PET) son fruto de una sensibilidad y especificidad que son mejorables. La clave para determinar la verdadera agresividad de un tumor reside en conocer sus células tumorales y los genes que expresan (marcadores). Esto será lo que nos permita pronosticar con gran precisión la evolución biológica del tumor en cada caso y elegir el tratamiento óptimo. El uso de las CTC en la práctica clínica parece aún lejano y su implementación en los algoritmos y modelos de diagnóstico, tratamiento y pronóstico se ve como una posibilidad remota. Sin embargo, no cabe duda de que la medicina a la carta en base a los marcadores genéticos individuales de cada tumor en cada paciente será una realidad. Hasta entonces, incluir las nuevas herramientas de las que disponemos, como la biopsia líquida o el PET-TC, puede ser beneficioso en la selección de un perfil favorable de pacientes con CHC candidatos a TOH.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Los niveles de CTC disminuyen al cabo de 1 y 2 años postrasplante respecto a los detectados antes de la intervención. La evolución de las concentraciones de CTC no difiere significativamente entre los pacientes que presentan recidiva tumoral y los que no, disminuyendo en ambos casos.
2. Los niveles pretrasplante de CTC se asocian a factores de mal pronóstico: son más altos en los pacientes con mayor tiempo en lista de espera, PET positivo, mayor tamaño tumoral, mayor suma del diámetro de los tumores viables y presencia de invasión microvascular.
3. Los niveles pretrasplante de AFP no se asocian a factores de mal pronóstico. Los niveles de AFP ascienden a partir del sexto mes postrasplante en los pacientes que presentan recidiva. AFP es por tanto un marcador útil para monitorizar la progresión del tumor pero no es un predictor adecuado de recidiva y supervivencia libre de enfermedad.
4. El PET positivo se asocia a una mayor concentración de CTC pretrasplante y a factores de mal pronóstico como la invasión microvascular y la suma de diámetros de tumores viables.
5. La supervivencia libre de enfermedad es menor en pacientes con un SUVmax mayor o igual a 3,5 y con unos niveles pretrasplante de CTC mayores o iguales a 9. La determinación de estos parámetros antes del trasplante es por tanto útil para predecir la recidiva.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet Lond Engl.* 2003 Dec 6;362(9399):1907–17.
2. Shariff MIF, Cox IJ, Gomaa AI, Khan SA, Gedroyc W, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009 Aug;3(4):353–67.
3. Mazzaferro V. Results of liver transplantation: with or without Milan criteria? *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2007 Nov;13(11 Suppl 2):S44-47.
4. Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Baltim Md.* 2002 Mar;35(3):519–24.
5. 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(1):35–43.
6. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1;136(5):E359-386.
7. Global Burden of Disease Liver Cancer Collaboration, Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* 2017 01;3(12):1683–91.
8. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet Lond Engl.* 1981 Nov 21;2(8256):1129–33.
9. Ryerson AB, Ehemann CR, Altekruse SF, Ward JW, Jemal A, Sherman RL, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer.* 2016 01;122(9):1312–37.
10. Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, Rota M, Bertuccio P, Malvezzi M, et al. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2016;27(5):926–33.
11. Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology Baltim Md.* 2008 Jul;48(1):137–45.
12. Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1991 Sep 5;325(10):675–80.
13. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5):1372–80.

14. Maucort-Boulch D, de Martel C, Franceschi S, Plummer M. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide. *Int J Cancer*. 2018 Jun 15;142(12):2471–7.
15. Ribes J, Clèries R, Borràs J, Galceran J, Bosch FX. Time trends in incidence and mortality for chronic liver disease and liver cancer in the interval 1980-1997 in Catalonia, Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Sep;16(9):865–72.
16. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S35-50.
17. Forner A, Reig M, Varela M, Burrel M, Feliu J, Briceño J, et al. [Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update consensus document from the AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI and SETH]. *Med Clin (Barc)*. 2016 Jun 3;146(11):511.e1-511.e22.
18. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet Lond Engl*. 2012 Mar 31;379(9822):1245–55.
19. Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatol Baltim Md*. 2011 Mar;53(3):1020–2.
20. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatol Baltim Md*. 1998 Sep;28(3):751–5.
21. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatol Baltim Md*. 2006 Jun;43(6):1303–10.
22. Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Solé M, Ayuso JR, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Baltim Md*. 2008 Jan;47(1):97–104.
23. Leoni S, Piscaglia F, Golfieri R, Camaggi V, Vidili G, Pini P, et al. The impact of vascular and nonvascular findings on the noninvasive diagnosis of small hepatocellular carcinoma based on the EASL and AASLD criteria. *Am J Gastroenterol*. 2010 Mar;105(3):599–609.
24. Chou R, Cuevas C, Fu R, Devine B, Wasson N, Ginsburg A, et al. Imaging Techniques for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2015 May 19;162(10):697–711.
25. Uka K, Aikata H, Takaki S, Shirakawa H, Jeong S-C, Yamashina K, et al. Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 21;13(3):414–20.
26. Senthilnathan S, Memon K, Lewandowski RJ, Kulik L, Mulcahy MF, Riaz A, et al. Extrahepatic metastases occur in a minority of hepatocellular carcinoma patients treated with locoregional therapies: analyzing patterns of progression in 285 patients. *Hepatol Baltim Md*. 2012 May;55(5):1432–42.

27. Yuki K, Hirohashi S, Sakamoto M, Kanai T, Shimosato Y. Growth and spread of hepatocellular carcinoma. A review of 240 consecutive autopsy cases. *Cancer*. 1990 Nov 15;66(10):2174–9.
28. Lee JW, Paeng JC, Kang KW, Kwon HW, Suh K-S, Chung J-K, et al. Prediction of Tumor Recurrence by 18F-FDG PET in Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *J Nucl Med*. 2009 May 1;50(5):682–7.
29. Lee SD, Lee B, Kim SH, Joo J, Kim S-K, Kim Y-K, et al. Proposal of new expanded selection criteria using total tumor size and (18)F-fluorodeoxyglucose - positron emission tomography/computed tomography for living donor liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: The National Cancer Center Korea criteria. *World J Transplant*. 2016 Jun 24;6(2):411–22.
30. Hsu C-C, Chen C-L, Wang C-C, Lin C-C, Yong C-C, Wang S-H, et al. Combination of FDG-PET and UCSF Criteria for Predicting HCC Recurrence After Living Donor Liver Transplantation. *Transplantation*. 2016;100(9):1925–32.
31. Hong G, Suh K-S, Suh S-W, Yoo T, Kim H, Park M-S, et al. Alpha-fetoprotein and (18)F-FDG positron emission tomography predict tumor recurrence better than Milan criteria in living donor liver transplantation. *J Hepatol*. 2016 Apr;64(4):852–9.
32. Boussouar S, Itti E, Lin S-J, Decaens T, Evangelista E, Chiaradia M, et al. Functional imaging of hepatocellular carcinoma using diffusion-weighted MRI and 18F-FDG PET/CT in patients on waiting-list for liver transplantation. *Cancer Imaging [Internet]*. 2016 Feb 16 [cited 2020 Jul 26];16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4756529/>
33. Lin C-Y, Liao C-W, Chu L-Y, Yen K-Y, Jeng L-B, Hsu C-N, et al. Predictive Value of 18F-FDG PET/CT for Vascular Invasion in Patients With Hepatocellular Carcinoma Before Liver Transplantation. *Clin Nucl Med*. 2017 Apr;42(4):e183–7.
34. Detry O, Govaerts L, Deroover A, Vandermeulen M, Meurisse N, Malenga S, et al. Prognostic value of (18)F-FDG PET/CT in liver transplantation for hepatocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 14;21(10):3049–54.
35. Yoon KT, Kim JK, Kim DY, Ahn SH, Lee JD, Yun M, et al. Role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in detecting extrahepatic metastasis in pretreatment staging of hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2007;72 Suppl 1:104–10.
36. Shiomi S, Nishiguchi S, Ishizu H, Iwata Y, Sasaki N, Tamori A, et al. Usefulness of positron emission tomography with fluorine-18-fluorodeoxyglucose for predicting outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2001 Jun;96(6):1877–80.
37. Cascales-Campos PA, Romero PR, Schneider MA, Lopez-Lopez V, Navarro JL, Frutos L, et al. Positron emission tomography/computed tomography in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation. Useful, necessary or irrelevant? *Eur J Radiol*. 2017 Jun 1;91:155–9.
38. Lu R-C, She B, Gao W-T, Ji Y-H, Xu D-D, Wang Q-S, et al. Positron-emission tomography for hepatocellular carcinoma: Current status and future prospects. *World J Gastroenterol*. 2019 Aug 28;25(32):4682–95.

39. Park J-W, Kim JH, Kim SK, Kang KW, Park KW, Choi J-I, et al. A prospective evaluation of 18F-FDG and 11C-acetate PET/CT for detection of primary and metastatic hepatocellular carcinoma. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2008 Dec;49(12):1912–21.
40. Khan MA, Combs CS, Brunt EM, Lowe VJ, Wolverson MK, Solomon H, et al. Positron emission tomography scanning in the evaluation of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2000 May;32(5):792–7.
41. Okazumi S, Isono K, Enomoto K, Kikuchi T, Ozaki M, Yamamoto H, et al. Evaluation of liver tumors using fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET: characterization of tumor and assessment of effect of treatment. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 1992 Mar;33(3):333–9.
42. Jo H, Lee J, Jeon J, Kim S yoo, Chung J, Ko H yong, et al. The critical role of glucose deprivation in epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma under hypoxia. *Sci Rep [Internet]*. 2020 Jan 30 [cited 2020 Jul 26];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6992695/>
43. Castilla-Lièvre M-A, Franco D, Gervais P, Kuhnast B, Agostini H, Marthey L, et al. Diagnostic value of combining ¹¹C-choline and ¹⁸F-FDG PET/CT in hepatocellular carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016 May;43(5):852–9.
44. Cheung TT, Ho CL, Lo CM, Chen S, Chan SC, Chok KSH, et al. 11C-acetate and 18F-FDG PET/CT for clinical staging and selection of patients with hepatocellular carcinoma for liver transplantation on the basis of Milan criteria: surgeon’s perspective. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2013 Feb;54(2):192–200.
45. Yamamoto Y, Nishiyama Y, Kameyama R, Okano K, Kashiwagi H, Deguchi A, et al. Detection of hepatocellular carcinoma using 11C-choline PET: comparison with 18F-FDG PET. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2008 Aug;49(8):1245–8.
46. Song H-J, Cheng J-Y, Hu S-L, Zhang G-Y, Fu Y, Zhang Y-J. Value of 18F-FDG PET/CT in detecting viable tumour and predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after TACE. *Clin Radiol*. 2015 Feb 1;70(2):128–37.
47. Hyun SH, Eo JS, Song B-I, Lee JW, Na SJ, Hong IK, et al. Preoperative prediction of microvascular invasion of hepatocellular carcinoma using 18F-FDG PET/CT: a multicenter retrospective cohort study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2018;45(5):720–6.
48. Kang Y-K, Choi JY, Paeng JC, Kim Y-I, Kwon HW, Cheon GJ, et al. Composite criteria using clinical and FDG PET/CT factors for predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. *Eur Radiol*. 2019 Nov;29(11):6009–17.
49. Lee SM, Kim HS, Lee S, Lee JW. Emerging role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for guiding management of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2019 Mar 21;25(11):1289–306.
50. Yang SH, Suh K-S, Lee HW, Cho E-H, Cho JY, Cho YB, et al. The role of (18)F-FDG-PET imaging for the selection of liver transplantation candidates among hepatocellular carcinoma patients. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2006 Nov;12(11):1655–60.

51. Kornberg A, Freesmeyer M, Bärthel E, Jandt K, Katenkamp K, Steenbeck J, et al. 18F-FDG-uptake of hepatocellular carcinoma on PET predicts microvascular tumor invasion in liver transplant patients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2009 Mar;9(3):592–600.
52. Kornberg A, Küpper B, Tannapfel A, Büchler P, Krause B, Witt U, et al. Patients with non-[18 F]fludeoxyglucose-avid advanced hepatocellular carcinoma on clinical staging may achieve long-term recurrence-free survival after liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2012 Jan;18(1):53–61.
53. Lee SD, Kim SH, Kim Y-K, Kim C, Kim S-K, Han S-S, et al. (18)F-FDG-PET/CT predicts early tumor recurrence in living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2013 Jan;26(1):50–60.
54. Kornberg A, Witt U, Schernhammer M, Kornberg J, Ceyhan GO, Mueller K, et al. Combining 18F-FDG positron emission tomography with Up-to-seven criteria for selecting suitable liver transplant patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Sci Rep [Internet].* 2017 Oct 26 [cited 2020 Jul 26];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5658419/>
55. Cho Y, Lee DH, Lee YB, Lee M, Yoo J, Choi W, et al. Does 18F-FDG Positron Emission Tomography-Computed Tomography Have a Role in Initial Staging of Hepatocellular Carcinoma? *PLOS ONE.* 2014 ago;9(8):e105679.
56. Lee SD, Kim SH, Kim S-K, Kim Y-K, Park S-J. Clinical Impact of 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography/Computed Tomography in Living Donor Liver Transplantation for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Transplantation.* 2015 Oct;99(10):2142–9.
57. Hyun SH, Eo JS, Lee JW, Choi JY, Lee K-H, Na SJ, et al. Prognostic value of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in patients with Barcelona Clinic Liver Cancer stages 0 and A hepatocellular carcinomas: a multicenter retrospective cohort study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2016 Aug 1;43(9):1638–45.
58. Kobayashi T, Aikata H, Honda F, Nakano N, Nakamura Y, Hatooka M, et al. Preoperative Fluorine 18 Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Prediction of Microvascular Invasion in Small Hepatocellular Carcinoma. *J Comput Assist Tomogr.* 2016 Aug;40(4):524–30.
59. Kim Y, Paeng JC, Cheon GJ, Suh K-S, Lee DS, Chung J-K, et al. Prediction of Posttransplantation Recurrence of Hepatocellular Carcinoma Using Metabolic and Volumetric Indices of 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med.* 2016 Jul 1;57(7):1045–51.
60. Bailly M, Venel Y, Orain I, Salamé E, Ribeiro M-J. 18F-FDG PET in Liver Transplantation Setting of Hepatocellular Carcinoma: Predicting Histology? *Clin Nucl Med.* 2016 Mar;41(3):e126-129.
61. Takada Y, Kaido T, Shirabe K, Nagano H, Egawa H, Sugawara Y, et al. Significance of preoperative fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in prediction of tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma patients: a Japanese multicenter study. *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci.* 2017 Jan;24(1):49–57.

62. Ye Y-F, Wang W, Wang T, Yu J, Geng L, Yu S-F, et al. Role of [18F] fludeoxyglucose positron emission tomography in the selection of liver transplantation candidates in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int HBPD INT*. 2017 Jun;16(3):257–63.
63. Refaat R, Basha MAA, Hassan MS, Hussein RS, El Sammak AA, El Sammak DAEA, et al. Efficacy of contrast-enhanced FDG PET/CT in patients awaiting liver transplantation with rising alpha-fetoprotein after bridge therapy of hepatocellular carcinoma. *Eur Radiol*. 2018 Dec 1;28(12):5356–67.
64. Ling LL-L, Hsu C-C, Yong C-C, Elsarawy AM, Chan Y-C, Wang C-C, et al. FDG-PET predicted unfavorable tumor histology in living donor liver transplant recipients; a retrospective cohort study. *Int J Surg Lond Engl*. 2019 Sep;69:124–31.
65. Ding E, Lu D, Wei L, Feng X, Shen J, Xu W. Predicting tumor recurrence using metabolic indices of 18F-FDG PET/CT prior to orthotopic liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2020 Aug;20(2):1245–55.
66. Cascales Campos P, Ramirez P, Gonzalez R, Febrero B, Pons JA, Miras M, et al. Value of 18-FDG-positron emission tomography/computed tomography before and after transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation: initial results. *Transplant Proc*. 2011 Aug;43(6):2213–5.
67. Lee JH, Park JY, Kim DY, Ahn SH, Han K-H, Seo HJ, et al. Prognostic value of 18F-FDG PET for hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2011 Sep;31(8):1144–9.
68. Hermann A-L, Dieudonné A, Ronot M, Sanchez M, Pereira H, Chatellier G, et al. Relationship of Tumor Radiation-absorbed Dose to Survival and Response in Hepatocellular Carcinoma Treated with Transarterial Radioembolization with 90Y in the SARAH Study. *Radiology*. 2020 Jun 30;191606.
69. Chen DS, Sung JL, Sheu JC, Lai MY, How SW, Hsu HC, et al. Serum alpha-fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 1984 Jun;86(6):1404–9.
70. Bialecki ES, Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB*. 2005;7(1):26–34.
71. Farinati F, Marino D, De Giorgio M, Baldan A, Cantarini M, Cursaro C, et al. Diagnostic and prognostic role of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: both or neither? *Am J Gastroenterol*. 2006 Mar;101(3):524–32.
72. Charrière B, Maulat C, Suc B, Muscari F. Contribution of alpha-fetoprotein in liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2016 Jul 28;8(21):881–90.
73. Vibert E, Azoulay D, Hoti E, Iacopinelli S, Samuel D, Salloum C, et al. Progression of alphafetoprotein before liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a critical factor. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2010 Jan;10(1):129–37.

74. Lai Q, Avolio AW, Graziadei I, Otto G, Rossi M, Tisone G, et al. Alpha-fetoprotein and modified response evaluation criteria in solid tumors progression after locoregional therapy as predictors of hepatocellular cancer recurrence and death after transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2013 Oct;19(10):1108–18.
75. Dumitra TC, Dumitra S, Metrakos PP, Barkun JS, Chaudhury P, Deschênes M, et al. Pretransplantation α -fetoprotein slope and milan criteria: strong predictors of hepatocellular carcinoma recurrence after transplantation. *Transplantation.* 2013 Jan 15;95(1):228–33.
76. Han K, Tzimas GN, Barkun JS, Metrakos P, Tchervenkov JL, Hilzenrat N, et al. Preoperative alpha-fetoprotein slope is predictive of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol.* 2007 Jan;21(1):39–45.
77. Grąt M, Wronka KM, Stypułkowski J, Bik E, Krasnodębski M, Masiór Ł, et al. The Warsaw Proposal for the Use of Extended Selection Criteria in Liver Transplantation for Hepatocellular Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2017;24(2):526–34.
78. Piñero F, Marciano S, Anders M, Orozco Ganem F, Zerega A, Cagliani J, et al. Identifying patients at higher risk of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation in a multicenter cohort study from Argentina. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2016 Apr;28(4):421–7.
79. Lagana SM, Salomao M, Bao F, Moreira RK, Lefkowitz JH, Remotti HE. Utility of an immunohistochemical panel consisting of glypican-3, heat-shock protein-70, and glutamine synthetase in the distinction of low-grade hepatocellular carcinoma from hepatocellular adenoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2013 Mar;21(2):170–6.
80. 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 Oct;61(10):1481–7.
81. Zhang B, Yang B. Combined alpha fetoprotein testing and ultrasonography as a screening test for primary liver cancer. *J Med Screen.* 1999;6(2):108–10.
82. Andersson KL, Salomon JA, Goldie SJ, Chung RT. Cost effectiveness of alternative surveillance strategies for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2008 Dec;6(12):1418–24.
83. Trinchet J-C, Chaffaut C, Bourcier V, Degos F, Henrion J, Fontaine H, et al. Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatol Baltim Md.* 2011 Dec;54(6):1987–97.
84. Singal A, Volk ML, Waljee A, Salgia R, Higgins P, Rogers M a. M, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009 Jul;30(1):37–47.

85. Forner A, Reig M, Bruix J. Alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis: the demise of a brilliant star. *Gastroenterology*. 2009 Jul;137(1):26–9.
86. 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 Feb;33(2):464–70.
87. Verger E, Salameo M, Conill C. Can Karnofsky performance status be transformed to the Eastern Cooperative Oncology Group scoring scale and vice versa? *Eur J Cancer*. 1992;28A(8–9):1328–30.
88. Sørensen JB, Klee M, Palshof T, Hansen HH. Performance status assessment in cancer patients. An inter-observer variability study. *Br J Cancer*. 1993 Apr;67(4):773–5.
89. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*. 1999;19(3):329–38.
90. Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxì A, Cammà C. A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1274–83.
91. Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2016 Apr;150(4):835–53.
92. 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 Mar;67(2):93–9.
93. Goh BKP, Teo J-Y, Chan C-Y, Lee S-Y, Jeyaraj P, Cheow P-C, et al. Importance of tumor size as a prognostic factor after partial liver resection for solitary hepatocellular carcinoma: Implications on the current AJCC staging system. *J Surg Oncol*. 2016 Jan;113(1):89–93.
94. Minagawa M, Ikai I, Matsuyama Y, Yamaoka Y, Makuuchi M. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the Japanese TNM and AJCC/UICC TNM systems in a cohort of 13,772 patients in Japan. *Ann Surg*. 2007 Jun;245(6):909–22.
95. Fong Y, Sun RL, Jarnagin W, Blumgart LH. An analysis of 412 cases of hepatocellular carcinoma at a Western center. *Ann Surg*. 1999 Jun;229(6):790–9; discussion 799-800.
96. Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, et al. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008 Jun;134(7):1908–16.
97. Fuks D, Dokmak S, Paradis V, Diouf M, Durand F, Belghiti J. Benefit of initial resection of hepatocellular carcinoma followed by transplantation in case of recurrence: an intention-to-treat analysis. *Hepatology*. 2012 Jan;55(1):132–40.
98. Roayaie S, Obeidat K, Sposito C, Mariani L, Bhoori S, Pellegrinelli A, et al. Resection of hepatocellular cancer ≤ 2 cm: results from two Western centers. *Hepatology*. 2013 Apr;57(4):1426–35.

99. Takenaka K, Kanematsu T, Fukuzawa K, Sugimachi K. Can hepatic failure after surgery for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients be prevented? *World J Surg.* 1990 Feb;14(1):123–7.
100. Nagasue N, Kohno H, Chang YC, Taniura H, Yamanoi A, Uchida M, et al. Liver resection for hepatocellular carcinoma. Results of 229 consecutive patients during 11 years. *Ann Surg.* 1993 Apr;217(4):375–84.
101. Nathan H, Schulick RD, Choti MA, Pawlik TM. Predictors of survival after resection of early hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2009 May;249(5):799–805.
102. Nanashima A, Yamaguchi H, Shibasaki S, Ide N, Morino S, Sumida Y, et al. Comparative analysis of postoperative morbidity according to type and extent of hepatectomy. *Hepatogastroenterology.* 2005 Jun;52(63):844–8.
103. Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ, Damrah O, Tait P, Jackson J, et al. Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg.* 2008 Jan;247(1):49–57.
104. Ogata S, Belghiti J, Farges O, Varma D, Sibert A, Vilgrain V. Sequential arterial and portal vein embolizations before right hepatectomy in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Br J Surg.* 2006 Sep;93(9):1091–8.
105. Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, Ichida T, Kudo M, et al. Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: a cohort study based on a Japanese nationwide survey. *J Hepatol.* 2013 Apr;58(4):724–9.
106. Bruix J, Takayama T, Mazzaferro V, Chau G-Y, Yang J, Kudo M, et al. Adjuvant sorafenib for hepatocellular carcinoma after resection or ablation (STORM): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 2015 Oct;16(13):1344–54.
107. Penn I. Hepatic transplantation for primary and metastatic cancers of the liver. *Surgery.* 1991 Oct;110(4):726–34; discussion 734-735.
108. Ringe B, Pichlmayr R, Wittekind C, Tusch G. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: experience with liver resection and transplantation in 198 patients. *World J Surg.* 1991 Apr;15(2):270–85.
109. Iwatsuki S, Starzl TE, Sheahan DG, Yokoyama I, Demetris AJ, Todo S, et al. Hepatic resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 1991 Sep;214(3):221–8; discussion 228-229.
110. Yang JD, Larson JJ, Watt KD, Allen AM, Wiesner RH, Gores GJ, et al. Hepatocellular Carcinoma Is the Most Common Indication for Liver Transplantation and Placement on the Waitlist in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2017 May;15(5):767-775.e3.
111. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996 Mar 14;334(11):693–9.

112. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* Baltim Md. 2001 Jun;33(6):1394–403.
113. Majno P, Lencioni R, Mornex F, Girard N, Poon RT, Cherqui D. Is the treatment of hepatocellular carcinoma on the waiting list necessary? *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2011 Oct;17 Suppl 2:S98-108.
114. Yao FY, Bass NM, Nikolai B, Merriman R, Davern TJ, Kerlan R, et al. A follow-up analysis of the pattern and predictors of dropout from the waiting list for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: implications for the current organ allocation policy. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2003 Jul;9(7):684–92.
115. Dubbeld J, Hoekstra H, Farid W, Ringers J, Porte RJ, Metselaar HJ, et al. Similar liver transplantation survival with selected cardiac death donors and brain death donors. *Br J Surg.* 2010 May;97(5):744–53.
116. O'Neill S, Roebuck A, Khoo E, Wigmore SJ, Harrison EM. A meta-analysis and meta-regression of outcomes including biliary complications in donation after cardiac death liver transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2014 Nov;27(11):1159–74.
117. Barbier L, Cesaretti M, Dondero F, Cauchy F, Khoy-Ear L, Aoyagi T, et al. Liver Transplantation With Older Donors: A Comparison With Younger Donors in a Context of Organ Shortage. *Transplantation.* 2016 Nov;100(11):2410–5.
118. Campos PAC, Romero PR, Gonzalez R, Zambudio AR, Frutos IMM, Peña J de la, et al. Improving the Waiting List by Using 75-Year-Old Donors for Recipients With Hepatocellular Carcinoma. *Transplant Proc.* 2010 Mar 1;42(2):627–30.
119. Chapman WC, Vachharajani N, Collins KM, Garonzik-Wang J, Park Y, Wellen JR, et al. Donor Age-Based Analysis of Liver Transplantation Outcomes: Short- and Long-Term Outcomes Are Similar Regardless of Donor Age. *J Am Coll Surg.* 2015 Jul;221(1):59–69.
120. Darius T, Monbaliu D, Jochmans I, Meurisse N, Desschans B, Coosemans W, et al. Septuagenarian and octogenarian donors provide excellent liver grafts for transplantation. *Transplant Proc.* 2012 Nov;44(9):2861–7.
121. Todo S, Furukawa H, Japanese Study Group on Organ Transplantation. Living donor liver transplantation for adult patients with hepatocellular carcinoma: experience in Japan. *Ann Surg.* 2004 Sep;240(3):451–9; discussion 459-461.
122. Heimbach JK, Hirose R, Stock PG, Schladt DP, Xiong H, Liu J, et al. Delayed hepatocellular carcinoma model for end-stage liver disease exception score improves disparity in access to liver transplant in the United States. *Hepatology* Baltim Md. 2015 May;61(5):1643–50.
123. Pomfret EA, Washburn K, Wald C, Nalesnik MA, Douglas D, Russo M, et al. Report of a national conference on liver allocation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2010 Mar;16(3):262–78.

124. Clavien P-A, Lesurtel M, Bossuyt PMM, Gores GJ, Langer B, Perrier A, et al. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol*. 2012 Jan;13(1):e11-22.
125. European Association For The Study Of The Liver, European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012 Apr;56(4):908-43.
126. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Baltim Md*. 2018;67(1):358-80.
127. Chan K-M, Yu M-C, Chou H-S, Wu T-J, Lee C-F, Lee W-C. Significance of tumor necrosis for outcome of patients with hepatocellular carcinoma receiving locoregional therapy prior to liver transplantation. *Ann Surg Oncol*. 2011 Sep;18(9):2638-46.
128. Bharat A, Brown DB, Crippin JS, Gould JE, Lowell JA, Shenoy S, et al. Pre-liver transplantation locoregional adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma as a strategy to improve longterm survival. *J Am Coll Surg*. 2006 Oct;203(4):411-20.
129. Sourianarayanan A, El-Gazzaz G, Sanabria JR, Menon KVN, Quintini C, Hashimoto K, et al. Loco-regional therapy in patients with Milan Criteria-compliant hepatocellular carcinoma and short waitlist time to transplant: an outcome analysis. *HPB*. 2012 May;14(5):325-32.
130. Golse N, Radenne S, Rode A, Ducerf C, Mabrut J-Y, Merle P. Liver Transplantation After Neoadjuvant Sorafenib Therapy: Preliminary Experience and Literature Review. *Exp Clin Transplant Off J Middle East Soc Organ Transplant*. 2018 Apr;16(2):227-36.
131. Qi H-L, Zhuang B-J, Li C-S, Liu Q-Y. Peri-operative use of sorafenib in liver transplantation: a time-to-event meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2015 Feb 7;21(5):1636-40.
132. Figueras J, Jaurrieta E, Valls C, Benasco C, Rafecas A, Xiol X, et al. Survival after liver transplantation in cirrhotic patients with and without hepatocellular carcinoma: a comparative study. *Hepatol Baltim Md*. 1997 Jun;25(6):1485-9.
133. Wong SN, Reddy KR, Keeffe EB, Han S-H, Gaglio PJ, Perrillo RP, et al. Comparison of clinical outcomes in chronic hepatitis B liver transplant candidates with and without hepatocellular carcinoma. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2007 Mar;13(3):334-42.
134. Maggs JRL, Suddle AR, Aluvihare V, Heneghan MA. Systematic review: the role of liver transplantation in the management of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012 May;35(10):1113-34.
135. Regalia E, Fassati LR, Valente U, Pulvirenti A, Damilano I, Dardano G, et al. Pattern and management of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 1998;5(1):29-34.
136. Bodzin AS, Lunsford KE, Markovic D, Harlander-Locke MP, Busuttill RW, Agopian VG. Predicting Mortality in Patients Developing Recurrent Hepatocellular Carcinoma After

- Liver Transplantation: Impact of Treatment Modality and Recurrence Characteristics. *Ann Surg.* 2017;266(1):118–25.
137. Nagai S, Mangus RS, Kubal CA, Ekser B, Fridell JA, Klingler KR, et al. Prognosis after recurrence of hepatocellular carcinoma in liver transplantation: predictors for successful treatment and survival. *Clin Transplant.* 2015 Dec;29(12):1156–63.
 138. de'Angelis N, Landi F, Carra MC, Azoulay D. Managements of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: A systematic review. *World J Gastroenterol.* 2015 Oct 21;21(39):11185–98.
 139. Guerrini GP, Berretta M, Tarantino G, Magistri P, Pecchi A, Ballarin R, et al. Multimodal oncological approach in patients affected by recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Aug;21(15):3421–35.
 140. Filgueira NA. Hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation: Risk factors, screening and clinical presentation. *World J Hepatol.* 2019 Mar 27;11(3):261–72.
 141. Germani G, Gurusamy K, Garcovich M, Toso C, Fede G, Hemming A, et al. Which matters most: number of tumors, size of the largest tumor, or total tumor volume? *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2011 Oct;17 Suppl 2:S58-66.
 142. Welling TH, Eddinger K, Carrier K, Zhu D, Kleaveland T, Moore DE, et al. Multicenter Study of Staging and Therapeutic Predictors of Hepatocellular Carcinoma Recurrence Following Transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2018;24(9):1233–42.
 143. Rodríguez-Perálvarez M, Luong TV, Andreana L, Meyer T, Dhillon AP, Burroughs AK. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol.* 2013 Jan;20(1):325–39.
 144. Roayaie S, Haim MB, Emre S, Fishbein TM, Sheiner PA, Miller CM, et al. Comparison of surgical outcomes for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B versus hepatitis C: a western experience. *Ann Surg Oncol.* 2000 Dec;7(10):764–70.
 145. Zanetto A, Shalaby S, Vitale A, Mescoli C, Ferrarese A, Gambato M, et al. Dropout rate from the liver transplant waiting list because of hepatocellular carcinoma progression in hepatitis C virus-infected patients treated with direct-acting antivirals. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2017;23(9):1103–12.
 146. Wu T-J, Chan K-M, Chou H-S, Lee C-F, Wu T-H, Chen T-C, et al. Liver transplantation in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: the influence of viral characteristics on clinical outcome. *Ann Surg Oncol.* 2013 Oct;20(11):3582–90.
 147. Siegel AB, Lim EA, Wang S, Brubaker W, Rodriguez RD, Goyal A, et al. Diabetes, body mass index, and outcomes in hepatocellular carcinoma patients undergoing liver transplantation. *Transplantation.* 2012 Sep 15;94(5):539–43.

148. Mathur A, Franco ES, Leone JP, Osman-Mohamed H, Rojas H, Kemmer N, et al. Obesity portends increased morbidity and earlier recurrence following liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *HPB*. 2013 Jul;15(7):504–10.
149. Lewin SM, Mehta N, Kelley RK, Roberts JP, Yao FY, Brandman D. Liver transplantation recipients with nonalcoholic steatohepatitis have lower risk hepatocellular carcinoma. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2017;23(8):1015–22.
150. Sadler EM, Mehta N, Bhat M, Ghanekar A, Greig PD, Grant DR, et al. Liver Transplantation for NASH-Related Hepatocellular Carcinoma Versus Non-NASH Etiologies of Hepatocellular Carcinoma. *Transplantation*. 2018;102(4):640–7.
151. Agopian VG, Harlander-Locke MP, Ruiz RM, Klintmalm GB, Senguttuvan S, Florman SS, et al. Impact of Pretransplant Bridging Locoregional Therapy for Patients With Hepatocellular Carcinoma Within Milan Criteria Undergoing Liver Transplantation: Analysis of 3601 Patients From the US Multicenter HCC Transplant Consortium. *Ann Surg*. 2017;266(3):525–35.
152. Kulik L, Heimbach JK, Zaiem F, Almasri J, Prokop LJ, Wang Z, et al. Therapies for patients with hepatocellular carcinoma awaiting liver transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Hepatol Baltim Md*. 2018;67(1):381–400.
153. Mehta N, Heimbach J, Lee D, Dodge JL, Harnois D, Burns J, et al. Wait Time of Less Than 6 and Greater Than 18 Months Predicts Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Liver Transplantation: Proposing a Wait Time ‘Sweet Spot’. *Transplantation*. 2017;101(9):2071–8.
154. Vivarelli M, Bellusci R, Cucchetti A, Cavrini G, De Ruvo N, Aden AA, et al. Low recurrence rate of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: better patient selection or lower immunosuppression? *Transplantation*. 2002 Dec 27;74(12):1746–51.
155. Vivarelli M, Cucchetti A, Piscaglia F, La Barba G, Bolondi L, Cavallari A, et al. Analysis of risk factors for tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: key role of immunosuppression. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2005 May;11(5):497–503.
156. Menon KV, Hakeem AR, Heaton ND. Meta-analysis: recurrence and survival following the use of sirolimus in liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Feb;37(4):411–9.
157. Yokoyama I, Carr B, Saito H, Iwatsuki S, Starzl TE. Accelerated growth rates of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Cancer*. 1991 Nov 15;68(10):2095–100.
158. Pokorny H, Gnant M, Rasoul-Rockenschaub S, Gollackner B, Steiner B, Steger G, et al. Does additional doxorubicin chemotherapy improve outcome in patients with hepatocellular carcinoma treated by liver transplantation? *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2005 Apr;5(4 Pt 1):788–94.
159. Söderdahl G, Bäckman L, Isoniemi H, Cahlin C, Höckerstedt K, Broomé U, et al. A prospective, randomized, multi-centre trial of systemic adjuvant chemotherapy versus

- no additional treatment in liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2006 Apr;19(4):288–94.
160. Xu J, Shen Z-Y, Chen X-G, Zhang Q, Bian H-J, Zhu P, et al. A randomized controlled trial of Licartin for preventing hepatoma recurrence after liver transplantation. *Hepatol Baltim Md*. 2007 Feb;45(2):269–76.
 161. Siegel AB, El-Khoueiry AB, Finn RS, Guthrie KA, Goyal A, Venook AP, et al. Phase I trial of sorafenib following liver transplantation in patients with high-risk hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer*. 2015 Mar;4(2):115–25.
 162. Sapisochin G, Goldaracena N, Astete S, Laurence JM, Davidson D, Rafael E, et al. Benefit of Treating Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Liver Transplantation and Analysis of Prognostic Factors for Survival in a Large Euro-American Series. *Ann Surg Oncol*. 2015 Jul;22(7):2286–94.
 163. Goldaracena N, Mehta N, Scalera I, Sposito C, Atenafu EG, Yao FY, et al. Multicenter validation of a score to predict prognosis after the development of HCC recurrence following liver transplantation. *HPB*. 2019;21(6):731–8.
 164. Ecker BL, Hoteit MA, Forde KA, Hsu CC, Reddy KR, Furth EE, et al. Patterns of Discordance Between Pretransplant Imaging Stage of Hepatocellular Carcinoma and Posttransplant Pathologic Stage: A Contemporary Appraisal of the Milan Criteria. *Transplantation*. 2018;102(4):648–55.
 165. Piñero F, Tisi Baña M, de Ataide EC, Hoyos Duque S, Marciano S, Varón A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: evaluation of the alpha-fetoprotein model in a multicenter cohort from Latin America. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2016;36(11):1657–67.
 166. Mehta N, Heimbach J, Harnois DM, Sapisochin G, Dodge JL, Lee D, et al. Validation of a Risk Estimation of Tumor Recurrence After Transplant (RETREAT) Score for Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Liver Transplant. *JAMA Oncol*. 2016 Nov 13;
 167. Mehta N, Dodge JL, Roberts JP, Yao FY. Validation of the prognostic power of the RETREAT score for hepatocellular carcinoma recurrence using the UNOS database. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2018 May;18(5):1206–13.
 168. Halazun KJ, Najjar M, Abdelmessih RM, Samstein B, Griesemer AD, Guarrera JV, et al. Recurrence After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: A New MORAL to the Story. *Ann Surg*. 2017 Mar;265(3):557–64.
 169. Lee J-H, Cho Y, Kim HY, Cho EJ, Lee DH, Yu SJ, et al. Serum Tumor Markers Provide Refined Prognostication in Selecting Liver Transplantation Candidate for Hepatocellular Carcinoma Patients Beyond the Milan Criteria. *Ann Surg*. 2016 May;263(5):842–50.
 170. Duvoux C, Roudot–Thoraval F, Decaens T, Pessione F, Badran H, Piardi T, et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: A Model Including α -Fetoprotein Improves the Performance of Milan Criteria. *Gastroenterology*. 2012 Oct 1;143(4):986–994.e3.

171. Al-Ameri AAM, Wei X, Wen X, Wei Q, Guo H, Zheng S, et al. Systematic review: risk prediction models for recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Transpl Int*. 2020;33(7):697–712.
172. Rhu J, Kim JM, Choi GS, Kwon CHD, Joh J-W. Validation of the α -fetoprotein Model for Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Transplantation in an Asian Population. *Transplantation*. 2018;102(8):1316–22.
173. Varona MA, Soriano A, Aguirre-Jaime A, Garrido S, Oton E, Diaz D, et al. Risk factors of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation: accuracy of the alpha-fetoprotein model in a single-center experience. *Transplant Proc*. 2015 Feb;47(1):84–9.
174. Kashkoush S, El Moghazy W, Kawahara T, Gala-Lopez B, Toso C, Kneteman NM. Three-dimensional tumor volume and serum alpha-fetoprotein are predictors of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation: refined selection criteria. *Clin Transplant*. 2014 Jun;28(6):728–36.
175. Toso C, Meeberg G, Hernandez-Alejandro R, Dufour J-F, Marotta P, Majno P, et al. Total tumor volume and alpha-fetoprotein for selection of transplant candidates with hepatocellular carcinoma: A prospective validation. *Hepatology*. 2015 Jul;62(1):158–65.
176. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Bacchetti P, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: comparison of the proposed UCSF criteria with the Milan criteria and the Pittsburgh modified TNM criteria. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2002 Sep;8(9):765–74.
177. Ito T, Takada Y, Ueda M, Haga H, Maetani Y, Oike F, et al. Expansion of selection criteria for patients with hepatocellular carcinoma in living donor liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2007 Dec;13(12):1637–44.
178. Onaca N, Davis GL, Goldstein RM, Jennings LW, Klintmalm GB. Expanded criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: a report from the International Registry of Hepatic Tumors in Liver Transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2007 Mar;13(3):391–9.
179. Toso C, Asthana S, Bigam DL, Shapiro AMJ, Kneteman NM. Reassessing selection criteria prior to liver transplantation for hepatocellular carcinoma utilizing the Scientific Registry of Transplant Recipients database. *Hepatology*. 2009 Mar;49(3):832–8.
180. Duffy JP, Vardanian A, Benjamin E, Watson M, Farmer DG, Ghobrial RM, et al. Liver transplantation criteria for hepatocellular carcinoma should be expanded: a 22-year experience with 467 patients at UCLA. *Ann Surg*. 2007 Sep;246(3):502–9; discussion 509-511.
181. Muscari F, Foppa B, Kamar N, Peron JM, Selves J, Suc B. Liberal selection criteria for liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg*. 2009 Jul;96(7):785–91.
182. Aravinthan AD, Bruni SG, Doyle AC, Thein H-H, Goldaracena N, Issachar A, et al. Liver Transplantation is a Preferable Alternative to Palliative Therapy for Selected Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2017 Jul;24(7):1843–51.

183. Yao FY, Mehta N, Flemming J, Dodge J, Hameed B, Fix O, et al. Downstaging of hepatocellular cancer before liver transplant: long-term outcome compared to tumors within Milan criteria. *Hepatology*. 2015 Jun;61(6):1968–77.
184. De Luna W, Sze DY, Ahmed A, Ha BY, Ayoub W, Keeffe EB, et al. Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma as downstaging therapy and a bridge toward liver transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2009 May;9(5):1158–68.
185. Chapman WC, Majella Doyle MB, Stuart JE, Vachharajani N, Crippin JS, Anderson CD, et al. Outcomes of neoadjuvant transarterial chemoembolization to downstage hepatocellular carcinoma before liver transplantation. *Ann Surg*. 2008 Oct;248(4):617–25.
186. Ravaioli M, Grazi GL, Piscaglia F, Trevisani F, Cescon M, Ercolani G, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: results of down-staging in patients initially outside the Milan selection criteria. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2008 Dec;8(12):2547–57.
187. Parikh ND, Waljee AK, Singal AG. Downstaging hepatocellular carcinoma: A systematic review and pooled analysis. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2015 Sep;21(9):1142–52.
188. Gordon-Weeks AN, Snaith A, Petrinic T, Friend PJ, Burls A, Silva MA. Systematic review of outcome of downstaging hepatocellular cancer before liver transplantation in patients outside the Milan criteria. *Br J Surg*. 2011 Sep;98(9):1201–8.
189. Barakat O, Wood RP, Ozaki CF, Ankoma-Sey V, Galati J, Skolkin M, et al. Morphological features of advanced hepatocellular carcinoma as a predictor of downstaging and liver transplantation: an intention-to-treat analysis. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2010 Mar;16(3):289–99.
190. Volk ML, Vijan S, Marrero JA. A Novel Model Measuring the Harm of Transplanting Hepatocellular Carcinoma Exceeding Milan Criteria. *Am J Transplant*. 2008 Apr 1;8(4):839–46.
191. Tsuchiya M, Parker JS, Kono H, Matsuda M, Fujii H, Rusyn I. Gene expression in nontumoral liver tissue and recurrence-free survival in hepatitis C virus-positive hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 2010 Apr 9;9:74.
192. Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008 Nov 6;359(19):1995–2004.
193. Marsh JW, Finkelstein SD, Demetris AJ, Swalsky PA, Sasatomi E, Bandos A, et al. Genotyping of hepatocellular carcinoma in liver transplant recipients adds predictive power for determining recurrence-free survival. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2003 Jul;9(7):664–71.
194. Ramirez P, Sáenz L, Cascales-Campos PA, González Sánchez MR, Llàcer-Millán E, Sánchez-Lorencio MI, et al. Oncological Evaluation by Positron-emission Tomography, Circulating Tumor Cells and Alpha Fetoprotein in Patients With Hepatocellular

- Carcinoma on the Waiting List for Liver Transplantation. *Transplant Proc.* 2016 Nov;48(9):2962–5.
195. Nault J-C, Sutter O, Nahon P, Ganne-Carrié N, Séror O. Percutaneous treatment of hepatocellular carcinoma: State of the art and innovations. *J Hepatol.* 2017 Oct 13;
 196. Choi D, Lim HK, Kim MJ, Lee SH, Kim SH, Lee WJ, et al. Recurrent hepatocellular carcinoma: percutaneous radiofrequency ablation after hepatectomy. *Radiology.* 2004 Jan;230(1):135–41.
 197. McGahan JP, Brock JM, Tesluk H, Gu WZ, Schneider P, Browning PD. Hepatic ablation with use of radio-frequency electrocautery in the animal model. *J Vasc Interv Radiol JVIR.* 1992 May;3(2):291–7.
 198. Sainani NI, Gervais DA, Mueller PR, Arellano RS. Imaging after percutaneous radiofrequency ablation of hepatic tumors: Part 1, Normal findings. *AJR Am J Roentgenol.* 2013 Jan;200(1):184–93.
 199. Tateishi R, Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Koike Y, et al. Percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. An analysis of 1000 cases. *Cancer.* 2005 Mar 15;103(6):1201–9.
 200. Brunello F, Cantamessa A, Gaia S, Carucci P, Rolle E, Castiglione A, et al. Radiofrequency ablation: technical and clinical long-term outcomes for single hepatocellular carcinoma up to 30 mm. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Jul;25(7):842–9.
 201. Lee DH, Lee JM, Lee JY, Kim SH, Yoon JH, Kim YJ, et al. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma as first-line treatment: long-term results and prognostic factors in 162 patients with cirrhosis. *Radiology.* 2014 Mar;270(3):900–9.
 202. N’Kontchou G, Mahamoudi A, Aout M, Ganne-Carrié N, Grando V, Coderc E, et al. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: long-term results and prognostic factors in 235 Western patients with cirrhosis. *Hepatol Baltim Md.* 2009 Nov;50(5):1475–83.
 203. Rossi S, Ravetta V, Rosa L, Ghittoni G, Viera FT, Garbagnati F, et al. Repeated radiofrequency ablation for management of patients with cirrhosis with small hepatocellular carcinomas: a long-term cohort study. *Hepatol Baltim Md.* 2011 Jan;53(1):136–47.
 204. Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, et al. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. *Am J Gastroenterol.* 2012 Apr;107(4):569–77; quiz 578.
 205. Majumdar A, Roccarina D, Thorburn D, Davidson BR, Tsochatzis E, Gurusamy KS. Management of people with early- or very early-stage hepatocellular carcinoma: an attempted network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Mar 28;3:CD011650.
 206. Head HW, Dodd GD, Dalrymple NC, Prasad SR, El-Merhi FM, Freckleton MW, et al. Percutaneous radiofrequency ablation of hepatic tumors against the diaphragm: frequency of diaphragmatic injury. *Radiology.* 2007 Jun;243(3):877–84.

207. Yin X-Y, Xie X-Y, Lu M-D, Xu H-X, Xu Z-F, Kuang M, et al. Percutaneous thermal ablation of medium and large hepatocellular carcinoma: long-term outcome and prognostic factors. *Cancer*. 2009 May 1;115(9):1914–23.
208. Liang P, Dong B, Yu X, Yu D, Wang Y, Feng L, et al. Prognostic factors for survival in patients with hepatocellular carcinoma after percutaneous microwave ablation. *Radiology*. 2005 Apr;235(1):299–307.
209. Ohmoto K, Miyake I, Tsuduki M, Shibata N, Takesue M, Kunieda T, et al. Percutaneous microwave coagulation therapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1999 Oct;46(29):2894–900.
210. Sato M, Watanabe Y, Ueda S, Iseki S, Abe Y, Sato N, et al. Microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 1996 May;110(5):1507–14.
211. Lu M-D, Xu H-X, Xie X-Y, Yin X-Y, Chen J-W, Kuang M, et al. Percutaneous microwave and radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a retrospective comparative study. *J Gastroenterol*. 2005 Nov;40(11):1054–60.
212. Facciorusso A, Di Maso M, Muscatiello N. Microwave ablation versus radiofrequency ablation for the treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Int J Hypertherm Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hypertherm Group*. 2016;32(3):339–44.
213. Yu J, Yu X-L, Han Z-Y, Cheng Z-G, Liu F-Y, Zhai H-Y, et al. Percutaneous cooled-probe microwave versus radiofrequency ablation in early-stage hepatocellular carcinoma: a phase III randomised controlled trial. *Gut*. 2017;66(6):1172–3.
214. Lo C-M, Ngan H, Tso W-K, Liu C-L, Lam C-M, Poon RT-P, et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2002 May;35(5):1164–71.
215. Meyer T, Kirkwood A, Roughton M, Beare S, Tsochatzis E, Yu D, et al. A randomised phase II/III trial of 3-weekly cisplatin-based sequential transarterial chemoembolisation vs embolisation alone for hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2013 Apr 2;108(6):1252–9.
216. Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2002 May 18;359(9319):1734–9.
217. Raoul J-L, Sangro B, Forner A, Mazzaferro V, Piscaglia F, Bolondi L, et al. Evolving strategies for the management of intermediate-stage hepatocellular carcinoma: Available evidence and expert opinion on the use of transarterial chemoembolization. *Cancer Treat Rev*. 2011 May 1;37(3):212–20.
218. Georgiades CS, Liapi E, Frangakis C, Park J, Kim HW, Hong K, et al. Prognostic accuracy of 12 liver staging systems in patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemoembolization. *J Vasc Interv Radiol JVIR*. 2006 Oct;17(10):1619–24.

219. Cho YK, Chung JW, Kim JK, Ahn YS, Kim MY, Park YO, et al. Comparison of 7 staging systems for patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization. *Cancer*. 2008 Jan 15;112(2):352–61.
220. Georgiades CS, Hong K, D'Angelo M, Geschwind J-FH. Safety and efficacy of transarterial chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma and portal vein thrombosis. *J Vasc Interv Radiol JVIR*. 2005 Dec;16(12):1653–9.
221. Sieghart W, Hucke F, Peck-Radosavljevic M. Transarterial chemoembolization: modalities, indication, and patient selection. *J Hepatol*. 2015 May;62(5):1187–95.
222. Lencioni R, Petruzzi P, Crocetti L. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Semin Interv Radiol*. 2013 Mar;30(1):3–11.
223. Castells A, Bruix J, Ayuso C, Brú C, Montanyà X, Boix L, et al. Transarterial embolization for hepatocellular carcinoma. Antibiotic prophylaxis and clinical meaning of postembolization fever. *J Hepatol*. 1995 Apr;22(4):410–5.
224. Forner A, Real MI, Varela M, Bruix J. Transarterial chemoembolization for patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 37(s2):S230–7.
225. Marelli L, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, et al. Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2007 Feb;30(1):6–25.
226. Katsanos K, Kitrou P, Spiliopoulos S, Maroulis I, Petsas T, Karnabatidis D. Comparative effectiveness of different transarterial embolization therapies alone or in combination with local ablative or adjuvant systemic treatments for unresectable hepatocellular carcinoma: A network meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184597.
227. Salem R, Gabr A, Riaz A, Mora R, Ali R, Abecassis M, et al. Institutional decision to adopt Y90 as primary treatment for hepatocellular carcinoma informed by a 1,000-patient 15-year experience. *Hepatol Baltim Md*. 2017 Dec 1;
228. 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(6):1155-1163.e2.
229. Levi Sandri GB, Ettorre GM, Giannelli V, Colasanti M, Sciuto R, Pizzi G, et al. Transarterial radio-embolization: a new chance for patients with hepatocellular cancer to access liver transplantation, a world review. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2017;2:98.
230. Radunz S, Treckmann J, Baba HA, Best J, Müller S, Theysohn JM, et al. Long-Term Outcome After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma Following Yttrium-90 Radioembolization Bridging Treatment. *Ann Transplant*. 2017 Apr 14;22:215–21.
231. Mohamed M, Katz AW, Tejani MA, Sharma AK, Kashyap R, Noel MS, et al. Comparison of outcomes between SBRT, yttrium-90 radioembolization, transarterial chemoembolization, and radiofrequency ablation as bridge to transplant for hepatocellular carcinoma. *Adv Radiat Oncol*. 2016 Mar;1(1):35–42.

232. Reguera-Berenguer L, Orcajo-Rincón J, Rotger-Regí A, Matilla-Peña AM, Echenagusia-Boyra M, Pérez-Pascual R, et al. Downstaging of bilobar hepatocellular carcinoma after radioembolization with 90Y microspheres as a bridge to liver transplantation. *Rev Espanola Med Nucl E Imagen Mol.* 2017 Oct;36(5):329–32.
233. Lewandowski RJ, Kulik LM, Riaz A, Senthilnathan S, Mulcahy MF, Ryu RK, et al. A comparative analysis of transarterial downstaging for hepatocellular carcinoma: chemoembolization versus radioembolization. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2009 Aug;9(8):1920–8.
234. Nagahama H, Okada S, Okusaka T, Ishii H, Ikeda M, Nakasuka H, et al. Predictive factors for tumor response to systemic chemotherapy in patients with hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 1997 Oct;27(5):321–4.
235. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Oct;5(10):835–44.
236. 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 Jul 24;359(4):378–90.
237. Cheng A-L, Kang Y-K, Chen Z, Tsao C-J, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 2009 Jan 1;10(1):25–34.
238. Bruix J, Raoul J-L, Sherman M, Mazzaferro V, Bolondi L, Craxi A, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: Subanalyses of a phase III trial. *J Hepatol.* 2012 Oct 1;57(4):821–9.
239. Reig M, Torres F, Rodriguez-Lope C, Forner A, LLarch N, Rimola J, et al. Early dermatologic adverse events predict better outcome in HCC patients treated with sorafenib. *J Hepatol.* 2014 Aug;61(2):318–24.
240. Bettinger D, Schultheiss M, Knüppel E, Thimme R, Blum HE, Spangenberg HC. Diarrhea predicts a positive response to sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Baltim Md.* 2012 Aug;56(2):789–90.
241. Estfan B, Byrne M, Kim R. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma: hypertension as a potential surrogate marker for efficacy. *Am J Clin Oncol.* 2013 Aug;36(4):319–24.
242. Llovet JM, Peña CEA, Lathia CD, Shan M, Meinhardt G, Bruix J, et al. Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2012 Apr 15;18(8):2290–300.
243. Personeni N, Rimassa L, Pressiani T, Destro A, Ligorio C, Tronconi MC, et al. Molecular determinants of outcome in sorafenib-treated patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013 Jul;139(7):1179–87.

244. Scartozzi M, Faloppi L, Svegliati Baroni G, Loretelli C, Piscaglia F, Iavarone M, et al. VEGF and VEGFR genotyping in the prediction of clinical outcome for HCC patients receiving sorafenib: the ALICE-1 study. *Int J Cancer*. 2014 Sep 1;135(5):1247–56.
245. Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, Hagiwara S, et al. FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013 Apr;57(4):1407–15.
246. Ikeda M, Mitsunaga S, Shimizu S, Ohno I, Takahashi H, Okuyama H, et al. Efficacy of sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma refractory to transcatheter arterial chemoembolization. *J Gastroenterol*. 2014 May;49(5):932–40.
247. Gomez-Martin C, Bustamante J, Castroagudin JF, Salcedo M, Garralda E, Testillano M, et al. Efficacy and safety of sorafenib in combination with mammalian target of rapamycin inhibitors for recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2012 Jan;18(1):45–52.
248. Zavaglia C, Airoidi A, Mancuso A, Vangeli M, Viganò R, Cordone G, et al. Adverse events affect sorafenib efficacy in patients with recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: experience at a single center and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Feb;25(2):180–6.
249. Kim R, El-Gazzaz G, Tan A, Elson P, Byrne M, Chang YD, et al. Safety and feasibility of using sorafenib in recurrent hepatocellular carcinoma after orthotopic liver transplantation. *Oncology*. 2010;79(1–2):62–6.
250. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011 Oct 14;147(2):275–92.
251. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
252. Bleau A-M, Agliano A, Larzabal L, de Aberasturi AL, Calvo A. Metastatic dormancy: a complex network between cancer stem cells and their microenvironment. *Histol Histopathol*. 2014;29(12):1499–510.
253. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*. 2014;e201303698.
254. Grover PK, Cummins AG, Price TJ, Roberts-Thomson IC, Hardingham JE. Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2014 Aug;25(8):1506–16.
255. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016 Jan 21;529(7586):298–306.
256. Paterlini-Bréchet P. Circulating tumor cells: who is the killer? *Cancer Microenviron*. 2014;7(3):161–76.

257. Yu C, Wang Z, Xu X, Xiang W, Huang X. Circulating Hepatocellular Carcinoma Cells are Characterized by CXCR4 and MMP26. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2015;36(6):2393–402.
258. Zhang Y, Li J, Cao L, Xu W, Yin Z. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: detection techniques, clinical implications, and future perspectives. *Semin Oncol*. 2012 Aug;39(4):449–60.
259. Vanharanta S, Massagué J. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell*. 2013 Oct 14;24(4):410–21.
260. Riisbro R, Christensen IJ, Piironen T, Greenall M, Larsen B, Stephens RW, et al. Prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in serum and cytosol of tumor tissue from patients with primary breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2002 May;8(5):1132–41.
261. Grebenchtchikov N, Maguire TM, Riisbro R, Geurts-Moespot A, O'Donovan N, Schmitt M, et al. Measurement of plasminogen activator system components in plasma and tumor tissue extracts obtained from patients with breast cancer: an EORTC Receptor and Biomarker Group collaboration. *Oncol Rep*. 2005 Jul;14(1):235–9.
262. Wang W-C, Zhang X-F, Peng J, Li X-F, Wang A-L, Bie Y-Q, et al. Survival Mechanisms and Influence Factors of Circulating Tumor Cells. *BioMed Res Int*. 2018;2018:6304701.
263. Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res*. 2015 Nov 1;21(21):4786–800.
264. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8;366(10):883–92.
265. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J*. 1869;14:146.
266. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*. 2010;16(9):398–406.
267. Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Rev Proteomics*. 2007;4(6):741–56.
268. Attard G, de Bono JS. Utilizing circulating tumor cells: challenges and pitfalls. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(1):50–8.
269. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*. 2013 Jun;31(6):539–44.
270. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, Metcalf RL, Rothwell DG, Trapani F, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med*. 2014 Aug;20(8):897–903.

271. Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet.* 2012 Nov;13(11):795–806.
272. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, Alexandrov LB, Greenman CD, Lau KW, et al. The life history of 21 breast cancers. *Cell.* 2012 May 25;149(5):994–1007.
273. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14608–13.
274. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LWMM. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol.* 2010;2010:617421.
275. Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G, et al. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):333–8.
276. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002 Aug;2(8):563–72.
277. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 1998 Sep;153(3):865–73.
278. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr H-A, Delaloye J-F, et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature.* 2011 Dec 7;481(7379):85–9.
279. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011 Mar 25;331(6024):1559–64.
280. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009 Nov 25;139(5):871–90.
281. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong STC, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature.* 2015 Nov 26;527(7579):472–6.
282. Denève E, Riethdorf S, Ramos J, Nocca D, Coffy A, Daurès J-P, et al. Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients. *Clin Chem.* 2013 Sep;59(9):1384–92.
283. Comen E, Norton L, Massagué J. Clinical implications of cancer self-seeding. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011 Jun;8(6):369–77.
284. Kim M-Y, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH-F, Norton L, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell.* 2009 Dec 24;139(7):1315–26.
285. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer.* 2014 Sep;14(9):611–22.

286. Massagué J, Batlle E, Gomis RR. Understanding the molecular mechanisms driving metastasis. *Mol Oncol*. 2017 Jan;11(1):3–4.
287. Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014 Apr;15(4):406–14.
288. Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014 Nov 1;32(31):3483–9.
289. Guo J, Yao F, Lou Y, Xu C, Xiao B, Zhou W, et al. Detecting carcinoma cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma by immunomagnetic beads and rt-PCR. *J Clin Gastroenterol*. 2007 Sep;41(8):783–8.
290. Low WS, Wan Abas WAB. Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties. *BioMed Res Int*. 2015;2015:239362.
291. Hou HW, Warkiani ME, Khoo BL, Li ZR, Soo RA, Tan DS-W, et al. Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Sci Rep*. 2013;3:1259.
292. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(9):623–31.
293. Pantel K, Alix-Panabières C. The clinical significance of circulating tumor cells. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007 Feb;4(2):62–3.
294. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*. 2004 Jan;35(1):122–8.
295. Alva A, Friedlander T, Clark M, Huebner T, Daignault S, Hussain M, et al. Circulating Tumor Cells as Potential Biomarkers in Bladder Cancer. *J Urol*. 2015 Sep;194(3):790–8.
296. Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Okubo K, Kijima T, Matsushita D, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastric cancer. *Ann Gastroenterol Surg*. 2017 Apr;1(1):60–8.
297. De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19):6302–9.
298. Dent BM, Ogle LF, O'Donnell RL, Hayes N, Malik U, Curtin NJ, et al. High-resolution imaging for the detection and characterisation of circulating tumour cells from patients with oesophageal, hepatocellular, thyroid and ovarian cancers. *Int J Cancer*. 2016 Jan 1;138(1):206–16.
299. Galizia G, Gemei M, Orditura M, Romano C, Zamboli A, Castellano P, et al. Postoperative Detection of Circulating Tumor Cells Predicts Tumor Recurrence in Colorectal Cancer Patients. *J Gastrointest Surg*. 2013 Oct;17(10):1809–18.

300. Gemenetzis G, Groot VP, Yu J, Ding D, Teinor JA, Javed AA, et al. Circulating Tumor Cells Dynamics in Pancreatic Adenocarcinoma Correlate With Disease Status: Results of the Prospective CLUSTER Study. *Ann Surg.* 2018;268(3):408–20.
301. Toyoshima K, Hayashi A, Kashiwagi M, Hayashi N, Iwatsuki M, Ishimoto T, et al. Analysis of circulating tumor cells derived from advanced gastric cancer. *Int J Cancer.* 2015 Aug 15;137(4):991–8.
302. van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, Terstappen LW, Den Toonder JM. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *AACR;* 2011.
303. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Jan 7;101(1):61–6.
304. Sun Y-F, Xu Y, Yang X-R, Guo W, Zhang X, Qiu S-J, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatol Baltim Md.* 2013 Apr;57(4):1458–68.
305. Schulze K, Gasch C, Staufer K, Nashan B, Lohse AW, Pantel K, et al. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2013 Nov;133(9):2165–71.
306. Kelley RK, Magbanua MJM, Butler TM, Collisson EA, Hwang J, Sidiropoulos N, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: a pilot study of detection, enumeration, and next-generation sequencing in cases and controls. *BMC Cancer.* 2015 Mar 31;15:206.
307. Sun C, Liao W, Deng Z, Li E, Feng Q, Lei J, et al. The diagnostic value of assays for circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore) [Internet].* 2017 Jul 21 [cited 2020 Sep 9];96(29). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5521903/>
308. Wang Z, Luo L, Cheng Y, He G, Peng B, Gao Y, et al. Correlation Between Postoperative Early Recurrence of Hepatocellular Carcinoma and Mesenchymal Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* 2018;22(4):633–9.
309. Chen Y, Li S, Li W, Yang R, Zhang X, Ye Y, et al. Circulating tumor cells undergoing EMT are poorly correlated with clinical stages or predictive of recurrence in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2019 08;9(1):7084.
310. Fan Z-C, Yan J, Liu G-D, Tan X-Y, Weng X-F, Wu W-Z, et al. Real-time monitoring of rare circulating hepatocellular carcinoma cells in an orthotopic model by in vivo flow cytometry assesses resection on metastasis. *Cancer Res.* 2012;72(10):2683–91.
311. Xu W, Cao L, Chen L, Li J, Zhang X-F, Qian H-H, et al. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using an asialoglycoprotein receptor-based magnetic cell separation strategy. *Clin Cancer Res.* 2011;clincanres. 0498.2010.

312. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*. 2000;156(1):57–63.
313. Xue F, Shi S, Zhang Z, Xu C, Zheng J, Qin T, et al. Application of a novel liquid biopsy in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation. *Oncol Lett*. 2018 Apr;15(4):5481–8.
314. Wang S, Zheng Y, Liu J, Huo F, Zhou J. Analysis of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma recurrence following liver transplantation. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. 2018 Jun;66(5):1–6.
315. Marubashi S, Dono K, Nagano H, Sugita Y, Asaoka T, Hama N, et al. Detection of AFP mRNA-expressing cells in the peripheral blood for prediction of HCC recurrence after living donor liver transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2007 Jul;20(7):576–82.
316. Li J, Han X, Yu X, Xu Z, Yang G, Liu B, et al. Clinical applications of liquid biopsy as prognostic and predictive biomarkers in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Sep 3;37(1):213.
317. Liese J, Peveling-Oberhag J, Doering C, Schnitzbauer AA, Herrmann E, Zangos S, et al. A possible role of microRNAs as predictive markers for the recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2016 Mar;29(3):369–80.
318. Zhang J, Lin H, Wang X-Y, Zhang D-Q, Chen J-X, Zhuang Y, et al. Predictive value of microRNA-143 in evaluating the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark Sect Dis Markers*. 2017 Jul 4;19(3):257–62.
319. Guo W, Yang X-R, Sun Y-F, Shen M-N, Ma X-L, Wu J, et al. Clinical significance of EpCAM mRNA-positive circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma by an optimized negative enrichment and qRT-PCR-based platform. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Sep 15;20(18):4794–805.
320. Wang S, Zhang C, Wang G, Cheng B, Wang Y, Chen F, et al. Aptamer-Mediated Transparent-Biocompatible Nanostructured Surfaces for Hepotocellular Circulating Tumor Cells Enrichment. *Theranostics*. 2016 Aug 7;6(11):1877–86.
321. Zhou Y, Wang B, Wu J, Zhang C, Zhou Y, Yang X, et al. Association of preoperative EpCAM Circulating Tumor Cells and peripheral Treg cell levels with early recurrence of hepatocellular carcinoma following radical hepatic resection. *BMC Cancer* [Internet]. 2016 [cited 2020 Sep 10];16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4955266/>
322. Ogle LF, Orr JG, Willoughby CE, Hutton C, McPherson S, Plummer R, et al. Imagestream detection and characterisation of circulating tumour cells - A liquid biopsy for hepatocellular carcinoma? *J Hepatol*. 2016;65(2):305–13.
323. Felden J von, Schulze K, Krech T, Ewald F, Nashan B, Pantel K, et al. Circulating tumor cells as liquid biomarker for high HCC recurrence risk after curative liver resection. *Oncotarget*. 2017 Sep 23;8(52):89978–87.

324. J C, Sw C, Z C, L Z, Q W. Epithelial-mesenchymal transition phenotypes of circulating tumor cells correlate with the clinical stages and cancer metastasis in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Biomark Sect Dis Markers*. 2017 Dec 1;20(4):487–98.
325. Shen J, Wang W-S, Zhu X-L, Ni C-F. High Epithelial Cell Adhesion Molecule–Positive Circulating Tumor Cell Count Predicts Poor Survival of Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma Treated with Transcatheter Arterial Chemoembolization. *J Vasc Interv Radiol*. 2018 Dec;29(12):1678–84.
326. Yu J, Xiao W, Dong S, Liang H, Zhang Z, Zhang B, et al. Effect of surgical liver resection on circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 Aug 20 [cited 2020 Sep 10];18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6102841/>
327. Qi L-N, Xiang B-D, Wu F-X, Ye J-Z, Zhong J-H, Wang Y-Y, et al. Circulating Tumor Cells Undergoing EMT Provide a Metric for Diagnosis and Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*. 2018 15;78(16):4731–44.
328. Ou H, Huang Y, Xiang L, Chen Z, Fang Y, Lin Y, et al. Circulating Tumor Cell Phenotype Indicates Poor Survival and Recurrence After Surgery for Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2018;63(9):2373–80.
329. Ye X, Li G, Han C, Han Q, Shang L, Su H, et al. Circulating tumor cells as a potential biomarker for postoperative clinical outcome in HBV-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Manag Res*. 2018 Nov 15;10:5639–47.
330. Chen Z, Lin X, Chen C, Chen Y, Zhao Q, Wu L, et al. Analysis of preoperative circulating tumor cells for recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Ann Transl Med* [Internet]. 2020 Sep [cited 2021 Jan 23];8(17). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7575976/>
331. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*. 1954 May;7(3):462–503.
332. Cascales-Campos PA, Ramírez P, Lopez V, Gonzalez R, Saenz-Mateos L, Llacer E, et al. Prognostic Value of 18-Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography After Transarterial Chemoembolization in Patients With Hepatocellular Carcinoma Undergoing Orthotopic Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 2015 Oct;47(8):2374–6.
333. Golfieri R, Cappelli A, Cucchetti A, Piscaglia F, Carpenzano M, Peri E, et al. Efficacy of selective transarterial chemoembolization in inducing tumor necrosis in small (<5 cm) hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 2011;53(5):1580–9.
334. Spreafico C, Marchianò A, Regalia E, Frigerio LF, Garbagnati F, Andreola S, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma in patients who undergo liver transplantation. *Radiology*. 1994 Sep 1;192(3):687–90.
335. Sotiropoulos GC, Malagó M, Molmenti E, Paul A, Nadalin S, Brokalaki E, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: is clinical tumor classification before transplantation realistic? *Transplantation*. 2005 Feb 27;79(4):483–7.

336. Peach G, Kim C, Zacharakis E, Purkayastha S, Ziprin P. Prognostic significance of circulating tumour cells following surgical resection of colorectal cancers: a systematic review. *Br J Cancer*. 2010 Apr;102(9):1327–34.
337. Fan ST, Yang ZF, Ho DWY, Ng MNP, Yu WC, Wong J. Prediction of posthepatectomy recurrence of hepatocellular carcinoma by circulating cancer stem cells: a prospective study. *Ann Surg*. 2011 Oct;254(4):569–76.
338. Lee JD, Yang WI, Park YN, Kim KS, Choi JS, Yun M, et al. Different glucose uptake and glycolytic mechanisms between hepatocellular carcinoma and intrahepatic mass-forming cholangiocarcinoma with increased (18)F-FDG uptake. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2005 Oct;46(10):1753–9.
339. Avella DM, Manjunath Y, Singh A, Deroche CB, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, et al. 18F-FDG PET/CT total lesion glycolysis is associated with circulating tumor cell counts in patients with stage I to IIIA non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2020 Jun;9(3):515–21.
340. Sánchez-Lorencio MI, Ramirez P, Saenz L, Martínez Sánchez MV, De La Orden V, Mediero-Valeros B, et al. Comparison of Two Types of Liquid Biopsies in Patients With Hepatocellular Carcinoma Awaiting Orthotopic Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 2015 Nov;47(9):2639–42.
341. Yao F, Guo J-M, Xu C-F, Lou Y-L, Xiao B-X, Zhou W-H, et al. Detecting AFP mRNA in peripheral blood of the patients with hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis and hepatitis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2005 Nov;361(1–2):119–27.
342. Koch C, Bette T, Waidmann O, Filmann N, Schrecker C, Trojan J, et al. AFP ratio predicts HCC recurrence after liver transplantation. *PLoS ONE [Internet]*. 2020 Jul 2 [cited 2020 Sep 28];15(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7332004/>
343. Durkin C, Kaplan DE, Bittermann T. T2 Hepatocellular Carcinoma Exception Policies That Prolong Waiting Time Improve the Use of Evidence-based Treatment Practices. *Transplant Direct [Internet]*. 2020 Aug 21 [cited 2020 Sep 26];6(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7447448/>
344. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):3481–98.
345. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang H-Y, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009;136(3):1012-1024. e4.
346. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating Tumor Cell Clusters are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell*. 2014 Aug 28;158(5):1110–22.
347. Harb W, Fan A, Tran T, Danila DC, Keys D, Schwartz M, et al. Mutational analysis of circulating tumor cells using a novel microfluidic collection device and qPCR assay. *Transl Oncol*. 2013;6(5):528IN1-538.

348. Hou Y, Zou Q, Ge R, Shen F, Wang Y. The critical role of CD133(+)CD44(+/-high) tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers. *Cell Res.* 2012 Jan;22(1):259–72.
349. Vilchez V, Turcios L, Zaytseva Y, Stewart R, Lee EY, Maynard E, et al. Cancer stem cell marker expression alone and in combination with microvascular invasion predicts poor prognosis in patients undergoing transplantation for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg.* 2016 Aug;212(2):238–45.
350. Yan J, Fan Z, Wu X, Xu M, Jiang J, Tan C, et al. Circulating tumor cells are correlated with disease progression and treatment response in an orthotopic hepatocellular carcinoma model. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* 2015 Nov;87(11):1020–8.