



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio del PIVKA-II y de otros marcadores
angiogénicos y metastásicos en el Trasplante
Hepático por Hepatocarcinoma**

**D. Francisco Villalba López
2022**



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio del PIVKA-II y de otros marcadores angiogénicos y
metastásicos en el Trasplante Hepático por
Hepatocarcinoma

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

D. Francisco Villalba López

Tesis realizada bajo la dirección de:

Dr. Luis Francisco Sáenz Mateos

Dr. Alberto Baroja Mazo

Dr. Pablo Ramírez Romero

2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a mis tres directores, ya que sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible: a Luis Sáenz, por proponerme este proyecto e impulsarme a desarrollarlo; a Alberto Baroja, por sus aportaciones y por ofrecerme soluciones para cualquier problema; y a Pablo Ramírez, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis y poder finalizarla en el LAIB.

Gracias a Pepe, por su apoyo como jefe de servicio y por facilitarme siempre cualquier cosa que he necesitado durante estos años. A todo el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, por toda la ayuda que me han prestado y por haberme permitido el uso de sus instalaciones y equipos para llevar a cabo este trabajo, y a la Unidad de Trasplantes del mismo hospital, por su colaboración y buena disposición. También quiero agradecer a Carmen Bernardo y al Hospital Central de Asturias su participación en el proyecto.

A la Universidad de Murcia y al IMIB por la concesión del “Contrato pre-doctoral Modalidad B” durante el cual he podido terminar este doctorado, y al LAIB por permitirme realizarlo en sus instalaciones.

Gracias a todos mis compañeros de residencia. En especial a mi compañera y amiga Maribel, a quien doy las gracias por la gran ayuda y por los consejos recibidos durante estos años. También quiero dar las gracias a Marisa y a Laura Rosado por ayudarme siempre que lo he necesitado.

Gracias a mi familia y a Alberto, por su comprensión y apoyo incondicional durante todo este tiempo. Gracias a todos mis amigos.

También quiero agradecer a cada uno de los pacientes que han participado en el estudio de manera completamente voluntaria, ya que sin ellos este trabajo tampoco hubiera sido posible.

En definitiva, gracias a todos lo que de alguna forma u otra habéis aportado algo a este proyecto.

El Doctorando es beneficiario de un contrato predoctoral “modalidad B” otorgado por la Universidad de Murcia.

La presente tesis doctoral se ha llevado a cabo durante los siguientes proyectos de investigación:

- **Utilidad de las CTCs, del PETTAC y de la RNM dinámica con ácido gadoxético para predecir la eficacia de la quimioembolización transarterial en el Hepatocarcinoma en espera de trasplante. Instituto Carlos III (PI13/01195).**
- **Utilidad de los niveles de CTCs, PIVKA II y PET-TAC para predecir la eficacia de la quimioembolización transarterial en el Hepatocarcinoma en espera de trasplante. Fundación Séneca, Agencia Regional de Ciencia y Tecnología (19447/PI/14).**
- **Valoración pronóstica a largo plazo de la detección y caracterización de CTCs mediante biopsia líquida microfluídica en pacientes con hepatocarcinoma en lista de espera de trasplante hepático (PI18/01302).**

RESUMEN/ABSTRACT

Resumen

El hepatocarcinoma (CHC) representa entre el 75-85% del total de neoplasias ocurrientes en el hígado. El trasplante ortotópico de hígado (TOH) es la mejor opción de tratamiento, ya que podría curar simultáneamente el tumor y la cirrosis subyacente. A pesar de los estrictos criterios de selección, se producen recidivas en el 6%-18% de los pacientes trasplantados por CHC, siendo el pronóstico de estos pacientes desfavorable. La alfa-fetoproteína sérica (AFP) se ha utilizado de forma rutinaria como marcador tumoral del CHC. Sin embargo, la gran morbilidad y mortalidad de esta enfermedad ha alentado la búsqueda de nuevos biomarcadores para monitorizar la recurrencia después del trasplante en pacientes con esta patología. La proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II (PIVKA-II) es un conocido marcador tumoral de CHC. Recientes estudios sobre la relación entre el nivel sérico de PIVKA-II y diversos factores clinicopatológicos del CHC han demostrado que la elevación de PIVKA-II puede estar relacionada con un peor comportamiento tumoral y un peor pronóstico en los pacientes con CHC. Asimismo, diversas moléculas participan también en el proceso de angiogénesis y metástasis del CHC por lo que algunas de ellas podrían desempeñar un papel importante en el seguimiento del paciente trasplantado.

El objetivo de este estudio es evaluar el papel del PIVKA-II y de otros biomarcadores, como las interleucinas 6 y 8 (IL-6 e IL-8), osteopontina (OPN), glipicano-3 (GPC3) y metaloproteasa-1 (MMP-1) para monitorizar a los pacientes con CHC tras el TOH, complementando a la AFP, así como estudiar la relación entre estos biomarcadores y la progresión de la enfermedad y la supervivencia tras el trasplante. Para ello se ha llevado a cabo un estudio analítico observacional de cohortes dinámicas prospectivas entre septiembre de 2014 y mayo 2021, en el que se midieron los niveles sanguíneos de los biomarcadores mencionados en 46 pacientes con CHC, en cumplimiento con los criterios de Milán, procedentes del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia y del Hospital Central de Asturias. La extracción de las muestras sanguíneas tuvo lugar tanto antes del trasplante como al mes, a los 6 meses, al año, a los 2 años y a los 3 años tras el trasplante.

Tras el análisis de los resultados, PIVKA-II correlacionó de forma estadísticamente significativa con algunas características clinicopatológicas, como el tamaño del tumor y el nº de quimioembolizaciones transarteriales (TACEs) pre-trasplante, así como con parámetros de laboratorio indicadores de mal pronóstico, como proteína C reactiva (PCR), lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina. IL-6, IL-8 y MMP-1 también se asociaron

con características clinicopatológicas del CHC antes del trasplante. Los niveles de PIVKA-II, AFP, IL-8 y MMP-1 disminuyeron significativamente tras el trasplante y aumentaron en los pacientes con recidiva tumoral. A pesar de no alcanzar la significancia estadística, los niveles pre-trasplante de PIVKA-II presentaron un mayor potencial predictivo de recidiva tumoral post-trasplante que los de AFP, mejorando esta capacidad predictiva el uso conjunto de los dos biomarcadores. Además, los niveles séricos de PIVKA-II elevados antes del trasplante hepático se asociaron a una menor supervivencia general (SG) y supervivencia libre de recidiva (SLE) tras el mismo.

En conclusión, una mayor concentración sérica de PIVKA-II puede indicar un mayor volumen tumoral y un peor estadio clínico antes del trasplante en pacientes con CHC. La monitorización de los niveles de PIVKA-II en los pacientes trasplantados por CHC refleja la aparición de recidiva tumoral tras el trasplante y podría utilizarse, complementando a la AFP y a las pruebas de imagen, como un biomarcador novedoso reflejando la recurrencia temprana de esta patología. Asimismo, IL-6, IL-8, y MMP-1 también podrían ser biomarcadores útiles en trasplante hepático por CHC.

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 75-85% of all liver neoplasms. Orthotopic liver transplantation (OLT) is the best treatment option, as it could simultaneously cure the tumor and the underlying cirrhosis. Despite strict selection criteria, recurrences occur in 6%-18% of patients transplanted for HCC, and the prognosis of these patients is unfavourable. Serum alpha-fetoprotein (AFP) has been routinely used as a tumor marker for HCC. However, the high morbidity and mortality of this disease has encouraged the search for new biomarkers to monitor recurrence after transplantation in patients with HCC. Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) is a known tumor marker of HCC. Recent studies on the relationship between serum PIVKA-II level and various clinicopathological factors of HCC have shown that elevated PIVKA-II may be associated with worse tumor behavior and prognosis in HCC patients. Furthermore, several molecules are also involved in the process of angiogenesis and metastasis in HCC and some of them could play an important role in the follow-up of the transplanted patient.

The aim of this study is to evaluate the role of PIVKA-II and other tumor markers (IL-6, IL-8, OPN, GPC3 and MMP-1) to monitor HCC patients after OLT, complementing AFP, as well as to study the relationship between these biomarkers and disease progression and survival after transplantation. For this purpose, an observational analytical prospective dynamic cohort study was carried out between September 2014 and May 2021, in which serum levels of the aforementioned biomarkers were measured in 46 HCC patients, in compliance with the Milan criteria, from the Clinical University Virgen de la Arrixaca Hospital (HCUVA, Murcia) and the Asturias Central Hospital (HUCA). Blood samples were collected before transplantation, at 1 month, 6 months, 1 year, 2 years and 3 years after transplantation.

After analysis of the results, PIVKA-II correlated statistically significantly with some clinicopathological features, such as tumour size and number of pre-transplant transarterial chemoembolizations (TACEs), as well as with laboratory parameters indicative of poor prognosis, such as C-reactive protein (CRP), lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase. IL-6, IL-8 and MMP-1 were also associated with clinicopathological features of HCC before transplantation. Levels of PIVKA-II, AFP, IL-8 and MMP-1 were significantly decreased after transplantation and increased in patients with tumour recurrence. Although not reaching statistical significance, pre-transplant levels of PIVKA-II were more predictive

of post-transplant tumour recurrence than AFP, improving this predictive capacity when both biomarkers were used together. In addition, elevated serum PIVKA-II levels before liver transplantation were associated with poorer overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS) after transplantation.

In conclusion, a higher serum concentration of PIVKA-II may indicate a higher tumour volume and a worse clinical stage before transplantation in HCC patients. Monitoring PIVKA-II levels in HCC transplant recipients reflects the occurrence of tumour recurrence after transplantation and could be used, complementing AFP and imaging tests, as a novel biomarker reflecting early recurrence of HCC. Likewise, IL-6, IL-8, and MMP-1 could also be useful biomarkers in liver transplantation for HCC.

ABREVIATURAS

AASLD: *American Association for the study of Liver Diseases* (Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas).

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AFB1: Aflatoxina B1.

AFP: Alfa-fetoproteína.

AFP-L3: Fracción de AFP reactiva a la aglutinina de *Lens culinaris*.

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*.

ALB: Albúmina.

ALBI: *Albumin-bilirubin score*.

ALCH: Enolismo.

ALP: Fosfatasa alcalina.

ALT/GPT: Alanina aminotransferasa / Transaminasa glutámico-pirúvica.

APASL: *The Assian Pacific Association for the Study of the Liver* (Asociación Asiática del Pacífico para el Estudio del Hígado).

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNip: Ácido ribonucleico pequeño de interferencia.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AST/GOT: Aspartato aminotransferasa / Transaminasa glutámico-oxalacética.

AUC: *Area under curve* (Área bajo la curva).

BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*.

BMPR: Receptor de la proteína morfogenética ósea.

BMP-7: Proteína morfogenética ósea 7.

BT: Bilirrubina total.

CHC: Carcinoma hepatocelular / Hepatocarcinoma.

CLIP: *The Cancer of the Liver Italian Program*.

CRIPTO: Criptogénica.

CSCs: *Cancer stem cells* (Células madre cancerosas).

CT: Colesterol total.

CTCs: Células tumorales circulantes.

CUPI: *Chinese University Prognostic Index*.

DGP: *Des-gamma-carboxy prothrombin* (Des-gamma-carboxi protrombina).

DE: Desviación estándar.

DEB: *Drug-eluting beads*.

E: Especificidad.

EASL: *European Association for the Study of the Liver* (Asociación Europea para el Estudio del Hígado).

ECA: Ensayos controlados aleatorios.

ECLIA: *Electrochemiluminescence immunoassay* (Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia).

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico.

EHGNA: Enfermedad por hígado graso no alcohólico.

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EMT: *Epithelial-mesenchymal transition* (Transición epitelial-mesenquimal).

EORTC: *European Organisation for the Research and Treatment of Cancer* (Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer).

FDA: *Food and Drug Administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos).

FDG: Fluorodesoxiglucosa.

Fe: Sobrecarga férrica.

FERRIT: Ferritina.

FGFR: Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos.

FGF2: Factor de crecimiento de fibroblastos-2.

GGT: Gamma glutamil aminotransferasa.

GPC3: Glipicano-3.

GPI: Glucosilfosfatidilinositol.

GP73: Proteína de Golgi 73.

HEMO: Hemocromatosis.

HGF: Factor de crecimiento de los hepatocitos.

HGFR: Receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos.

HKLC: *Hong Kong Liver Cancer*.

hTERT: Transcriptasa inversa de la telomerasa humana.

HUVECs: *Human umbilical vein endothelial cells* (Células endoteliales de cordón umbilical).

IGF-2: *Insulin-like growth factor 2* (Factor de crecimiento similar a la insulina-2).

IL-6: Interleucina 6.

IL-8: Interleucina 8.

IMC: Índice de masa corporal.

INASL: *Indian National Association for the Study of the Liver* (Asociación Nacional India para el Estudio del Hígado).

INR: *International normalized ratio* (Razón internacional normalizada).

JIS: *Japan Integrated Staging*.

JSH: *The Japan Society of Hepatology* (Sociedad Japonesa de Hepatología).

kDa: Kilodalton.

LES: Lupus eritematoso sistémico.

LEUCOS: Leucocitos.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LOES: Lesiones ocupantes de espacio.

ME: Matriz extracelular.

MELD: *Model for End-Stage Liver Disease*.

MMP-1: Metaloproteasa de matriz 1.

MMPs: Metaloproteasas de matriz.

OPN: Osteopontina.

PCR: Proteína C Reactiva.

PEI: *Percutaneous ethanol injection* (Inyección de alcohol).

PET: Tomografía por emisión de positrones.

PIVKA-II: *Protein induced by vitamin K absence or antagonist II* (Protrombina inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II).

PLAQ: Plaquetas.

RECIST: *Response Evaluation Criteria in Solid Tumor*.

RFA: *Radiofrequency ablation* (Ablación por radiofrecuencia).

RI: Rango intercuartílico.

RM: Resonancia magnética.

RNL: Ratio neutrófilos-linfocitos.

RPL: Ratio plaquetas-linfocitos.

ROC: *Receiver operating characteristic*.

ROS: *Reactive oxygen species* (Especies reactivas de oxígeno).

RVS: Respuesta virológica sostenida.

S: Sensibilidad.

SG: Supervivencia general.

SLE: Supervivencia libre de enfermedad.

SUV: *Standardized uptake value* (Valor estandarizado de captación).

TACE: *Transarterial chemoembolization* (Quimioembolización transarterial).

TAMs: Macrófagos asociados a tumores.

TC: Tomografía computarizada.

TG: Triglicéridos.

TGFR: Receptor del factor de crecimiento transformador.

TGF- α : Factor de Crecimiento Transformante α

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante β .

TH: Trasplante hepático.

TIMPs: *Tissue inhibitor of matrix proteinase* (Inhibidores tisulares de metaloproteasas).

TNM: *Tumor-Node-Metastasis*.

TOH: Trasplante ortotópico de hígado.

TP: Tiempo de protrombina.

UNOS: *United Network for Organ Sharing*.

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (Factor de crecimiento endotelial vascular).

VHB: Virus de la Hepatitis B.

VHC: Virus de la Hepatitis C.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

VR: Valores de referencia.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	HEPATOCARCINOMA.....	3
1.1.1	Epidemiología.....	3
1.1.2	Etiología.....	4
1.1.3	Manifestaciones clínicas.....	10
1.1.4	Diagnóstico.....	11
1.1.5	Valoración de la función hepática en CHC.....	16
1.1.6	Pronóstico.....	20
1.1.7	Estadificación.....	21
1.1.8	Tratamiento.....	26
1.1.9	Recurrencia del CHC tras el trasplante hepático.....	32
1.1.10	Prevención.....	34
1.2	PIVKA-II.....	34
1.2.1	Estructura del PIVKA-II.....	35
1.2.2	PIVKA-II en el cáncer.....	36
1.2.3	Síntesis del PIVKA-II en CHC.....	36
1.2.4	Función biológica del PIVKA-II en CHC.....	38
1.2.5	PIVKA-II en el diagnóstico de CHC.....	39
1.2.6	PIVKA-II como factor pronóstico y como predictor de recurrencia del CHC.....	42
1.2.7	PIVKA-II y el trasplante hepático.....	44
1.2.8	PIVKA-II en Guías clínicas.....	45
1.3	OTROS BIOMARCADORES EN EL ESTUDIO DEL CHC.....	45
1.3.1	Interleucinas 6 y 8 (IL-6 e IL-8).....	45
1.3.2	Osteopontina.....	49
1.3.3	Glipicano-3.....	50
1.3.4	Metaloproteasas de matriz (MMPs).....	52
2.	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57

2.1	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	59
2.2	HIPÓTESIS DE TRABAJO	61
2.3	OBJETIVOS	61
3.	PACIENTES Y MÉTODOS	63
3.1	DISEÑO Y ÁMBITO DE ESTUDIO.....	65
3.2	PACIENTES.....	65
3.2.1	Criterios de inclusión.....	66
3.2.2	Criterios de exclusión	66
3.3	VARIABLES DEL ESTUDIO.....	66
3.3.1	Datos demográficos.....	66
3.3.2	Variables clínicas	66
3.3.3	Variables de laboratorio.....	68
3.4	RECOGIDA DE VARIABLES.....	69
3.4.1	Recogida de las muestras.....	69
3.4.2	Procesamiento analítico de las muestras.....	70
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
3.6	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	77
4.	RESULTADOS	79
4.1	ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA DE PACIENTES.....	81
4.2	ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES DEMOGRÁFICAS, CLINICOPATOLÓGICAS Y DE LABORATORIO.....	82
4.3	ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE PIVKA-II Y LOS PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS ANTES DEL TRASPLANTE.....	107
4.4	ASOCIACIÓN ENTRE PIVKA-II Y LOS PARÁMETROS DE LABORATORIO PRE-TRASPLANTE: BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS Y COAGULOMÉTRICOS.....	110
4.5	ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 Y AFP CON LOS PARÁMETROS CLINICOPATOLÓGICOS PRE-TRASPLANTE	112
4.6	ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6, IL-8, OPN, GPC3 Y MMP-1 CON LOS NIVELES DE PIVKA-II y AFP ANTES Y DESPUÉS DEL TRASPLANTE	122

4.7	EVOLUCIÓN DE LOS MARCADORES TRAS EL TRASPLANTE	126
4.7.1	Evolución de los niveles medianos de marcadores tras el trasplante en los pacientes incluidos en el estudio	126
4.7.2	Evolución de los niveles medianos de marcadores tras el trasplante en los pacientes sin recidiva y con recidiva post-trasplante	133
4.7.3	Evolución de los niveles de marcadores tras el trasplante en los pacientes con recidiva post-trasplante	140
4.7.4	Evolución de los niveles de marcadores tras el trasplante en los pacientes sin invasión vascular y con invasión vascular	146
4.8	EFICACIA DE LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MARCADORES PRE- TRASPLANTE EN LA PREDICCIÓN DE RECIDIVA POST-TRASPLANTE DEL CHC	153
4.9	ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA TRAS EL TRASPLANTE.....	163
4.9.1	Comparación de curvas de SG y SLE entre grupos de pacientes con diferentes características clínicas y analíticas	164
5.	DISCUSIÓN.....	195
6.	CONCLUSIONES	225
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	229
8.	ANEXOS	257
8.1	ANEXO I: AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO.....	259
8.2	ANEXO II: CONSENTIMIENTO INFORMADO	260
8.3	ANEXO III: PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DERIVADAS	267
8.3.1	Artículos científicos	267
8.3.2	Comunicaciones a congreso	269

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HEPATOCARCINOMA

El hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (CHC) representa entre el 75-85% del total de neoplasias ocurrientes en el hígado. El cáncer primario de hígado es el sexto cáncer más diagnosticado y la tercera causa de muerte por cáncer en todo el mundo, con aproximadamente 906.000 nuevos casos y 830.000 muertes. Las tasas de incidencia y mortalidad son de 2 a 3 veces mayores entre los hombres que entre las mujeres en la mayoría de las regiones, ocupando esta neoplasia el quinto lugar en términos de incidencia global y el segundo en términos de mortalidad para los hombres (1). La mayoría de los CHC se producen en pacientes con una enfermedad hepática subyacente, sobre todo como resultado de una infección por los virus de la hepatitis B o C (VHB o VHC) o del abuso del alcohol (2). El diagnóstico precoz y el tratamiento eficaz de esta enfermedad siguen siendo un reto. Si se detecta pronto, el CHC puede curarse con un excelente pronóstico a largo plazo, y las principales opciones de tratamiento serían la resección quirúrgica o el trasplante de hígado, si el paciente es un candidato adecuado para el trasplante (3).

1.1.1 Epidemiología

El CHC muestra una incidencia creciente en la mayoría de regiones del mundo y, en general, se asocia a un pronóstico desfavorable ya que las tasas de incidencia y mortalidad son aproximadamente equivalentes. En 2018, la tasa de incidencia mundial estimada de cáncer de hígado por 100.000 personas/año fue de 9,3 mientras que la tasa de mortalidad correspondiente fue de 8,5 (4).

El patrón de ocurrencia de CHC muestra un desequilibrio geográfico significativo, con las tasas de incidencia globales más altas en Asia oriental y África subsahariana, que en conjunto representan alrededor del 85% de todos los casos (5). No obstante, la incidencia y la mortalidad del CHC han aumentado recientemente en América del Norte y varias regiones europeas y han disminuido en las regiones tradicionalmente de alto riesgo, incluido Japón y partes de China. El CHC tiene una fuerte preponderancia masculina, con una relación hombre-mujer estimada en 2:1 (6). Las mayores diferencias por sexo se observan en Europa, donde las tasas entre los hombres pueden ser más de cuatro veces superiores a las de las mujeres (7). En hombres, las regiones con mayor incidencia son el este y sudeste asiático. En el sur de Europa y Norte América los varones presentan tasas de incidencia intermedias

mientras que en el norte de Europa y el sur de Asia central se dan las menores tasas. Las mujeres presentan generalmente tasas de incidencia menores, encontrando las tasas más elevadas en África occidental y en el este asiático. La incidencia de esta patología aumenta progresivamente con la edad, alcanzando un máximo a los 70 años. Sin embargo, la edad media de diagnóstico suele ser algo menor ya que en las poblaciones africana y china la edad media de los pacientes con el tumor es considerablemente más joven (8,9). La gran variabilidad en la incidencia del CHC según la región geográfica, el sexo y la raza o etnia está relacionada en gran medida, aunque no totalmente, con la prevalencia y la edad de adquisición de los principales factores de riesgo (4). En España, la incidencia estimada de cáncer de hígado para el año 2022 es de 6604 casos (5100 varones y 1395 mujeres), suponiendo el 2,3% de todos los cánceres y el duodécimo por orden de frecuencia en los tumores sólidos (10).

1.1.2 Etiología

La hepatocarcinogénesis es un proceso complejo y multifactorial que puede durar más de 30 años. Los CHC surgen con mayor frecuencia de los hígados afectados de hepatitis crónica y cirrosis, particularmente de hepatocitos displásicos (11). Los pacientes con enfermedades hepáticas crónicas presentan una inflamación hepática sostenida, fibrosis y una regeneración aberrante de los hepatocitos. Estas anomalías pueden causar cirrosis y favorecer una serie de acontecimientos genéticos y epigenéticos que culminan en la formación de nódulos displásicos, que son lesiones preneoplásicas. Alteraciones moleculares adicionales proporcionan a las células displásicas ventajas proliferativas, invasivas y de supervivencia, y completan la transición a un CHC completo (figura 1). El CHC también puede surgir en pacientes con enfermedad hepática crónica pero que no tienen una cirrosis establecida o una inflamación marcada como por ejemplo en pacientes con infección por el VHB (2).

Se han implicado varios factores de riesgo en el desarrollo y la progresión del CHC, en particular la hepatitis vírica crónica, la hepatitis no vírica, la ingesta crónica de alcohol, ciertos estados patológicos (obesidad y diabetes) y el consumo de alimentos básicos contaminados con toxinas (3). Aproximadamente el 90% de todos los CHC son de causa conocida, siendo los más frecuentes el VHC, VHB, consumo excesivo de alcohol y exposición

a aflatoxinas (6,12). En África y Asia Oriental, la mayor fracción atribuible es causada por la hepatitis B (60%), mientras que en el mundo occidental solo el 20% de los casos puede atribuirse a esta infección, donde por el contrario, la hepatitis C crónica parece ser el principal factor de riesgo. En todo el mundo, aproximadamente el 54% de los casos pueden atribuirse a la infección por VHB, que afecta a 400 millones de personas, mientras que el 31% puede atribuirse a la infección por VHC, que afecta a 170 millones de personas, correspondiendo aproximadamente el 15% restante a otras causas.

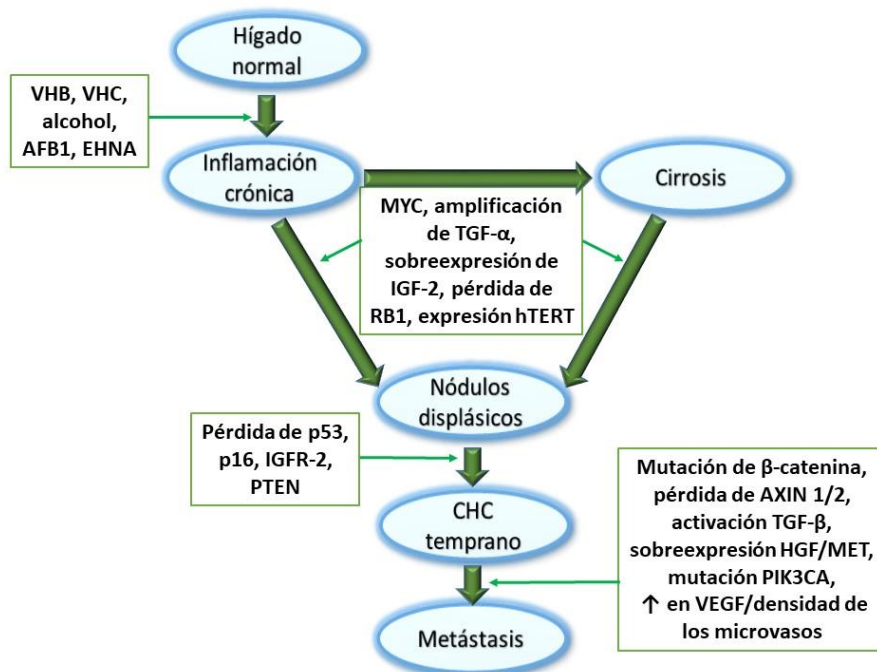


Figura 1. Fisiopatogénesis del CHC y principales vías moleculares implicadas. (AFB1: aflatoxina B1; AXIN 1/2: proteínas relacionadas con la axina; CHC: carcinoma hepatocelular; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; hTERT: transcriptasa inversa de la telomerasa humana; IGF-2: factor de crecimiento similar a la insulina-2; MYC: oncogén que regula transcripcionalmente otros genes y está asociado a la carcinogénesis; p16: inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2ª; p53: proteína supresora de tumores; PTEN: proteína supresora de tumores homóloga de la fosfatasa y la tensina; PIK3CA: subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-3-quinasa; RB1: proteína del retinoblastoma-1; TGF-α, factor de crecimiento transformante-α; TGF-β: factor de crecimiento transformante-β; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; β-catenina: subunidad del complejo proteico nuclear). Adaptada de Whittaker S. y cols., 2010.

Los factores de riesgo más frecuentes en el CHC son:

1. Virus de la hepatitis B (VHB)

La infección crónica por el VHB es la principal causa de CHC en los países de Asia oriental y la mayoría de los países africanos, excepto en el norte de África, donde la prevalencia del VHC es más alta. (13). El riesgo de desarrollar CHC a lo largo de la vida entre los portadores del VHB oscila entre el 10 y el 25% (4). Varios estudios han identificado factores relacionados con el VHB como predictores clave del desarrollo de CHC en pacientes con infección crónica por hepatitis B, siendo la seropositividad del virus y del antígeno de la hepatitis B (14), la alta carga viral (15) y el genotipo C (16) predictores independientes del desarrollo de CHC. Además, la carga viral de la hepatitis B se correlaciona con el riesgo de progresión a cirrosis (17).

Así, entre los cofactores que aumentan el riesgo entre los portadores del VHB se encuentran: las características demográficas (sexo masculino, edad avanzada, ascendencia asiática o africana, antecedentes familiares de CHC), los factores virales (niveles elevados de replicación del VHB, el genotipo del VHB, la duración de la infección, la coinfección con el VHC o el VIH) y las exposiciones ambientales (aflatoxina, alcohol, tabaco, obesidad, y diabetes) (4).

Se cree que en la patogénesis del CHC inducido por el VHB intervienen varios mecanismos, como la integración del ADN del VHB en la maquinaria genética del huésped, la metilación del ADN, el estrés oxidativo y la proteína HBx (18). El VHB entra en las células hepáticas a través de una vía mediada por un receptor y se ha demostrado que el riesgo de desarrollar CHC es proporcional al nivel de ADN del VHB existente en estas células. La enfermedad crónica es el resultado de la persistencia del virus en las células del huésped a través de varios mecanismos que incluyen la infección de los centros de control de la defensa inmunitaria, la inhibición vírica de la presentación de antígenos, la supresión inmunitaria selectiva y las mutaciones víricas que incapacitan funcionalmente a las células T específicas del virus para reconocer el antígeno del VHB (19).

La respuesta inmunitaria y las reacciones inflamatorias inducen la movilización de citocinas y quimiocinas, provocando estrés oxidativo. Esto, a su vez, promueve la activación constante de varios genes que causan cirrosis, genes relacionados con la señalización del calcio, genes de proteínas ribosomales, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y mevalonato quinasa carboxipeptidasa (20). El ataque viral también puede causar

directamente el desarrollo de tejido cirrótico a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias como por ejemplo, interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-1 β e IL-18 (21).

2. Virus de la Hepatitis C (VHC)

El VHC es la principal causa de CHC relacionada con virus en América del Norte, Europa, Japón, partes de Asia central, y el norte de África y Oriente Medio. Se estima que entre el 10 y el 20% de las personas con infección crónica por el VHC desarrollarán complicaciones hepáticas que incluyen cirrosis descompensada y CHC (13). La hepatitis C crónica es una afección potencialmente progresiva, caracterizada por una fibrosis de evolución lenta que puede culminar en la cirrosis. Con el tiempo, la cirrosis compensada puede avanzar a cirrosis descompensada que puede terminar en insuficiencia hepática y muerte.

El VHC secuestra la maquinaria celular del huésped para aumentar la proliferación celular, la esteatosis, los procesos inflamatorios, la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina, todo lo cual conduce a estrés oxidativo, inestabilidad genética y daño del ADN, con cirrosis y CHC como probable desenlace. La correspondiente interacción de las respuestas inflamatorias, la activación de los genes y la supresión del aclaramiento viral crea un entorno condicionado que promueve las mutaciones celulares que conducen al CHC (3), enfermedad que ocurre predominantemente en aquellas personas con hepatitis C crónica que presentan cirrosis, aunque también pueden ocurrir con mucha menos frecuencia en personas con fibrosis puente sin cirrosis definida (22). El riesgo de desarrollo de CHC aumenta en pacientes con VHC genotipo 1b (23) o genotipo 3 (24). La eliminación del VHC por terapias antivirales con una respuesta virológica sostenida (RVS) reduce significativamente la incidencia de CHC (25).

3. Toxinas ambientales

La exposición alimentaria a la aflatoxina B1 (AFB1), la cual se origina a partir de contaminaciones fúngicas de alimentos básicos, es un cofactor importante para el desarrollo de CHC en partes de África y Asia. La AFB1 es un metabolito secundario producido por hongos, principalmente por especies del género *Aspergillus*. En las zonas tropicales y subtropicales, debido a las condiciones de humedad y temperatura, estos hongos pueden proliferar en la cadena de producción y almacenamiento de alimentos, contaminando

granos, nueces y semillas (26). Al consumir alimentos contaminados con AFB1, esta micotoxina es metabolizada en el hígado por el complejo citocromo CYP450, dando lugar al producto altamente reactivo 8,9-exo-epóxido, el cual se une covalentemente con proteínas (aflatoxicosis) o al ADN, formando aductos. El epóxido y otros metabolitos intermedios tienen una marcada afinidad por el gen TP53. Este gen es un gen supresor de tumores que codifica la proteína p53, un factor de transcripción que regula el ciclo celular, la muerte celular programada, la respuesta al estrés celular y la reparación del ADN (26). Así, se producen una serie de transformaciones químicas que dan lugar a la conversión de la AFB1 en compuestos mutagénicos o cancerígenos establecidos que invierten la capacidad supresora de tumores del gen. Los estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado una fuerte correlación entre la exposición a aflatoxina B1, las mutaciones de TP53 (codón 249) y la incidencia de CHC, específicamente en individuos infectados con VHB (27).

4. Alcohol

El consumo crónico de alcohol conduce a la cirrosis hepática y, posteriormente, al CHC. Según estudios de casos de todo el mundo, el abuso de alcohol está relacionado con un riesgo hasta 2 veces mayor de padecer CHC, siendo la hepatopatía alcohólica una de las principales causas de esta enfermedad (28).

Los subproductos tóxicos del catabolismo del alcohol, como la acumulación de acetaldehído y los radicales libres, pueden influir en el estrés oxidativo, la muerte celular apoptótica, la necrosis y la necroptosis. La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es el resultado del aumento de la secreción de citoquinas inflamatorias provocado por las constantes vías inflamatorias. El daño del ADN inducido por las ROS, la vulnerabilidad genómica de los hepatocitos y la supresión de los linfocitos T contribuyen al desarrollo del CHC (3). La secuenciación del ADN del genoma del CHC ha identificado mutaciones recurrentes en genes que codifican enzimas metabolizadoras de alcohol, por ejemplo, ADH1B (29).

5. Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)

Se estima que entre el 20 y el 30% de las personas con enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) evolucionan hacia esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la cual evoluciona hacia cirrosis en el 10-20% de los casos (30). La EHNA se ha convertido en la

principal causa de enfermedad hepática crónica en la mayoría de las regiones del mundo, con una prevalencia de hasta el 30% en la población general (12).

Entre el 70 y el 80% de los CHC relacionados con el EHGNA se desarrollan en hígados cirróticos, siendo el riesgo de CHC menor que el asociado a la cirrosis relacionada con el VHC, mientras que entre el 20 y el 30% restante de los CHC relacionados con EHGNA se desarrollan en ausencia de cirrosis (31).

6. Obesidad, diabetes y síndrome metabólico

El CHC está asociado a la obesidad la cual deteriora el metabolismo, induce la inflamación y es un factor etiológico de EHGNA, esteatosis, EHNA, fibrosis hepática, cirrosis y, en última instancia, CHC. El deterioro del metabolismo de los lípidos y la desregulación del equilibrio energético en el hígado, causado en parte por un estilo de vida sedentario y por la obesidad, contribuye a la correlación entre la diabetes de tipo 2 y el EHNA. Estudios realizados en diversas poblaciones han informado de que la diabetes se asocia a un riesgo de CHC entre 2 y 3 veces mayor, con un riesgo relativo significativamente mayor entre los hombres que entre las mujeres. De hecho varios estudios han demostrado que el índice de masa corporal (IMC) elevado, el perímetro de la cintura y la diabetes mellitus tipo II se asocian a un mayor riesgo de cáncer de hígado (4). Además, se ha demostrado que el síndrome metabólico, un conjunto de condiciones que incluyen la resistencia a la insulina, la obesidad abdominal, la dislipidemia aterogénica y la hipertensión, aumenta el riesgo de CHC (32).

7. Otras causas

Otras enfermedades como la hemocromatosis, la enfermedad biliar crónica y las enfermedades hepáticas genéticas o metabólicas, como la glucogenosis tipo III, pueden provocar cirrosis y promover el desarrollo de CHC, pero la proporción de CHC causada por estas otras etiologías es inferior al 10% en todo el mundo (33). En ocasiones no es posible filiar el origen de la cirrosis, estableciéndose el diagnóstico de cirrosis criptogénica. Por último, el tabaco también aumenta el riesgo de desarrollar CHC (34).

8. Progresión del CHC

Hay varios mecanismos biológicos establecidos que intervienen en la progresión del CHC. Entre ellos se encuentran la transición epitelial-mesenquimal (EMT), las interacciones

tumor-estroma, el microambiente tumoral, las células madre del cáncer y la desregulación de los microARN y de las vías de señalización conocidas. Asimismo, las células tumorales circulantes (CTCs) desempeñan un papel importante en la progresión del CHC (3).

9. Factores protectores

Se ha demostrado en múltiples estudios observacionales que el café (35), las estatinas (36), la metformina (37) y la aspirina (38) protegen contra el desarrollo de CHC. Aunque ninguna de estas asociaciones protectoras se ha confirmado en ensayos controlados aleatorios (ECA), la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) recomienda el uso del café en las guías de práctica clínica para CHC (6).

1.1.3 Manifestaciones clínicas

Aunque algunos pacientes pueden ser sintomáticos, la mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos y la presentación clínica se produce en fases avanzadas de la enfermedad (3). Así, el CHC puede progresar silenciosamente en pacientes con función hepática conservada y escapar del diagnóstico temprano debido a síntomas vagos o inespecíficos. Por ello, en los países en desarrollo con recursos de vigilancia limitados, el diagnóstico de CHC generalmente se retrasa (39). Por otro lado, los síntomas clínicos se suelen acentuar en casos con insuficiencia hepática.

En general el dolor es el síntoma más común (65%) (40,41), procedente de diversas etiologías, como adherencias inflamatorias, distensión capsular hepática y causas musculoesqueléticas como inmovilidad o metástasis. En etapas avanzadas, los síntomas y hallazgos clínicos incluyen dolor abdominal vago en el cuadrante superior derecho, hepatomegalia, ictericia obstructiva, hemobilia y fiebre de origen desconocido. Los síntomas inespecíficos de la enfermedad maligna avanzada como la anorexia, las náuseas, la somnolencia y la pérdida de peso a menudo coexisten. Los pacientes con cirrosis no reconocida o cirrosis compensada conocida también pueden presentar descompensación hepática. Las complicaciones incluyen la oclusión de la vena hepática que evoluciona hacia el síndrome de Budd-Chiari (42) y, con mayor frecuencia, la invasión de la vena porta y la

trombosis, mientras que una complicación grave es la ruptura del CHC que causa abdomen agudo y hemorragia intraperitoneal.

Los pacientes con cirrosis descompensada comúnmente sufren pérdida de peso y desgaste muscular. Estos problemas son multifactoriales y su patogénesis incluye tanto la ingesta calórica deficiente por saciedad precoz como las alteraciones de la absorción y el metabolismo de los nutrientes ingeridos. Otros síntomas son diarrea acuosa, letargia y dolor óseo provocado por la metástasis. El estado nutricional, evaluado por ejemplo a través de la masa muscular del psoas (43), se ha asociado independientemente con la supervivencia general (SG) en pacientes con CHC avanzado (44) y su evaluación es importante para identificar el riesgo de deterioro de la calidad de vida o el estado funcional en los pacientes. También hay que destacar la carga psicológica; de hecho, se ha descrito que los pacientes con CHC mostraban el tercer nivel más alto de angustia psicológica o depresión entre los pacientes diagnosticados con otros 14 tipos de cáncer (45).

1.1.4 Diagnóstico

En nuestro medio, más del 80% de los pacientes afectados de CHC presentan una cirrosis hepática subyacente y en la actualidad el desarrollo de CHC supone una de las principales causas de muerte en pacientes con cirrosis (46). Teniendo en cuenta que la única posibilidad de aplicar tratamientos con intención curativa es diagnosticando la enfermedad en una fase asintomática y dado que esta opción es únicamente factible si se efectúa cribado de la población en riesgo (47), es fundamental la instauración de programas de cribado y vigilancia de pacientes con alto riesgo de desarrollar CHC.

Dado que el principal factor de riesgo de CHC es la presencia de cirrosis, deben considerarse candidatos a cribado todos los pacientes con cirrosis independientemente de la etiología. Las técnicas de cribado de CHC pueden dividirse en radiológicas y serológicas. La prueba radiológica recomendada es la ecografía abdominal (47). Esta prueba, realizada por personal experto, es actualmente la técnica de cribado más adecuada para la detección precoz de CHC, ya que se trata de una técnica no invasiva, aceptada por la población, con una sensibilidad del 60-80% y una especificidad superior al 90% para la detección precoz de CHC (48). De esta forma, las principales guías de práctica clínica, como la de la *American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)* (49) y la guía europea (6), recomiendan explorar periódicamente a los pacientes con cirrosis mediante ecografía abdominal cada 6

meses. Tras una prueba de cribado positiva, el diagnóstico definitivo se establece mediante el empleo de técnicas de imagen dinámicas y no invasivas, como la tomografía computarizada (TC) cuatrifásica y la angio-resonancia magnética (RM). La TC abdominal permite el diagnóstico de lesiones de más de 2 cm de tamaño, mientras que la RM abdominal posee la ventaja de no requerir contraste nefrotóxico (50). No obstante, estas técnicas deben desaconsejarse como técnicas de cribado por el riesgo asociado a la irradiación (51), así como por motivos de coste-eficacia y menor disponibilidad.

Otras técnicas de imagen menos utilizadas actualmente en el diagnóstico, son la angiografía, la gammagrafía y la tomografía por emisión de positrones (PET). La técnica PET-TC combina la tomografía por emisión de positrones con la tomografía computarizada y es una modalidad de imagen que utiliza marcadores emisores de positrones. El marcador más utilizado en esta técnica para la evaluación de pacientes con cáncer es la [18F]-fluorodesoxiglucosa (18F-FDG), un análogo de la glucosa. El metabolismo de la glucosa aumenta rápidamente en células en división y crecimiento, lo que provoca un aumento de la captación de 18F-FDG. La FDG-PET, especialmente cuando se combina con la TC, es muy sensible en la estadificación de las neoplasias malignas y se ha establecido como una herramienta de diagnóstico de varios cánceres. Sin embargo, la precisión diagnóstica de FDG-PET para la evaluación de CHC es limitada debido a la captación variable de FDG en CHC (52). El CHC no es un tumor muy ávido por la FDG-PET, ya que se observa captación en menos del 40% de los casos (6), y los CHC mejor diferenciados son negativos para la PET con 18F-FDG. Sin embargo, la captación de 18F-FDG parece tener un valor pronóstico potencial ya que se asocia con mal pronóstico, aumento de la alfa-fetoproteína sérica (AFP) e invasión vascular. Por tanto, puede facilitar la selección de pacientes para resección quirúrgica o trasplante de hígado (53). Para medir la cantidad relativa de captación de 18F-FDG, se suele emplear el Valor Estandarizado de Captación (SUV) (54), en función de la cantidad de 18F-FDG inyectado y el peso del paciente, lo que facilita la comparación de valores entre distintos pacientes. La sensibilidad de la FDG-PET para detectar el CHC es aproximadamente del 50% al 70% y la captación de 18F-FDG por el CHC varía según la diferenciación histológica del tumor. La evidencia respalda una relación entre las imágenes de FDG-PET y el grado de diferenciación tumoral (52), por lo que esta técnica es útil sobre todo para detectar metástasis a distancia (55).

A pesar del perfeccionamiento de las técnicas de imagen, en un número considerable de casos es preciso recurrir a la realización de técnicas invasivas como la biopsia y el estudio

histológico para establecer el diagnóstico de CHC (47). No obstante, la realización de una punción en un nódulo hepático en un paciente cirrótico no siempre es posible ya que, en algunos casos, la presencia de ascitis o de alteraciones en la coagulación del paciente contraindica este procedimiento. También se pueden presentar otras complicaciones como difícil acceso percutáneo o difícil visualización de los pequeños nódulos por ecografía, dificultando así la extracción de la muestra. Por otra parte, al tratarse de un procedimiento invasivo, es importante considerar que la toma de biopsias lleva implícito un riesgo de diseminación local tras la punción de estos nódulos, si bien la incidencia de esta complicación es inferior al 0,1% (56).

Respecto a las pruebas serológicas que complementan al diagnóstico, el marcador tumoral más evaluado ha sido la AFP. La AFP es una glicoproteína compuesta por 591 aminoácidos con una vida media de 5-7 días. Normalmente producida por el saco vitelino fetal, el hígado y el intestino, los niveles elevados pueden asociarse con el CHC en el contexto clínico apropiado (57). Niveles séricos de AFP mayores de 10 ng/mL se detectan aproximadamente en el 75% de los CHCs; sin embargo ha mostrado un bajo rendimiento dado que sus valores en muchos casos son normales en tumores iniciales (58) y alrededor del 80% de tumores de pequeño tamaño (menores de 2cm) no expresan AFP. Además, los pacientes con cirrosis hepática pueden presentar elevaciones transitorias de AFP en ausencia de CHC (59,60) y diferentes neoplasias como el colangiocarcinoma o metástasis de origen gastrointestinal también pueden presentar niveles elevados de este marcador tumoral (61,62). La sensibilidad y la especificidad de este biomarcador dependen de los valores de corte elegidos: el valor de corte de 20 ng/mL tiene una sensibilidad de alrededor del 60% y disminuye al 22% si se usa un límite más alto (200 ng/mL), mientras que los valores de 400 ng/mL sugieren fuertemente CHC (63). Por último, existe una correlación entre niveles de AFP y estadio tumoral. Por todo ello, la AFP no es una herramienta de cribado eficaz para detección precoz, sino más bien un marcador de enfermedad avanzada (47), desaconsejando las principales guías su uso como herramienta de cribado.

Para mejorar los resultados clínicos de los pacientes, es necesario identificar nuevos biomarcadores séricos fiables. Algunos marcadores usados en combinación con AFP parecen mejorar el desempeño de este biomarcador, particularmente en términos de sensibilidad, como la proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II (PIVKA-II) (64).

Programas de cribado

Antes del año 2000, el diagnóstico de CHC requería de una confirmación histológica. En un paciente afecto de cirrosis hepática, la probabilidad de que un nódulo detectado mediante ecografía sea un CHC es muy elevada, especialmente si su diámetro es mayor de 1 cm (54). Por tanto, si el nódulo detectado supera este límite, es recomendable realizar estudios complementarios para llegar a un diagnóstico concluyente.

El CHC presenta una vascularización predominantemente arterial a diferencia del parénquima hepático en donde la vascularización es mixta: arterial y portal. Esto determina un patrón vascular específico caracterizado por una intensa captación de contraste en fase arterial, seguido de un lavado rápido del contraste en fase venosa portal o tardía (*washout* en la literatura anglosajona). Este patrón ha mostrado ser específico para el diagnóstico de CHC y permite su diagnóstico en nódulos de tan sólo 1-2 cm. Basándose en estos conocimientos, la conferencia europea de la EASL en Barcelona en el año 2000 aceptó que no es necesario obtener una muestra anatomopatológica de un CHC para diagnosticarlo (65). Estos criterios fueron admitidos internacionalmente y revisados. De esta forma, para registrar el patrón dinámico como específico de CHC debe detectarse hipervascularización en fase arterial seguido de lavado precoz en la fase venosa portal y/o de equilibrio. De acuerdo con los nuevos criterios, es posible establecer el diagnóstico no invasivo de CHC si un nódulo > 1 cm en un hígado afecto de hepatopatía crónica muestra intensa captación de contraste en fase arterial seguido de lavado precoz en fase venosa en una técnica de imagen dinámica (RM o TC con contraste). El uso de contraste órgano-específico (ácido gadoxético) no ha demostrado por el momento ventajas sobre los contrastes convencionales y se halla pendiente de validación en cuanto a especificidad.

En 2005 se revisaron los criterios de diagnóstico no invasivo por parte de la AASLD, se publicaron en una guía de práctica clínica (66) y posteriormente fueron aceptados por la EASL y por un grupo de expertos de las diferentes sociedades científicas implicadas en el manejo del CHC (67). Si la imagen no es concluyente o muestra un patrón vascular atípico, se confirmará el diagnóstico histológicamente por biopsia. Si ésta resulta negativa, se realizará un control periódico cada 3-6 meses mediante pruebas de imagen con la finalidad de detectar su posible crecimiento o repetición de biopsia. En los casos en los que se observe un nódulo menor de 1 cm, dada la baja probabilidad de que sea de naturaleza maligna se recomienda realizar un seguimiento estrecho (cada 3-4 meses) mediante

ecografía abdominal durante 2 años. Si no hay crecimiento en este tiempo, se debe volver al cribado habitual cada 6 meses (47). Si estos nódulos crecen o sufren cambios, se realizarán pruebas de imagen complementarias.

Estos criterios no invasivos basados en la detección del patrón vascular específico de CHC son solamente aplicables en pacientes afectados de hepatopatía crónica. En el caso de pacientes sin cirrosis establecida y/o ausencia de enfermedad hepática crónica, la aplicación de estos criterios de imagen no es válida y es necesario un estudio anatomopatológico para obtener un diagnóstico concluyente (47). La estrategia diagnóstica ante el hallazgo de una lesión ocupante de espacio (LOE) hepática en un paciente cirrótico se resume en el algoritmo de la figura 2 (68).

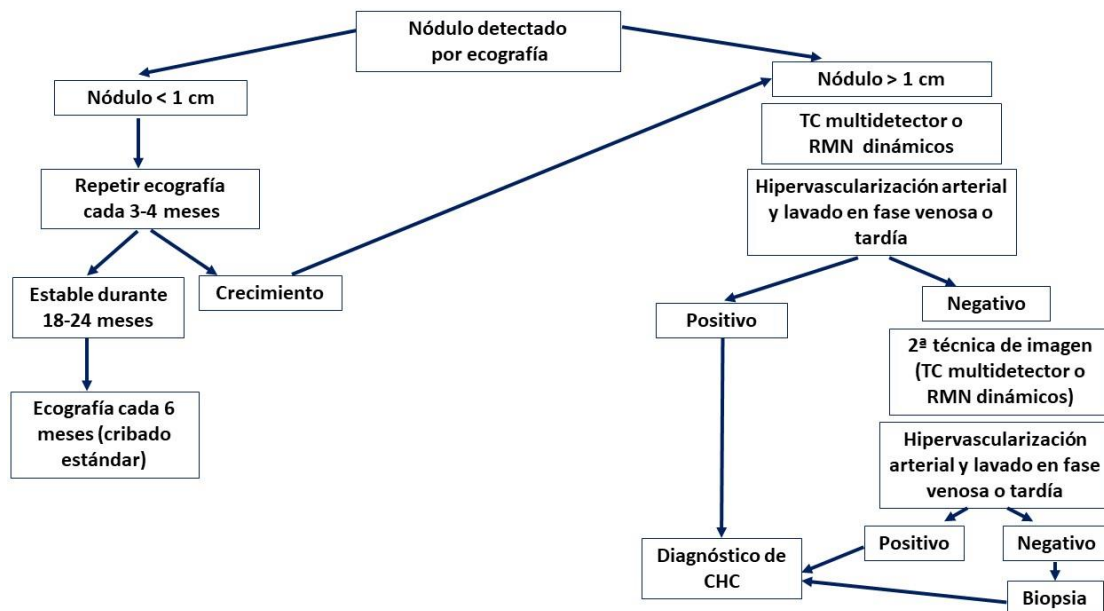


Figura 2. Algoritmo diagnóstico de una lesión hepática. Adaptada de Forner A. y cols., Lancet 2018.

1.1.5 Valoración de la función hepática en CHC

- Parámetros bioquímicos indicadores de función hepática

En primer lugar, hay que tener en cuenta que el rango de referencia para cualquier test de laboratorio se encuentra en el intervalo comprendido entre ± 2 desviaciones estándar en relación al valor medio obtenido a partir de una población sana de similares características. Según este criterio, hasta un 5% de la población sana a la que se le solicitan pruebas de función hepática presentan al menos un valor alterado. Asimismo, un resultado normal no excluye con total seguridad la existencia de patología hepática. Por tanto, una adecuada interpretación de los resultados de cualquier test de función hepática debe ir siempre precedida de una rigurosa historia clínica del paciente en la que se recojan los signos y síntomas que dicho paciente presenta. A continuación describimos algunas de las pruebas más relevantes en la monitorización de la función hepática en pacientes con CHC (69):

- Albúmina

Debido a que muchas proteínas plasmáticas son sintetizadas en el hígado, su determinación constituye una ayuda en el diagnóstico y monitorización de las enfermedades hepáticas, siempre teniendo en cuenta que las variaciones en su concentración plasmática pueden deberse a otras causas como: variaciones en el metabolismo, expansión del plasma, excreción incrementada, etc. La medición de albúmina en sangre, cuyos valores de referencia son 3,5-5 g/dL, es un buen marcador de la función hepática ya que es la proteína más abundante del plasma y es producida exclusivamente por el hígado. En la enfermedad hepática crónica, como el CHC, los valores de albúmina disminuyen con la progresión de la cirrosis. Por ello, el nivel de albúmina sérica se considera un índice fidedigno de los enfermos hepáticos crónicos siendo el pronóstico del paciente más desfavorable cuanto menor sea su concentración. Este parámetro bioquímico forma parte del índice de Child-Pugh y de los sistemas de estadificación *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC), *The Cancer of the Liver Italian Program* (CLIP) y *Albumin-bilirubin score* (ALBI), entre otros.

- Bilirrubina

La bilirrubina es otro de los parámetros que refleja la función hepática del paciente con hepatopatía. Al igual que la albúmina, también forma parte del índice de Child-Pugh, así como de los sistemas de estadificación BCLC, *Chinese University Prognostic Index* (CUPI), CLIP y de la reciente clasificación ALBI. La hiperbilirrubinemia, que implica una concentración en suero superior a 1-1,5 mg/dL, se relaciona con un mal pronóstico en los pacientes con CHC, así como con la recurrencia tardía (70).

- Tiempo de protrombina (TP)

El TP mide el tiempo requerido para que el plasma coagule tras la adición de factor tisular y fosfolípido. Es comúnmente informado en segundos y comparado con valores de referencia en pacientes. Este parámetro es afectado por cambios en la actividad de los factores X, VII, V, II (protrombina) y I (fibrinógeno). Todos estos factores son sintetizados en el hígado, por lo que un TP mayor de 3 segundos por encima del límite superior de referencia indica daño hepático severo. Un TP notablemente prolongado es un buen índice de lesión hepática grave en la hepatitis y cirrosis, además de presagiar el inicio de una cirrosis hepática fulminante.

- Aspartato aminotransferasa (AST) o transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) y alanina aminotransferasa (ALT) o transaminasa glutámicopirúvica (GPT)

Las transaminasas o aminotransferasas están presentes en la mayoría de tejidos y especialmente en el hígado. Son enzimas intracelulares, cuyo papel biológico es la catalización de la conversión de aminoácidos en alfa-oxoácidos mediante la transferencia de grupos amino. Su concentración en plasma refleja la liberación debida a la renovación celular fisiológica o a lesión celular, aunque no haya alteración de las funciones hepáticas. La ALT o GPT es el parámetro más sensible y específico de daño hepatocelular.

- Lactato deshidrogenasa (LDH)

Los datos de varios análisis sobre diferentes tipos de cáncer sugieren que los niveles de LDH pueden ser un factor pronóstico importante. Así, en los pacientes con cáncer colorrectal, la regulación al alza de la LDH se asocia con un mayor riesgo de metástasis ganglionares y a distancia, y se ha demostrado que los niveles séricos elevados de LDH se correlacionan con una disminución de la mediana de la supervivencia global. También se ha observado una fuerte asociación entre la expresión de LDH y un fenotipo agresivo en cáncer gástrico y cáncer de páncreas. El papel de la LDH en el CHC ha sido investigado por diferentes autores en distintas poblaciones de pacientes. Se ha probado como posible biomarcador en estudios retrospectivos, en pacientes sometidos a cirugía, quimioembolización transarterial (TACE) y terapia sistémica. En la mayor parte de estos estudios, los niveles séricos elevados de LDH parecen predecir un peor pronóstico (71).

En la tabla 1 se resumen las principales pruebas de laboratorio de interés en la valoración de la función hepática y daño hepatocelular en el CHC.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para la valoración de la función y el daño hepático en el CHC.

Pruebas bioquímicas	Utilidad clínica
Alanina aminotransferasa (ALT/GPT)	Daño hepatocelular
Aspartato aminotransferasa (AST/GOT)	Daño hepatocelular
LDH	Daño hepatocelular
Fosfatasa alcalina	Colestasis, obstrucción biliar
Gamma glutamil transferasa (GGT)	Colestasis, obstrucción biliar
Bilirrubina	Función hepática, colestasis, obstrucción biliar
Albúmina	Función hepática
Tiempo de protrombina	Función hepática

- Parámetros indicadores de inflamación

Se ha demostrado que la inflamación sistémica está relacionada con mal pronóstico y aumento de la progresión del tumor. El tumor puede regular al alza el proceso inflamatorio, y las células inflamatorias pueden liberar citoquinas y mediadores para promover la angiogénesis, la proliferación tumoral y la metástasis (72).

La presencia de la respuesta inflamatoria sistémica puede detectarse tanto por la elevación del nivel de proteína C reactiva (PCR) como por índices como el ratio neutrófilos-linfocitos (RNL) (73) o el ratio plaquetas-linfocitos (RPL) (72). La evidencia científica sostiene que estos marcadores son útiles para predecir la supervivencia de los pacientes diagnosticados de afecciones hepáticas y de diferentes tipos de cáncer, como el colangiocarcinoma, el cáncer de esófago, el de páncreas, el gástrico, el colorrectal y el CHC (74).

- PCR

La PCR es una proteína de fase aguda que se produce principalmente en el hígado. Tras un estímulo de fase aguda, citoquinas como la interleucina (IL)-1 β e IL-6 estimulan la producción de PCR en los hepatocitos, que luego se libera a la circulación sistémica. La PCR desempeña un papel clave en una amplia gama de procesos inflamatorios y proporciona un vínculo entre el sistema inmunitario innato y el adaptativo. Además de las infecciones agudas y crónicas, los valores de PCR pueden estar elevados en pacientes con cáncer. De hecho, varios estudios han informado de un valor pronóstico de los niveles elevados de PCR en diferentes tipos de cáncer, incluido el CHC (75). Así, un nivel sérico elevado de PCR previo al tratamiento se asocia con una recidiva temprana del CHC y una peor supervivencia después del trasplante (76).

- RNL

El cociente o ratio neutrófilos-linfocitos (RNL) se define como el recuento absoluto de neutrófilos dividido entre el recuento absoluto de linfocitos, obtenidos a partir del hemograma del paciente. Varios estudios han demostrado que una elevación de este índice se correlaciona con la progresión del tumor, la metástasis y

la evolución clínica en el CHC, así como en otros tumores. También un RNL elevado se asocia con la presencia de invasión vascular (73).

Halazun y cols. describieron por primera vez la relación entre el RNL y el CHC, demostrando que un RNL elevado (>5) se asociaba a una mala SG y a recidiva en pacientes sometidos a TOH por CHC (77). Posteriormente, varios estudios demostraron que el RNL se asociaba significativamente con la SG y con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) tras diferentes tratamientos, como la TACE, la ablación por radiofrecuencia y la resección.

- RPL

El cociente o ratio entre plaquetas y linfocitos (RPL) se ha utilizado como marcador para evaluar las respuestas inflamatorias sistémicas y ha demostrado ser un factor pronóstico en varios tumores. En el caso del CHC, existen datos contradictorios sobre la capacidad del RPL para predecir el pronóstico de los pacientes con esta patología (72).

- Otros parámetros de laboratorio en la evaluación del CHC

- Ferritina
- Colesterol
- Triglicéridos
- Leucocitos
- Plaquetas

1.1.6 Pronóstico

El CHC es diferente de otros tumores sólidos debido a la posibilidad de enfermedad hepática crónica preexistente o condición de cirrosis, que tiene efectos negativos tanto en la supervivencia como en las opciones de tratamiento (78). La evaluación del pronóstico es un paso crucial en el tratamiento de pacientes con CHC. Hay 4 grupos principales de factores pronósticos: factores relacionados con el tumor, factores relacionados con el estado

hepático subyacente, factores relacionados con el estado de salud general del paciente y factores relacionados con la eficacia del tratamiento (79).

Dado que la mayoría de los pacientes tienen una enfermedad hepática asociada, la evaluación pronóstica debe incorporar no solo el estadio del tumor, sino también el grado de deterioro de la función hepática. Además, la presencia de síntomas relacionados con el cáncer ha mostrado constantemente un efecto negativo sobre la supervivencia. De esta forma, la predicción del pronóstico se define mediante variables relacionadas con el estado del tumor (tamaño, número, invasión vascular), la función hepática (bilirrubina, hipertensión portal, preservación de la función hepática) y el estado de salud (escala ECOG *performance status*, confeccionada por el *Eastern Cooperative Oncology Group*) (6).

En cuanto a los marcadores séricos, en general han sido poco explorados para predecir el pronóstico de esta enfermedad. El aumento de AFP se asocia a un peor pronóstico. Se recomienda que los niveles de AFP >200 ng/mL se consideren factores de mal pronóstico en los estudios de investigación. Asimismo, se ha demostrado que los niveles elevados de AFP predicen el riesgo de recidiva tumoral tras la resección, el riesgo de abandono de los pacientes en lista de espera para trasplante de hígado, la supervivencia y el riesgo de recidiva tumoral tras el trasplante hepático y la respuesta a las terapias locorregionales (6).

1.1.7 Estadificación

Aunque existe una clara necesidad de un sistema de estadificación óptimo que guíe a los clínicos hacia el mejor enfoque terapéutico, actualmente no se dispone de un sistema de pronóstico universalmente aceptado. Un sistema idóneo de estadificación del CHC sería aquel que, además de ser reproducible y útil en la práctica clínica, fuese aplicable a todo tipo de pacientes, con distintas hepatopatías y que tenga en cuenta la función hepática. En la actualidad, existen más de 15 clasificaciones de estadificación de CHC que miden diferentes factores y se han desarrollado en diferentes poblaciones de pacientes. Entre los componentes comunes de los actuales sistemas de estadificación encontramos: la función hepática, el nivel de AFP, el estado funcional, el número y tamaño del tumor, la invasión microvascular y macrovascular y la presencia de metástasis (79). La estadificación del CHC tiene como objetivo establecer el pronóstico y permitir la selección del tratamiento más adecuado para cada paciente (6).

La clasificación de Child-Pugh, que incluye bilirrubina total, albúmina, razón normalizada internacional (INR) o tiempo de protrombina, encefalopatía hepática y ascitis, es el sistema de puntuación más comúnmente utilizado para evaluar el pronóstico de la cirrosis hepática (80). Originalmente conceptualizado por Child y Turcotte en 1964 y posteriormente modificado por Pugh en 1972, divide a los pacientes en tres categorías: A (buena función hepática), B (función hepática moderadamente alterada) y C (disfunción hepática avanzada) (81). Además, introdujeron puntos variables para cada criterio en función del aumento de la gravedad (tabla 2) (82).

Así, según la gravedad de la cirrosis podemos distinguir:

- Child-Pugh A: de 5 a 6 puntos.
- Child-Pugh B: de 7 a 9 puntos.
- Child-Pugh C: de 10 a 15 puntos.

Tabla 2. Escala de Child-Pugh. Adaptada de Tsois y cols., 2020 (82).

Parámetros	Puntos asignados		
	1	2	3
Encefalopatía	No	Grado 1-2	Grado 3-4
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada
Bilirrubina (mg/mL)	<2	2-3	>3
Albúmina (mg/mL)	>3,5	2,8-3,5	<2,8
TP (segundos prolongados)	<4	4-6	>6
INR*	<1,7	1,7-2,2	>2,2

*Con frecuencia, INR se utilizará como sustituto de TP.

Se han propuesto varios sistemas de estadificación para proporcionar una clasificación clínica del CHC. Los principales son el BCLC, el TNM (*Tumour-Node-Metastasis*), desarrollado conjuntamente por el AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) y la UICC (*International Union for Cancer Control*), y el CLIP. De estos, el sistema más utilizado y ampliamente aceptado es el BCLC. Desde su publicación original en 1999, se ha ido perfeccionando hasta su última versión (figura 3). Este sistema incluye variables asociadas al estadio tumoral, función hepática y calidad de vida del enfermo, estimada con la escala “ECOG *performance status*”, que clasifica a los pacientes en 5 grados, según su capacidad física (tabla 3). El

sistema BCLC establece el pronóstico de acuerdo con 5 estadios que se vinculan a la posible indicación de tratamiento.

Tabla 3. Escala funcional ECOG. Adaptada de Sørensen JB y cols., 1993 (83).

Grado	Definición
0	Sin restricciones.
1	Con restricción de la actividad física intensa pero capaz de desempeñar trabajos ligeros o de naturaleza sedentaria.
2	Ambulatorio y capaz de autocuidado, pero incapaz de desempeñar actividades laborales. Se levanta >50% del tiempo.
3	Solamente capaz de autocuidado limitado. Confinado a cama o sillón >50% del tiempo.
4	Incapaz de realizar autocuidado. Confinado a cama o sillón todo el tiempo.
5	Fallecido.

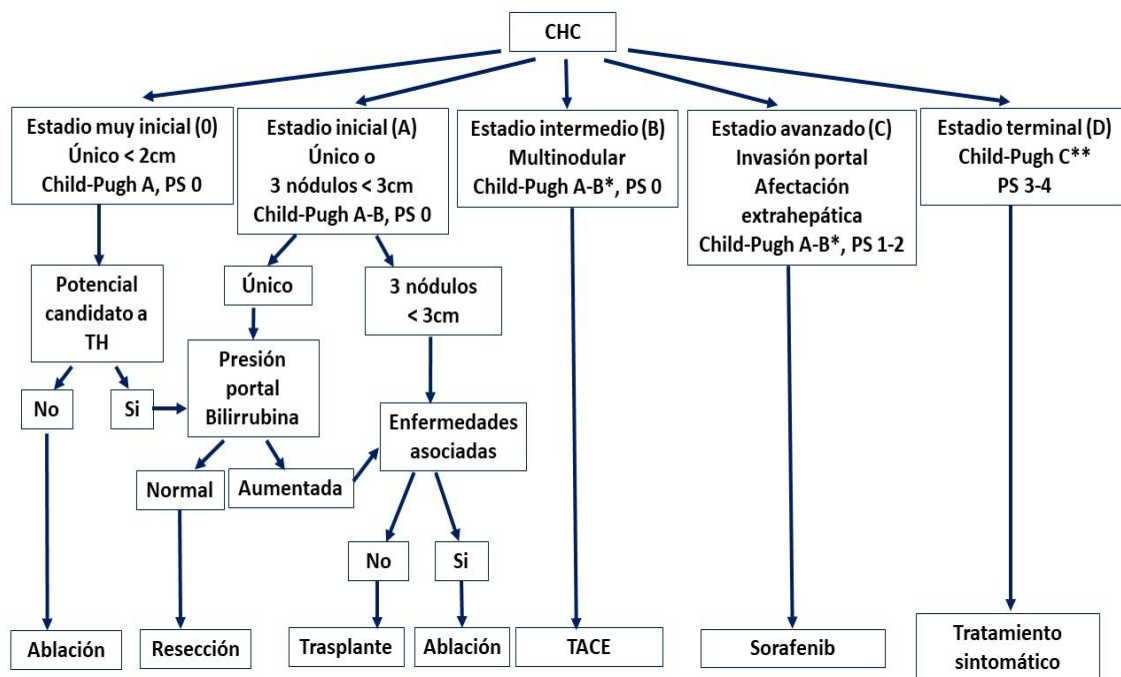


Figura 3. Sistema de estadificación BCLC. PS: *performance status*; TH: trasplante hepático; TACE: *transarterial chemoembolization* (quimioembolización transarterial). Adaptada de Forner A. y cols., 2016.

* La clasificación Child-Pugh no identifica a todos los pacientes con disfunción hepática grave que precisan considerar la opción de TH.

** Pacientes con cirrosis en estadio terminal debido a disfunción hepática grave (Child-Pugh C o estadios más iniciales con episodios predictores de mal pronóstico, puntuación MELD elevada) deben considerarse para trasplante hepático. En estos pacientes, la presencia de un CHC puede suponer una contraindicación para TH si excede los criterios de inclusión.

Las actuales guías de práctica clínica de la EASL (6) respaldan la clasificación BCLC por varias razones. Incluye variables de pronóstico relacionadas con el estado del tumor, la función hepática y el estado de salud junto con variables dependientes del tratamiento obtenidas de estudios de cohortes y ensayos aleatorizados. Ha sido validado externamente en diferentes contextos clínicos y es un sistema en evolución que vincula el estadio tumoral con la estrategia de tratamiento de manera dinámica, lo que permite incorporar avances novedosos en la comprensión del pronóstico o el manejo del CHC.

El sistema de estadificación TNM (tabla 4) clasifica a los enfermos según la extensión del tumor primario (T), los ganglios linfáticos regionales (N) y las metástasis a distancia (M) en 7 estadios (I, II, III A, III B, III C, IV A, IV B) (84). Este sistema es aplicable para predecir la supervivencia de los pacientes que se han sometido a resección quirúrgica de un CHC (39).

Tabla 4. Sistema de estadificación TNM. Adaptada de Edge SB y cols., 2010 (84).

Tumor primario (T)	
TX	Tumor primario que no puede ser verificado
T0	Sin evidencia de tumor primario
T1	Tumor solitario sin invasión vascular
T2	Tumor solitario con invasión vascular, o tumores múltiples ninguno mayor de 5 cm
T3a	Múltiples lesiones mayores de 5 cm
T3b	Cualquier lesión que afecta a una rama principal portal o de la vena hepática
T4	Tumores con invasión directa de órganos adyacentes, diferente a la vesícula biliar o invadiendo el peritoneo visceral
Ganglios linfáticos regionales (N)	
NX	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser verificados
N0	Sin metástasis a ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis a ganglios linfáticos regionales
Metástasis a distancia (M)	
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
Estadios	
Estadio I	T1
Estadio II	T2
Estadio III A	T3a
Estadio III B	T3b
Estadio III C	T4
Estadio IV A	Cualquier T
Estadio IV B	Cualquier T

El sistema CLIP, desarrollado por un grupo italiano, incorpora la clasificación de Child-Pugh, morfología tumoral, AFP sérica y existencia de trombosis portal (tabla 5). En la determinación de las tasas de supervivencia en pacientes sometidos a terapias no quirúrgicas como la TACE en varios países, se encontró que el sistema CLIP era superior a los sistemas TNM, Okuda y Child-Pugh (85).

Tabla 5. Sistema de estadificación CLIP (86).

Variable	Puntuación
Estadio Child-Pugh	
A	0
B	1
C	2
Morfología tumoral	
Uninodular y extensión ≤50%	0
Multinodular y extensión ≤50%	1
Masivo o extensión >50%	2
AFP	
<400 ng/mL	0
≥400 ng/mL	1
Trombosis de la vena porta	
Ausente	0
Presente	1

Otros sistemas de estadificación son el Okuda, el CUPI (*Chinese University Prognostic Index*), el Francés (*Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire*), el ALBI, el HKLC (*Hong Kong Liver Cancer*) y el JIS (*Japan Integrated Staging*). El sistema Okuda utiliza el tamaño tumoral y otras 3 variables que evalúan la gravedad de la cirrosis: cantidad de ascitis, nivel de bilirrubina sérica y nivel de albúmina (Tabla 6). Además, a diferencia de la clasificación TNM, no considera variables como la invasión vascular o la metástasis ganglionar (87).

Tabla 6. Sistema Okuda. Adaptada de Selçuk H y cols., 2017 (79).

Factores que representan enfermedad avanzada	
Tamaño tumoral >50% del parénquima hepático	
Presencia de ascitis	
Niveles de albúmina <3 g/dL	
Niveles de bilirrubina >3 mg/dL	
Estadio I	Sin factores presentes
Estadio II	1-2 factores presentes
Estadio III	3-4 factores presentes

El sistema de estadificación CUPI clasifica a los pacientes como bajo, intermedio o alto riesgo (88). Incorpora ascitis, bilirrubina sérica, fosfatasa alcalina, AFP y síntomas al diagnóstico. La clasificación pronóstica propuesta por el sistema francés (89), incluye cinco parámetros clínicos, biológicos y ecográficos simples y divide a los pacientes con CHC en 3 grupos pronósticos diferentes (A, B y C). En cuanto al sistema ALBI, fue desarrollado por Johnson y cols. para solucionar la falta de validación de la puntuación de Child-Pugh en pacientes con CHC avanzado (90). La puntuación de ALBI se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Puntuación de ALBI} = (\text{Log [bilirrubina } (\mu\text{mol/L})] \times 0,66) - (\text{albúmina (g/L)} \times 0,085)$$

Este modelo estratifica a los pacientes en 3 categorías según el estado funcional del hígado. Las ventajas de la puntuación ALBI son su simplicidad y su validez en poblaciones de CHC grandes, contemporáneas e internacionalmente diversas. En general, el rendimiento pronóstico del sistema BCLC basado en ALBI frente al sistema basado en Child-Pugh es similar (91).

El sistema de estadificación HKLC surgió de una gran cohorte de pacientes (n=392; en su mayoría relacionados con el VHB) e identifica nueve estadios y subclases (92). Esta propuesta tiene algunas limitaciones: la supervivencia entre diferentes estadios se superpone, no existe validación externa en países occidentales que evalúe su rendimiento en una población que incluya todos los estadios de la enfermedad, y además, la población utilizada para desarrollar este sistema de estadificación ya estaba tratada por lo que el resultado fue analizado retrospectivamente, introduciendo un sesgo de selección involuntario contra la TACE en comparación con la resección (6). Por último, el sistema japonés JIS incluye biomarcadores como AFP o PIVKA-II (93).

1.1.8 Tratamiento

El objetivo del tratamiento es aumentar la supervivencia manteniendo la calidad de vida. En estadios iniciales es posible aplicar tratamientos con intención curativa, como la resección quirúrgica, el trasplante hepático y la ablación. En estadio intermedio, el único tratamiento que ha demostrado aumento de supervivencia es la TACE cuando se aplica de acuerdo con los criterios recomendados. En el CHC avanzado el único tratamiento que ha demostrado hasta la fecha beneficio en términos de supervivencia es el sorafenib.

Finalmente, en el estadio terminal se deben recomendar medidas paliativas (47). La indicación del tratamiento debe evaluarse individualmente y, si los pacientes no son candidatos para la terapia de primera línea según el estadio, se debe considerar la siguiente opción más adecuada dentro del mismo estadio o el tratamiento para un tumor en estadio más avanzado (concepto conocido en inglés como *treatment stage migration*) (94).

La resección quirúrgica es la primera opción en aquellos tumores únicos que aparecen sobre hígados no cirróticos, en los que se puede realizar resecciones amplias con un riesgo bajo de complicaciones (95–97). Sin embargo, en nuestro medio, la mayoría de los CHC aparecen sobre una enfermedad hepática crónica, habitualmente en fase cirrótica.

El trasplante ortotópico de hígado (TOH) es el tratamiento de elección en aquellos pacientes con CHC que no sean candidatos óptimos para resección quirúrgica, que no tengan ninguna enfermedad extrahepática que contraindique el procedimiento y que presenten un CHC dentro de los criterios de Milán (94): tumores únicos ≤ 5 cm o con un máximo de 3 nódulos ≤ 3 cm, sin invasión vascular ni diseminación extrahepática. Estos criterios son el punto de referencia para ofrecer la mejor supervivencia post-trasplante de hígado en el CHC ($>70\%$ de supervivencia a los 5 años) y son los criterios de selección aceptados en Europa y Estados Unidos. De esta forma, el trasplante hepático es la mejor opción de tratamiento, ya que podría curar simultáneamente el tumor y la cirrosis subyacente. No obstante, la aplicabilidad del TOH es limitada debido sobre todo a la escasez de donantes, ya que el número de candidatos excede el número de órganos disponibles y, por tanto, existe un tiempo de espera entre la indicación y el trasplante durante el cual la neoplasia puede progresar y llegar a contraindicar la intervención (98). Se han propuesto algunas estrategias para disminuir el riesgo de progresión durante el tiempo de espera:

1. Aumento del número de donantes: una opción potencialmente eficaz es el desarrollo de programas de trasplante a partir de donante vivo. La donación en vivo es una estrategia válida con resultados similares a los de la donación de fallecidos, pero su aplicabilidad se reduce debido a las limitaciones sociales y la escasez de donantes adecuados.
2. Sistemas de priorización: el objetivo es trasplantar antes a aquellos pacientes con alta probabilidad de progresión durante el tiempo en lista y demorar a aquellos con enfermedad menos agresiva. El sistema *Model for End-Stage Liver*

Disease (MELD) para pacientes con hepatopatía avanzada, fue implementado por UNOS (*United Network for Organ Sharing*) en 2002. Este sistema de puntuación se basa en 3 variables bioquímicas: bilirrubina, creatinina y el INR, para predecir la mortalidad a los 3 meses. A mayor riesgo de muerte, mayor puntuación (rango 6 a 40), lo que también equivale a una mayor prioridad para recibir un hígado de donante (99). Más tarde se planteó la posibilidad de introducir en la fórmula el sodio sérico para aquellos pacientes con tendencia a la hiponatremia (100). Los pacientes con CHC habitualmente presentan un MELD bajo, ya que la indicación del trasplante viene dada por el CHC y no por la gravedad de la cirrosis por lo que si se aplica el sistema MELD sin correcciones quedarían en desventaja respecto a pacientes sin CHC pero con puntuaciones MELD más elevadas. Para solucionar este problema, el sistema MELD asigna actualmente puntuaciones de "excepción" o arbitrarias a los pacientes con CHC dentro de los criterios de Milán, con la intención de reflejar la mortalidad prevista de los candidatos en la lista de espera debido a la progresión del tumor (101).

3. Aplicación de tratamientos durante el tiempo de espera: aunque no existe ningún ensayo clínico aleatorizado que haya demostrado que la aplicación de tratamientos locorregionales durante el tiempo de espera aumente la supervivencia, diferentes estudios observacionales y análisis de coste-efectividad han sugerido que el tratamiento en lista mediante radiofrecuencia o TACE disminuye la tasa de exclusión; por tanto, en aquellos centros donde el tiempo de espera supera los 6 meses, está indicado considerar la realización de tratamiento locorregional (102). Probablemente, si el tiempo de espera supera los 18-24 meses, no existirá beneficio significativo de aplicar tratamiento dado que la probabilidad de progresión supera la probabilidad de éxito (103).

La ablación percutánea es el tratamiento de elección de aquellos pacientes afectos de CHC en estadio inicial en los que la resección quirúrgica no es posible y el trasplante hepático está contraindicado por enfermedad asociada. Al mismo tiempo, es una opción terapéutica para intentar evitar la progresión tumoral durante el tiempo de espera de trasplante

hepático. La ablación del tumor puede realizarse a través de la instilación de sustancias químicas, principalmente etanol y ácido acético, o mediante modificación de la temperatura intratumoral, como en el caso de la radiofrecuencia, crioablación, microondas o láser (104). Actualmente la ablación mediante radiofrecuencia (RFA) constituye la técnica de referencia, mientras que la inyección de alcohol ha quedado reservada para indicaciones muy especiales por localización o para completar la ablación cuando existe mínima actividad residual. El principal inconveniente de la ablación percutánea, al igual que la resección quirúrgica, es la alta recurrencia (80% a los 5 años) a pesar de obtener una respuesta completa inicial (105).

La TACE es el único tratamiento que ha mostrado beneficio en términos de supervivencia en pacientes con CHC intermedio (estadio B de la clasificación BCLC). Este tratamiento está basado en la vascularización predominantemente arterial del CHC. Consiste en la cateterización selectiva de las ramas arteriales que nutren al tumor y en la inyección de un agente quimioterápico junto con una sustancia embolizante (106). La TACE está contraindicada en pacientes con cirrosis descompensada (Child-Pugh B \geq 8, incluyendo encefalopatía, ictericia y ascitis refractaria), afectación extensa de ambos lóbulos hepáticos, reducción del flujo portal (trombosis o flujo hepatofugal), fístula arteriovenosa no tratable, anastomosis bilioentérica o *stent* biliar y un aclaramiento de creatinina <30 mL/min. En todos estos casos el beneficio de la supervivencia es marginal, existiendo un alto riesgo de descompensación de la hepatopatía (106). Entre los efectos secundarios de la TACE, podemos observar desde un simple síndrome postembolización, que suele cursar con fiebre, íleo y dolor abdominal, hasta abscesos, colecistitis, fallo hepático o incluso muerte (47). La TACE convencional consiste en la administración de un agente quimioterápico (los más frecuentes son adriamicina o cisplatino), juntamente con lipiodol como vehículo transportador, seguida de la oclusión del flujo arterial con sustancias embolizantes como el alcohol de polivinilo. De esta forma se consigue una máxima concentración del fármaco en el tumor con una mínima concentración sistémica de este, junto a una oclusión de los vasos que nutren al tumor.

En los últimos años se ha evaluado la seguridad y eficacia del uso de microesferas sintéticas cargadas de adriamicina, con la introducción de un nuevo sistema denominado TACE-DEB (*drug-eluting beads*) que liberan lentamente la quimioterapia una vez inyectadas. Con estas esferas se consigue una oclusión vascular simultáneamente con la administración del quimioterápico que impide el lavado del mismo, con lo que su paso a la circulación

sistémica se reduce, minimizando los efectos secundarios, aumentando la tolerancia y alcanzando respuestas radiológicas cercanas al 80% (107).

En los últimos años han aparecido otros tratamientos locorregionales potencialmente útiles, entre los que cabe destacar la radioembolización mediante esferas de Ytrio-90 (108). Diversos estudios prospectivos incluyendo a pacientes en diferentes estadios de la enfermedad han obtenido resultados positivos en términos de respuesta radiológica y una buena tolerancia clínica al tratamiento junto con una supervivencia comparable a la obtenida en pacientes tratados mediante TACE o con sorafenib (109).

En cuanto a la quimioterapia convencional como opción terapéutica (habitualmente oxaliplatino y doxorubicina), no ha demostrado un beneficio significativo en la supervivencia (47), ya que probablemente el CHC es poco sensible a ésta, debido, al parecer, a la expresión de genes resistentes (110). El único tratamiento que ha mostrado eficacia en términos de supervivencia en ensayos clínicos controlados con placebo es el sorafenib. Este fármaco es un inhibidor multiquinasa de bajo peso molecular y gran biodisponibilidad por vía oral que actúa bloqueando diferentes vías de señalización asociadas con la hepatocarcinogénesis (111). El sorafenib fue el primer fármaco sistémico aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento del CHC y es la terapia de primera línea. La mayoría de los agentes y otros enfoques de tratamiento probados posteriormente en los ensayos de fase 3 no lograron mejorar ni igualar la eficacia del sorafenib como tratamiento de primera línea; tampoco aumentaron la supervivencia, en comparación con el placebo, para el tratamiento de segunda línea. El sorafenib siguió siendo la única opción eficaz para el tratamiento de primera línea hasta que lenvatinib, otro inhibidor de múltiples quinastas, mostró actividad antitumoral en un ensayo de no inferioridad, recibiendo este fármaco la aprobación de la FDA para el tratamiento del CHC en 2018 (112). El regorafenib es también un fármaco inhibidor de multiquinastas que, administrado por vía oral, provoca un descenso en la angiogénesis y en la proliferación celular. Este fármaco se recomienda como tratamiento de segunda línea en pacientes con CHC avanzado, tras fracaso en el tratamiento con sorafenib en pacientes que toleran dicho fármaco (68). Por último, cabozantinib, un inhibidor de MET, VEGFR2 y RET aprobado para el cáncer de tiroides y riñón, ha mostrado beneficios de supervivencia en comparación con el placebo en segunda línea (113).

Forner y cols. propusieron un enfoque de tratamiento secuencial, publicado en 2018 (figura 4), en el que cada estadio tumoral se clasifica según parámetros relativos a la carga tumoral, el grado de deterioro de la función hepática y la presencia de síntomas relacionados con el cáncer, tal como se define en el sistema BCLC. También se ilustra en la figura el concepto de migración de etapa de tratamiento: si la opción recomendada no es factible debido a la condición de un paciente individual o si hay una progresión intratable (definida como la progresión del tumor asociada a un perfil clínico que impide el retratamiento), se debe considerar la siguiente opción más adecuada dentro del mismo estadio o el tratamiento para un tumor en estadio más avanzado (68).

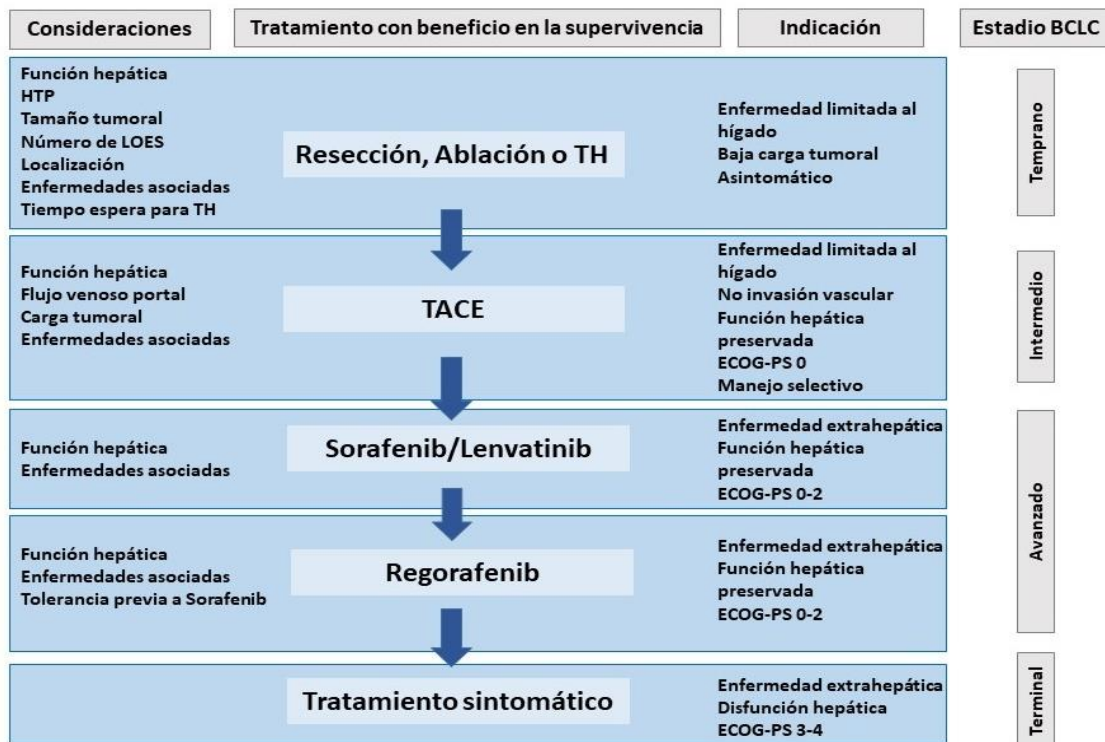


Figura 4. Propuesta de tratamiento secuencial. Adaptada de Forner y cols., 2018. (HTP: hipertensión portal; LOES: lesiones ocupantes de espacio; TH: trasplante hepático).

La respuesta tumoral en los ensayos oncológicos generalmente se mide de acuerdo con los Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) (6). No obstante, estos criterios no son válidos para el CHC, ya que no consideran la cuantía de la necrosis tras aplicar los tratamientos locales, infraestimando la respuesta tumoral radiológica. Para el control de la eficacia en el CHC se utilizan los criterios RECIST modificados (mRECIST), que se basan principalmente en la medición del componente tumoral viable e incluyen la

evaluación de la invasión vascular, la afectación de los ganglios linfáticos, los derrames y las nuevas lesiones (tabla 7). La evaluación de la respuesta debe basarse en tomografías computarizadas o resonancias magnéticas. Los marcadores tumorales séricos pueden ser útiles, pero no deben utilizarse como el único factor determinante para la decisión de tratamiento (39).

Tabla 7. Criterios RECIST modificados para la evaluación de la respuesta tumoral radiológica en el CHC. Adaptada de Lencioni, R. y cols., 2010 (111).

Criterios RECIST modificados	
Respuesta completa	Desaparición de cualquier captación de contraste en todas las lesiones diana.
Respuesta parcial	Descenso de al menos un 30% de la suma de los diámetros de las lesiones diana viables (captación arterial), tomando como referencia la suma de los diámetros de las lesiones diana antes del tratamiento.
Enfermedad estable	Aquellos casos que no cumplen criterios de respuesta parcial o progresión tumoral.
Progresión	Aumento de al menos un 20% en la suma de los diámetros de las lesiones diana viables (con captación de contraste en fase arterial), tomando como referencia la menor suma de los diámetros de las lesiones diana viables (con captación) desde el inicio del tratamiento. Cualquier lesión de nueva aparición >10 mm con patrón típico radiológico de CHC o con crecimiento progresivo en sucesivas exploraciones.

1.1.9 Recurrencia del CHC tras el trasplante hepático

A pesar de los estrictos criterios de selección, se producen recidivas en el 6%-18% de los pacientes trasplantados por CHC (114). El pronóstico de los receptores de hígado con CHC recurrente es desfavorable, con una mediana de supervivencia de aproximadamente 1 año tras el diagnóstico, presentando la mayoría de los casos (55%) recurrencia extrahepática (115). La recidiva del CHC después del TOH es notoriamente difícil de manejar. Tras un trasplante hepático, cualquier recidiva es, por definición, una metástasis del hígado nativo. El culpable es la presencia de una metástasis a distancia no diagnosticada antes del

trasplante o la diseminación de células tumorales durante el trasplante (114). Estas CTCs son células cancerosas que se han dissociado del tumor primario, entran en la circulación y pueden formar posteriormente lesiones metastásicas, considerándose un estadio intermedio de la metástasis (3). Las metástasis representan el resultado final de un proceso biológico celular de varios pasos. La EMT parece ser importante para que las células cancerosas adquieran la capacidad de migración e invasión (116).

Durante la iniciación del tumor, las células progenitoras hepáticas y los hepatocitos sufren cambios genéticos y epigenéticos que, junto con los trastornos del microambiente, acaban dando lugar a una subpoblación distinta de células madre cancerosas o *Stem Cells* circulantes (CSCs) que tienen propiedades similares a las de las células madre (117). Las CSCs hepáticas se consideran responsables de la tumorigénesis, la progresión, la metástasis y la recidiva del CHC (118). Aunque se han realizado importantes avances en la exploración de los mecanismos que subyacen al desprendimiento de las células de CHC y, por tanto, a la migración e invasión, la prevención de la metástasis del CHC sigue siendo un reto para los clínicos.

La inmunidad es la principal defensa contra el cáncer, de forma que el sistema inmunitario adaptativo reconoce y elimina las células tumorales en función de su expresión de antígenos específicos del tumor. La respuesta inmunitaria inducida por el tumor primario, denominada inmunidad concomitante, inhibe el crecimiento de los tumores secundarios. Sin embargo, tras el trasplante hepático, la inmunidad concomitante se suprime farmacológicamente, por lo que cualquier tumor microscópico *in vitro* puede progresar sin vigilancia inmunitaria. De esta forma, se ha observado que la recidiva del CHC tras el trasplante progresa significativamente más rápido que en los pacientes tratados con resección hepática. Los inhibidores de la calcineurina, como el tacrólimus y la ciclosporina, son los fármacos más empleados en la inmunosupresión de mantenimiento en los trasplantes de hígado. Además de la supresión inmunitaria del huésped, promueven la progresión del tumor a través de vías no inmunitarias relacionadas con el aumento de la expresión del factor de crecimiento transformante. Este tratamiento inmunosupresor afecta a la evolución de los tumores en los pacientes trasplantados y debe abordarse plenamente en el tratamiento integral de una recidiva. Por otra parte, la reducción de la inmunosupresión aumenta el riesgo de rechazo del injerto. De esta forma, siempre que se diagnostique una recidiva debe revisarse el inmunosupresor. Teniendo en cuenta que el

fallo inmunitario contribuye a la progresión del cáncer, la inmunosupresión debe reducirse a la menor dosis efectiva que proteja contra el rechazo (114).

1.1.10 Prevención

Para la prevención del CHC se debe evitar la adquisición de factores de riesgo, siendo así útiles la vacunación universal frente al VHB, campañas dirigidas a mejorar las condiciones socio-sanitarias de la población (evitando la contaminación alimentaria por aflatoxina), y la promoción de hábitos de vida saludables (menor consumo de alcohol y tabaco, menor incidencia de síndrome metabólico).

Si el factor de riesgo ya se ha adquirido, la única opción preventiva es evitar la progresión a cirrosis mediante la administración de tratamiento antiviral, como el tratamiento de la hepatitis C (119) junto a programas de vigilancia o cribado. La replicación del VHB se ha relacionado con un incremento del riesgo del CHC (120), por lo que se sugiere que su tratamiento debería disminuir el desarrollo de este tumor (121).

1.2 PIVKA-II

La proteína inducida por la ausencia de vitamina K o antagonista-II (PIVKA-II), también conocida como "des-gamma-carboxi protrombina" (DCP), es una molécula de protrombina anormal resultante de un defecto adquirido en la carboxilación postraduccional del precursor de protrombina en células malignas (122). Este biomarcador fue descrito por primera vez en 1963 por Hemker y cols., quienes observaron indirectamente la biosíntesis de protrombina anormal en el plasma de pacientes tratados con dicumarol (123), fármaco anticoagulante cuyo mecanismo de acción es el antagonismo de vitamina K.

En 1972, Stenflo y cols. esclarecieron su estructura química (124), al comparar la protrombina normal con la protrombina anormal, previamente purificada (125,126). Los resultados mostraron que las dos protrombinas tenían aminoácidos y carbohidratos idénticos estructuralmente; sin embargo, la protrombina anormal no logró unirse a los iones de calcio y no tuvo actividad de protrombina. En 1974, estos mismos autores informaron que la protrombina normal contenía residuos de ácido glutámico modificado, ácido γ -carboxiglutámico, a diferencia de la protrombina anormal (124). Este ácido γ -

carboxiglutámico confería a la protrombina normal capacidad de unión a iones calcio para su activación. Más adelante, distintos estudios identificaron 10 ácidos γ -carboxiglutámico en la protrombina normal, que estaban ausentes en la protrombina anormal (127,128). Por esta razón, la protrombina anormal se denominó des-gamma-carboxi protrombina o DCP, siendo ampliamente conocida como PIVKA-II, ya que fue inducida por la ausencia de vitamina K o antagonismo del factor II de la coagulación.

1.2.1 Estructura del PIVKA-II

La protrombina normal es un zimógeno dependiente de vitamina K compuesto por 579 residuos de aminoácidos (129), asignados a tres dominios estructurales diferentes: fragmento 1 (residuos 1-155), fragmento 2 (residuos 156-271) y un dominio de proteasa (residuos 272– 579) (figura 5). El fragmento 1 tiene un dominio de ácido glutámico (Gla) γ -carboxilado y un dominio *kringle* (regiones homólogas); el fragmento 2 contiene otro dominio *kringle* y por último, el dominio de proteasa contiene la cadena A y una cadena B catalítica. El dominio Gla en la protrombina normal contiene 10 ácidos glutámicos γ -carboxilados, que se encuentran en distintas posiciones de la región N-terminal de la proteína. Sin embargo, PIVKA-II contiene menos de 10 residuos Gla. Liebman informó que el PIVKA-II purificado a partir del líquido ascítico de pacientes con CHC era heterogéneo en el contenido de Gla, con un promedio de cinco residuos de Gla (130). Por otra parte, Naraki y cols. descubrieron que PIVKA-II sintetizado en CHC contenía menos de cuatro residuos Gla, sin embargo las enfermedades hepáticas benignas (cirrosis hepática, enfermedad hepática alcohólica o hepatitis crónica) contienen PIVKA-II con más de cinco residuos Gla (131).

La protrombina normal induce la coagulación a través de la unión con iones de calcio (132), la cual depende de su integridad estructural estabilizada por residuos de Gla (133). Algunos de los residuos pueden coordinar directamente los iones calcio para formar un complejo activo, y otros residuos desempeñan un papel en las interacciones puente entre iones calcio y fosfolípidos. En ausencia de residuos N-terminal Gla, PIVKA-II no puede unirse de manera efectiva con la superficie de fosfolípidos para desarrollar la actividad coagulante (134).

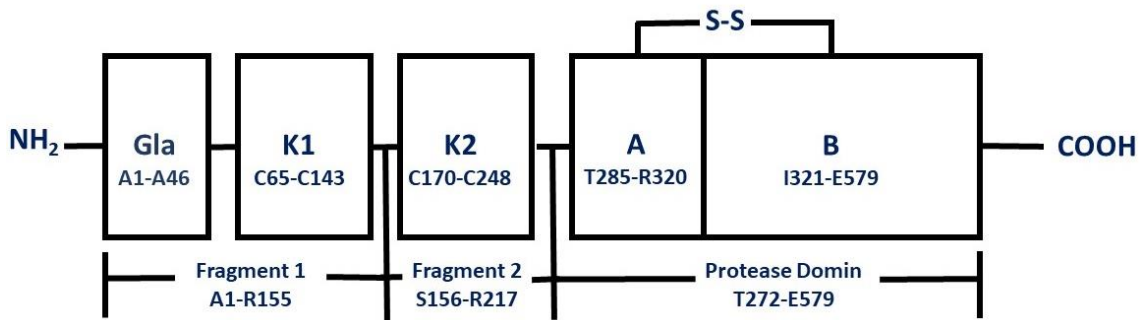


Figura 5. Estructura de la molécula de protrombina. Adaptada de Xing H. y cols., 2016.

1.2.2 PIVKA-II en el cáncer

En 1984, Liebman y cols. informaron por primera vez de que los niveles séricos de PIVKA-II estaban aumentados en pacientes con cáncer de hígado, basándose en un radioinmunoanálisis competitivo (135,136) y proponiendo su utilidad como biomarcador sérico en pacientes con CHC primario. Desde entonces se ha demostrado que más del 90% de los pacientes con CHC tienen una fuerte expresión positiva de este biomarcador (137).

La mayoría de los estudios relacionados con PIVKA-II tras su descubrimiento en el CHC se centraron en su papel como biomarcador en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, mientras que sólo unos pocos mostraron su uso en otros cánceres. En 1992 se describió el primer caso de cáncer gástrico primario que expresaba niveles elevados tanto de AFP como de PIVKA-II (138) y más adelante se notificaron otros casos de este mismo cáncer que producían niveles elevados de ambos marcadores (139,140). Además, también se ha sugerido que PIVKA-II puede tener un papel como un marcador tumoral independiente en el adenocarcinoma de páncreas (141).

1.2.3 Síntesis del PIVKA-II en CHC

La molécula de protrombina normal se sintetiza en las células hepáticas mediante la γ -glutamylcarboxilación, dependiente de vitamina K, como una modificación postraduccional (142) (figura 6). En condiciones normales, la γ -glutamylcarboxilasa cataliza la conversión

completa de 10 residuos de Glu en el dominio Gla del precursor de protrombina en 10 residuos de Gla en presencia de vitamina K como cofactor. En condiciones anormales, menos de 10 residuos de Glu se convierten en residuos de Gla, lo que conduce a la síntesis de la proteína PIVKA-II (130). De esta forma, PIVKA-II es una protrombina incompleta en la que algunos residuos de Glu no sufren la γ -carboxilación. Los factores que influyen en la síntesis o función de la γ -glutamylcarboxilasa y la vitamina K pueden afectar la producción de PIVKA-II, si bien los mecanismos de producción de PIVKA-II no se comprenden completamente.

En los pacientes con CHC, la actividad de la γ -glutamylcarboxilasa por unidad de precursor endógeno de protrombina microsomal se redujo en comparación con el tejido hepático sin CHC, aunque esta reducción no fue estadísticamente significativa. Debido a la ineficaz γ -glutamylcarboxilasa, el precursor de protrombina no se convirtió en protrombina normal, lo que resultó en la síntesis de PIVKA-II (122).

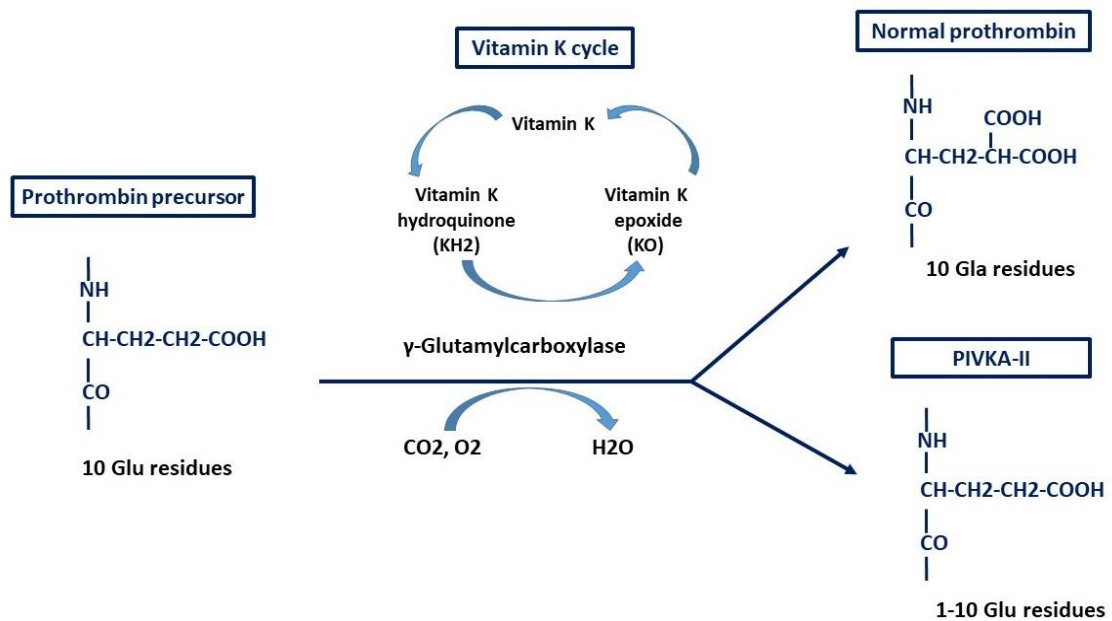


Figura 6. Mecanismo de síntesis de protrombina y PIVKA-II. Adaptada de Xing H. y cols., 2016.

La deficiencia de vitamina K es otro factor que subyace a la formación de PIVKA-II, porque la actividad catalítica de la γ -glutamylcarboxilasa depende de esta vitamina. De esta forma, los niveles séricos de este marcador en pacientes que reciben fármacos antagonistas de la vitamina K, como los anticoagulantes acenocumarol o warfarina, son anormalmente altos (143). Miyakawa y cols. informaron que los niveles de vitamina K en el tejido de CHC eran significativamente más bajos en comparación con los tejidos no cancerosos (144). En estudios clínicos, el análogo de la vitamina K2 menatetrenona inhibió moderadamente la recurrencia del CHC y la síntesis de PIVKA-II mientras que los pacientes con CHC que carecían de vitamina K expresaron niveles plasmáticos más altos de PIVKA-II (145). La administración de vitamina K1 a pacientes con CHC también redujo considerablemente los niveles plasmáticos de PIVKA-II (146).

Además, se ha visto que la hipoxia en los tejidos de CHC puede inducir la expresión de PIVKA-II al afectar la captación de vitamina K (147). Estudios recientes sugieren que la hipoxia altera la captación de vitamina K a través del reordenamiento citoesquelético, durante los cambios fenotípicos asociados con la EMT. Sin embargo, las condiciones adversas pueden inducir cambios fenotípicos adicionales para reducir la síntesis de proteínas específicas del hígado (incluido PIVKA-II). Estos resultados sugieren que PIVKA-II es un biomarcador del estado fenotípico del CHC (148). Por todo ello, la evidencia científica expone que los niveles altos del precursor de protrombina se correlacionan con niveles elevados de PIVKA-II (149).

1.2.4 Función biológica del PIVKA-II en CHC

Aunque la importancia biológica de PIVKA-II en el cáncer a día de hoy no se comprende completamente, diversos estudios han explorado su papel y mecanismo en la supervivencia, proliferación, invasión y metástasis del cáncer.

La activación de la vía de señalización de la tirosina-proteína quinasa Met (c-Met) está implicada en diversas respuestas celulares, como la mitogénesis, la motogénesis o la morfogénesis, dependiendo del tipo de célula y del microambiente. Así, la expresión de c-Met en el CHC está relacionada con un estado clinicopatológico desfavorable, que incluye un alto índice de proliferación, un bajo grado de diferenciación e invasión vascular y metástasis.

Se ha demostrado que la inhibición de la vía de transducción de señales c-Met mediante el uso de anticuerpos, ARN pequeño de interferencia (ARNip) o del inhibidor de c-Met SU11274, suprime significativamente la inducción de PIVKA-II en el crecimiento de células de CHC. En los tejidos clínicos de CHC, PIVKA-II y c-Met suelen coexistir y su ausencia se asocia con un bajo riesgo de recurrencia tumoral (137). Estos resultados demostraron que el papel importante de la vía c-Met en el CHC estaba mediado por PIVKA-II. Zhang y cols. descubrieron que PIVKA-II antagonizaba la inhibición del crecimiento celular de CHC inducida por gefitinib (150). Este marcador también previno la activación de la vía apoptótica dependiente de caspasa inducida por gefitinib, lo que sugirió que las vías c-Met, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) pueden mediar los efectos biológicos de PIVKA-II en células de CHC (122).

Asimismo, PIVKA-II también parece controlar la metástasis del CHC. Morimoto y cols. demostraron que un alto nivel de este marcador era uno de los factores de riesgo de metástasis extrahepática en el CHC (151). Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en un estudio *in vitro*, en el que Yue y cols. demostraron que PIVKA-II promueve la metástasis de CHC al aumentar la actividad de la metaloproteinasa-2 de matriz (MMP-2) y MMP-9 mediante la activación de la vía ERK1/2 MAPK (152).

Además, se ha demostrado que PIVKA-II induce la angiogénesis en CHC. Wang y cols. observaron que este biomarcador purificado promovió la proliferación dependiente de dosis de células endoteliales de cordón umbilical (HUVECs) ECV304 e indujo la angiogénesis mediante la estimulación de la expresión de EGFR, VEGF y MMP-2 (153). En un estudio clínico, Matsubara y cols. establecieron la relación entre la producción de PIVKA-II y la angiogénesis tumoral comparando pacientes con CHC hipovasculares e hipervasculares comunes (154).

1.2.5 PIVKA-II en el diagnóstico de CHC

La AFP se ha utilizado ampliamente en la clínica como marcador sérico del CHC, pero su sensibilidad y especificidad son insatisfactorias (155) y todavía no se ha convertido en un biomarcador óptimo para fines de diagnóstico. Por ello, existe un gran interés en identificar y proponer nuevos biomarcadores con este fin. Entre los numerosos biomarcadores de diagnóstico disponibles, PIVKA-II mostró una mejor especificidad para esta enfermedad y

fue menos propenso a elevarse en otras enfermedades hepáticas, como cirrosis, enfermedad hepática alcohólica o hepatitis crónica (156,157).

Xing y cols. llevaron a cabo un metaanálisis con el objetivo de aclarar la capacidad de diagnóstico de PIVKA-II y AFP en diferentes estadios del CHC (155). Concretamente, su estudio demostró que PIVKA-II era más preciso que la AFP en la detección tanto de CHC pequeño (<3 cm) como de CHC grande (≥ 3 cm), del CHC de etiología mixta y relacionado con el VHB y del CHC en pacientes de diferentes razas, concluyendo que PIVKA-II es más preciso que AFP en el diagnóstico de CHC y que es un biomarcador prometedor para la vigilancia y el diagnóstico de esta enfermedad. Sin embargo, se requieren estudios prospectivos para validar aún más el rendimiento de PIVKA-II en el diagnóstico de CHC.

Recientemente, Zhu y cols. han publicado otro metaanálisis para revisar los ensayos clínicos de PIVKA-II en el diagnóstico de CHC (158). El metanálisis de 12 estudios clínicos reveló una sensibilidad del 71% y una especificidad del 84% para este biomarcador. La razón de probabilidad positiva (PLR), la razón de verosimilitud negativa (NLR) y las razones de probabilidad de diagnóstico (DOR) fueron 6,48; 0,33 y 21,86, respectivamente. El valor de PLR mostró que los pacientes con CHC exhibían niveles seis veces más altos de PIVKA-II positivo, lo que sugiere una precisión diagnóstica moderada. El valor NLR reveló que aproximadamente el 33% de los pacientes con PIVKA-II negativos desarrollan CHC, lo que sugiere que PIVKA-II negativo no excluye el CHC. Se ha informado que varios factores de confusión como la deficiencia de vitamina K en otras situaciones de enfermedad, desnutrición, fármacos (por ejemplo, warfarina), insuficiencia hepática aguda y enfermedad hepática alcohólica, aumentan el nivel de PIVKA-II sérico en pacientes sin CHC (159). Todos estos resultados sugieren que PIVKA-II en solitario puede no ser adecuado para el diagnóstico de CHC (122).

Diversos estudios han comparado PIVKA-II con otros biomarcadores en el diagnóstico de CHC. Un metaanálisis publicado en 2013 comparó estudios de biomarcadores individuales y sus combinaciones (160). Los valores del área bajo la curva (AUC) de AFP, PIVKA-II, proteína de Golgi 73 (GP73), fracción de AFP reactiva a la aglutinina de *Lens culinaris* (AFP-L3), AFP + PIVKA-II, AFP + AFP-L3 y AFP + GP73 fueron 0,835; 0,797; 0,914; 0,710; 0,874; 0,748 y 0,932, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que PIVKA-II no es el mejor biomarcador individual en el diagnóstico y que la combinación de diferentes biomarcadores mejora la sensibilidad y la especificidad.

El beneficio del uso combinado de diferentes biomarcadores también fue revisado y confirmado por estudios recientes (161–163). Los hallazgos de estos estudios sugieren que las pruebas combinadas de PIVKA-II y AFP mostraron una sensibilidad del 47,5 al 94,0% y una especificidad del 53,3 al 98,5% en la detección precoz del CHC (161). Song y cols. descubrieron que la combinación de PIVKA-II y AFP daba como resultado un índice de Youden más alto y una sensibilidad del 90% en pacientes chinos, incluso para tumores pequeños, siendo más sensible que PIVKA-II y AFP en solitario (71,5% y 68%, respectivamente) (163). Ertle y cols. también encontraron que la AFP por sí sola no era suficiente para el diagnóstico serológico de CHC en pacientes europeos (sensibilidad 54,9% en un punto de corte de 10 ng/mL). La sensibilidad se mejoró al 78% cuando se combinó con PIVKA-II. Incluso en pacientes en estadio temprano, la combinación de AFP y PIVKA-II aumentó la sensibilidad del 38% (con AFP sola en un punto de corte de 10 ng /mL) al 55% (164). Por lo tanto, la adición de nuevos biomarcadores séricos para el diagnóstico del CHC puede beneficiar la sensibilidad de detección de esta enfermedad (122). Además, varios estudios han sugerido que una combinación de biomarcadores es probablemente la mejor herramienta para la detección del CHC. De hecho, en marzo de 2020, la FDA otorgó la designación de dispositivo innovador para la puntuación Elecsys GALAD de Roche, que utiliza de forma no invasiva una puntuación algorítmica que combina los niveles de los biomarcadores AFP, AFP-L3 y PIVKA-II con el sexo y la edad para detectar el CHC de forma precoz. En múltiples estudios internacionales, se ha demostrado que la puntuación GALAD funciona mejor que sus componentes individuales para la detección precoz del CHC, con un AUC que supera el 0,9 (165).

La carcinogénesis del CHC es diferente y existen diferencias prominentes en la distribución geográfica de las causas del CHC en todo el mundo, como infecciones virales y/o niveles elevados de consumo de alcohol. La mayoría de los casos de CHC se asocian con infecciones por el VHC o por el VHB (159). El CHC relacionado con el VHC es dominante en Japón y más común en los países occidentales, mientras que el CHC relacionado con el VHB es más frecuente en China. Según la población de estudio, la mayoría de los estudios a gran escala han sido realizados en pacientes con etiología principalmente relacionada con el VHC, y solo unos pocos estudios exploraron la importancia de PIVKA-II para identificar el CHC relacionado con el VHB. No obstante, varios estudios llevados a cabo en China, han obtenido resultados que sugieren que PIVKA-II es adecuado para la vigilancia del CHC relacionado con el VHB. Además, entre el 48,9 y el 76,3% de los CHC con AFP negativos tenían un valor de

PIVKA-II positivo (166). Según el CHC relacionado con el alcohol, no se ha publicado suficiente información en estudios de casos y controles. Dado que los niveles séricos de PIVKA-II pueden aumentar en pacientes con enfermedad hepática alcohólica, el diagnóstico diferencial entre esta y CHC relacionado con el alcohol debe interpretarse con precaución (122).

1.2.6 PIVKA-II como factor pronóstico y como predictor de recurrencia del CHC

Aunque los tratamientos y la vigilancia han mejorado, el CHC sigue siendo difícil de curar, sobre todo cuando la enfermedad es progresiva. Una posible forma de mejorar el pronóstico de esta patología es con la medición de marcadores tumorales, como la AFP y el PIVKA-II, que proporcionan información complementaria a los datos obtenidos en imágenes (167).

El nivel sérico de PIVKA-II se correlaciona con el número de tumores, el grado histológico de diferenciación del CHC, el desarrollo de la invasión de la vena porta y el tamaño del tumor, siendo el factor predictivo más significativo para el desarrollo de la invasión de la vena porta (136). En un estudio llevado a cabo por Shimada y cols. se observó que existe una correlación positiva entre el nivel sérico de PIVKA-II y la invasión vascular en pacientes adultos con CHC que se someten a un trasplante hepático de donante vivo (168). En este estudio, se demostró que la incidencia de invasión vascular histológica positiva en pacientes con un nivel de PIVKA-II superior a 300 mAU/mL era significativamente mayor que en aquellos con un nivel inferior a 300 mAU/mL, lo que demuestra que unos niveles séricos elevados de PIVKA-II se correlacionan con la invasión vascular histológica y podría ser un fuerte indicador pronóstico (168).

El mecanismo exacto por el cual PIVKA-II es producido por el tumor aún no se entiende completamente, pero la normalización de sus niveles después de la resección del CHC indica claramente que el tumor es la fuente de su producción (169). La medición sérica de este biomarcador diferencia más específicamente el CHC de otras enfermedades hepáticas que la determinación de AFP y, además, los niveles de PIVKA-II no suelen estar correlacionados con los de la AFP (170,171), por lo que ambas determinaciones son independientes. De esta forma, la determinación de PIVKA-II en los pacientes con CHC se puede considerar complementaria a la de AFP, ya que por una parte el nivel sérico de AFP refleja la carga tumoral intrahepática y el PIVKA-II refleja la extensión de la invasión vascular, incluyendo la

trombosis de la vena porta y la extensión de la enfermedad extrahepática (172). Así, se ha visto que PIVKA-II es un factor de pronóstico clínico para la recurrencia y la supervivencia después de la hepatectomía, el trasplante de hígado, el tratamiento de ablación por radiofrecuencia y la TACE. Estos hallazgos se basan en el hecho de que el nivel de este biomarcador en suero se correlaciona con el diámetro del tumor, que refleja el crecimiento celular del CHC (136).

Varios estudios han sugerido que PIVKA-II es mejor predictor de recurrencia de CHC tras el TOH que AFP (173,174), de tal forma que algunos centros de Asia han propuesto el uso combinado de la concentración de PIVKA-II con el número y/o el tamaño del tumor en la selección de candidatos para TOH, con o sin consideración del valor AFP (175). Otros centros han propuesto diferentes puntuaciones que combinan los niveles de AFP y PIVKA-II con diferentes puntos de corte para ambos biomarcadores séricos que han mejorado los criterios de Milán para la selección de pacientes con mayor riesgo de recurrencia del CHC después del trasplante. El único estudio realizado en un centro no asiático encontró que $AFP \geq 250$ ng/mL y $PIVKA-II \geq 7,5$ ng/mL se asocian con un mayor riesgo de recurrencia del CHC (176).

La invasión microvascular también se asocia con un peor resultado del TOH, según un estudio realizado por Iguchi y cols. (177). Los pacientes con CHC en el grupo de invasión microvascular alto mostraron un nivel de PIVKA-II significativamente más elevado, lo que sugirió que este marcador tumoral puede ser un buen indicador pronóstico del TOH. Park y cols. también desarrollaron un método de combinación de AFP y PIVKA-II para predecir el resultado del tratamiento del CHC y concluyeron que la combinación de estos dos biomarcadores fue fuertemente predictiva de SG y SLE, comparable a los criterios radiológicos y mejor que la respuesta de AFP sola en el CHC avanzado. Este método proporciona una herramienta útil para predecir el resultado del CHC tratado localmente, mediante quimiorradioterapia concurrente, combinación de TACE y radioterapia, y radioterapia de rescate seguida de otro tratamiento adicional (172). Además de su función pronóstica eficaz en el tratamiento del CHC, PIVKA-II también predijo la carcinogénesis hepática en pacientes con VHC. Después de más de 3 años de seguimiento en 623 portadores consecutivos del VHC, se encontró que un nivel alto de PIVKA-II (≥ 40 mAU/mL) se asoció significativamente con la incidencia de CHC (178).

Asimismo, un metaanálisis de seis estudios retrospectivos con 943 pacientes llevado a cabo para determinar la relación entre los valores de PIVKA-II y el pronóstico de los

pacientes con CHC sometidos a quimioterapia transarterial demostró que los pacientes con CHC que presentaban valores de PIVKA-II bajos sobrevivieron más tiempo que aquellos con valores de PIVKA-II elevados, concluyendo que PIVKA-II elevado es un factor de riesgo de mal pronóstico en pacientes con CHC tras recibir quimioterapia transarterial (179).

1.2.7 PIVKA-II y el trasplante hepático

La invasividad del tumor, la metástasis y la recidiva suelen dar lugar a malos resultados clínicos tras el trasplante en los pacientes con CHC. Los métodos de imagen como TC o RMN para la evaluación de la respuesta tumoral tienen un coste elevado y un riesgo de cáncer debido a la exposición repetida del paciente a la radiación, mientras que la evaluación de los marcadores tumorales tras el tratamiento del tumor es rápida, más fácil de estimar y menos costosa (180).

La determinación de biomarcadores medidos cronológicamente es importante para entender el curso clínico del paciente (181). Asimismo, la medición de los niveles de biomarcadores antes y después del tratamiento del CHC tiene valor clínico como forma sencilla de monitorizar al paciente tras el mismo (normalmente en combinación con el análisis radiológico) y de predecir el pronóstico, la recurrencia y la supervivencia (182).

Los niveles elevados de AFP y PIVKA-II se asocian a la recurrencia del tumor o a una mala supervivencia después de distintos tratamientos para el CHC, como resección hepática, inyección de alcohol, ablación por radiofrecuencia y terapia de coagulación por microondas (183); por tanto, estos marcadores podrían ser útiles para predecir la recurrencia del tumor durante el seguimiento posterior al TOH.

La mayoría de estudios existentes en la literatura sobre PIVKA-II en pacientes con CHC han explorado este biomarcador en tratamientos como la TACE o la resección hepática (183–187), y sólo algunos lo han hecho en el trasplante hepático. De éstos, la gran mayoría han explorado la utilidad de PIVKA-II en el trasplante hepático de donante vivo, como tratamiento en los pacientes CHC (168,174,188–190), existiendo muy pocos trabajos que hayan examinado el papel de este marcador en el trasplante hepático por CHC, de donante fallecido (176,191).

1.2.8 PIVKA-II en Guías clínicas

Algunas guías recomiendan la detección de PIVKA-II en el diagnóstico de CHC y para predecir el pronóstico del tratamiento (122). La Asociación Asiática del Pacífico para el Estudio del Hígado (APASL, versión 2010) recomendó la medición simultánea de AFP y PIVKA-II para el diagnóstico de CHC. En las directrices de la Sociedad Japonesa de Hepatología (JSH, versión 2015) se recomendó PIVKA-II tanto en el diagnóstico de la enfermedad como en el pronóstico. También la Asociación Nacional India para el Estudio del Hígado (INASL, versión 2014) recomendó el uso de PIVKA-II para la evaluación de la respuesta al tratamiento, pero no para la vigilancia y el diagnóstico.

Sin embargo, otras guías rechazan el uso de PIVKA-II tanto para el diagnóstico de CHC como para el pronóstico. La Asociación Europea para el Estudio del Hígado y la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EASL-EORTC) (versión 2018) argumenta que los datos disponibles muestran que el PIVKA-II no es óptimo en términos de coste-efectividad para el manejo de la enfermedad. La asociación con la invasión de la vena porta y la etapa avanzada del tumor impide el uso de este biomarcador en la detección temprana del CHC (6). Por razones similares, la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD versión 2011) recomienda no utilizarlo en la detección temprana de la enfermedad (49).

1.3 OTROS BIOMARCADORES EN EL ESTUDIO DEL CHC

1.3.1 Interleucinas 6 y 8 (IL-6 e IL-8)

Debido a que la mayoría de los casos de CHC tienen como base enfermedades hepáticas inflamatorias crónicas (192), algunas citoquinas podrían reflejar potencialmente distintos mecanismos inflamatorios durante la progresión del tumor y por lo tanto podrían servir como biomarcadores de CHC. De hecho, existe evidencia que indica la implicación de las citoquinas en la hepatocarcinogénesis (193). El microambiente tumoral inflamatorio es crucial en el desarrollo y la metástasis de esta enfermedad. De esta forma, las citoquinas proinflamatorias secretadas en este microambiente tumoral desempeñan un papel clave en

el inicio, crecimiento, progresión y metástasis tanto del CHC como de otros tipos de cáncer, como cáncer de pulmón y adenocarcinoma pancreático (194,195).

- IL-6

La interleucina-6 (IL-6) es una glicoproteína de 21-28 kDa de peso molecular y consta de 184 aminoácidos (193). Esta citoquina pleiotrópica desempeña un papel fundamental en muchos procesos biológicos complejos, incluyendo la inmunidad, la inflamación, el metabolismo, la reproducción, la hematopoyesis, la angiogénesis, el desarrollo neuronal y la remodelación ósea. La IL-6 también desempeña un papel primordial en la diferenciación y el crecimiento de una serie de células de diferente origen histológico, como por ejemplo células endoteliales, queratinocitos, células neuronales, osteoclastos y osteoblastos. Además, induce la respuesta de fase aguda hepática al modular la transcripción de varios genes específicos del hígado durante la inflamación (193).

La respuesta inflamatoria está reconocida como un factor importante en el desarrollo y la progresión de la malignidad. Como citoquina inflamatoria, la IL-6 es una de las citoquinas protumorigénicas mejor caracterizadas, de forma que podría activar el factor κ B nuclear y el transductor de señales y activador de la transcripción 3, contribuyendo así al desarrollo del CHC (196). De esta forma, varios autores han sugerido posibles mecanismos biológicos de la IL-6 en la hepatocarcinogénesis, como por ejemplo la asociación de la cirrosis hepática con un aumento de la expresión del ARNm de la IL-6 intrahepática. Esta citoquina también induce un alto potencial metastásico y disminuye apoptosis de las células de CHC. Además, se ha demostrado que las propias células de CHC, especialmente en estadios avanzados de la enfermedad, podrían ser una fuente de IL-6 así como de su receptor, para estimular el crecimiento tumoral mediante un mecanismo autocrino/paracrino (197,198). Así, en el microambiente tumoral, múltiples tipos de células pueden producir IL-6, incluyendo células inmunes que se infiltran en el tumor, células estromales de fibroblastos y las propias células tumorales (199). En definitiva, la IL-6, sola o en combinación con otras citoquinas, es un artífice de la formación y la generación de respuestas inmunitarias que pueden ejercer una profunda influencia en el desarrollo del CHC (196).

Los niveles de IL-6 en la sangre de individuos sanos se suelen encontrar en el rango de 1 a 5 pg/mL, aumentando varios miles de veces durante estados inflamatorios e incluso

pueden alcanzar niveles de varios mg/mL en condiciones sépticas letales (200). Así, los niveles séricos de IL-6 están elevados en pacientes con inflamación hepática crónica, incluyendo la hepatitis alcohólica, las infecciones por el VHB y el VHC y la esteatohepatitis. Muchos estudios indican un importante papel de esta citoquina en el proceso de daño hepático y carcinogénesis. Hsia y cols. demostraron que los niveles de IL-6 estaban frecuentemente elevados en pacientes con CHC y que estos niveles se han relacionado con el pronóstico de la enfermedad (201). Asimismo, otros estudios han demostrado que la IL-6 puede ser un marcador tumoral prometedor para el manejo del CHC, ya que los altos niveles de esta citoquina en plasma antes del tratamiento se asociaron con un mal pronóstico de los pacientes con CHC avanzado. También los niveles séricos elevados de IL-6 se asociaron significativamente con un mayor riesgo de recurrencia de CHC asociado al VHB, lo que sugiere que es un biomarcador potencial para la predicción temprana de la recurrencia de CHC asociado al VHB. Además, los niveles séricos de esta citoquina podrían predecir la respuesta del tumor y la SG después de la TACE para los tumores hepáticos primarios y secundarios (199).

La aparición y el desarrollo del CHC están estrechamente asociados con el microambiente del tumor. Numerosos estudios han demostrado el papel de los macrófagos asociados a los tumores (TAM) en la promoción del crecimiento de los vasos sanguíneos del tumor, la linfangiogénesis, la supresión inmunológica y otros mecanismos en la progresión del tumor. Los TAM-M1 secretan IL-6, así como IL-1 β , y TNF- α , y ejercen sus efectos antitumorales presentando antígenos tumorales a los linfocitos T citotóxicos. Además, la liberación de IL-6 y de IL-10 y el factor de crecimiento transformante pueden promover directa o indirectamente la angiogénesis, el crecimiento y la metástasis del tumor (202). Yang y cols observaron que los pacientes con un bajo nivel de IL-6 en los tejidos del CHC tenían un mejor pronóstico, con una mayor SG y un mayor tiempo hasta la recidiva (203). Todos estos estudios evidencian que la IL-6 está estrechamente relacionada con la aparición, desarrollo y recidiva del CHC.

- IL-8

La IL-8 es una quimiocina multifuncional producida por una amplia variedad de tipos de células, incluyendo monocitos, neutrófilos, fibroblastos y células endoteliales (204). Sus efectos biológicos están mediados a través de la unión a dos receptores de superficie celular acoplados a la proteína G, el receptor 1 del motivo CXC (CXCR1) y el CXCR2 (205), por ello también es conocida como ligando del motivo CXC 8 o CXCL8. La transcripción del gen de la IL-8 codifica para una proteína de 99 aminoácidos que, posteriormente, se procesa para dar lugar a una proteína de 77 aminoácidos con capacidad de señalización en las células no inmunes o de 72 aminoácidos en los monocitos y macrófagos. Se ha demostrado que la expresión de la IL-8 está regulada por una serie de estímulos diferentes que incluyen señales inflamatorias (por ejemplo, TNF- α , IL-1 β), estrés químico y ambiental (por ejemplo, la exposición a agentes quimioterapéuticos y la hipoxia), y hormonas esteroides (por ejemplo, andrógenos, estrógenos y dexametasona) (206).

En particular, la IL-8 es una quimiocina que afecta a las funciones de los neutrófilos humanos, incluyendo la quimiotaxis, la liberación de enzimas y la expresión de la adhesión de la superficie y promueve la angiogénesis y la metástasis de los tumores a través de la unión a sus receptores CXCR1 y CXCR2 (207). Esta quimiocina proinflamatoria es secretada por células inflamatorias y tumorales, influyendo en la progresión del tumor y regulando la neovascularización, el crecimiento de las células tumorales, la apoptosis y la migración celular (208). La IL-8 se expresa en una variedad de tumores como el cáncer de pulmón, de mama y de colon. Un estudio llevado a cabo por Wang y cols. demostró que su expresión también es elevada en el CHC (209).

La sobreexpresión de IL-8 también está estrechamente relacionada con la invasión vascular, la metástasis linfática e intrahepática, el estadio avanzado del tumor y la recurrencia temprana del mismo, y puede predecir el pronóstico clínico adverso de varios tumores, incluido el CHC (194). La IL-8, raramente detectable en estados fisiológicos, se induce rápidamente tras la estimulación de factores proinflamatorios en condiciones patológicas en las que también interviene la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. Se ha observado que tanto la IL-8 como la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ desempeñan papeles vitales en la invasión de las células de CHC (194).

Aunque el mecanismo preciso de regulación de la IL-8 en las células tumorales sigue siendo desconocido, varios estudios experimentales han demostrado que la IL-8 derivada

de estas células está asociada a la angiogénesis tumoral y al potencial metastásico. Asimismo, otros autores han demostrado que el ARNm de la IL-8 aumenta la actividad de algunas MMP y colagenasas, incrementando así la capacidad de invasión de estas células tumorales (210). La IL-8, descubierta originalmente como factor quimiotáctico para los leucocitos, ha demostrado recientemente que contribuye a la progresión del cáncer humano a través de sus posibles funciones como factor mitogénico, angiogénico y motogénico. En este contexto, Akiba y cols. demostraron que la IL-8 producida por el CHC es un factor de angiogénesis del mismo, pero podría tener un papel mucho más importante en la invasión y la metástasis de esta enfermedad (211). Por lo tanto, es interesante dilucidar el papel de la IL-8 sérica como marcador biológico tumoral en los pacientes con CHC.

1.3.2 Osteopontina

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína fosforilada multifuncional de la matriz extracelular que se expresa en diversos tipos de células, como los linfocitos T, los macrófagos, las células dendríticas y los osteoclastos (212). La sobreexpresión de OPN se ha detectado en diferentes tumores sólidos, incluyendo el cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal y CHC.

Esta proteína está implicada en varios procesos cancerígenos y angiogénicos, como la invasión celular, inflamación, progresión del tumor y metástasis (213). En este contexto, se han observado niveles séricos elevados de OPN en pacientes con CHC en comparación con los pacientes con hígado normal o aquellos con cirrosis hepática o hepatitis crónica (159). Asimismo, varios estudios han demostrado que el aumento de los niveles de esta glicoproteína está vinculado a un mal pronóstico de CHC (214).

Shang y cols. descubrieron que el nivel de OPN sérica aumentaba un año antes del diagnóstico de CHC (215), lo que indica que la OPN podría ser un marcador de diagnóstico prometedor para esta enfermedad (214). Además, se ha identificado que la OPN, como biomarcador prometedor para el diagnóstico de CHC, tenía un mayor rendimiento que la AFP para distinguir los casos de CHC de los pacientes con cirrosis hepática. No obstante, el valor diagnóstico de la OPN sigue siendo discutible (212).

En el CHC, un nivel plasmático elevado de OPN está estrechamente correlacionada con la metástasis intrahepática, la recidiva precoz y un peor pronóstico (215,216), por lo que se sugiere que la sobreexpresión de esta proteína puede predecir el pronóstico de los

carcinomas (214), siendo la OPN un posible biomarcador pronóstico del CHC. Sin embargo, la relación entre la expresión de la OPN y los resultados de pronóstico en los pacientes con esta enfermedad son aún controvertidos.

Por otra parte, diversos estudios sugieren que la OPN puede inducir la EMT de las células del CHC, mediante un aumento de la estabilidad de la proteína vimentina, que promueve el mantenimiento de la estructura celular, la integridad del citoplasma y la estabilización de la interacción del citoesqueleto. De esta forma, la comprensión de los mecanismos en los que participa la OPN, podría dar lugar a nuevas posibilidades terapéuticas en el CHC metastásico (217). Con el fin de evaluar el valor diagnóstico y pronóstico de los niveles de OPN en sangre, un metaanálisis que incluía ocho ensayos clínicos observó que el aumento del nivel de OPN se asociaba significativamente con una menor SG y SLE. Por lo tanto, esta proteína podría tener una importancia predictiva potencial para determinar la tasa de supervivencia del CHC, siendo un biomarcador complementario a la AFP (218).

1.3.3 Glipicano-3

El glipicano-3 (GPC3) es un miembro de la familia de los proteoglicanos de heparán sulfato, que comprende seis subtipos (GPC1-6). Todos los glipicanos comparten ciertas similitudes, como por ejemplo la unión a la membrana celular a través de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) y todos se expresan en gran medida durante el desarrollo embrionario (219). El GPC3 desempeña un papel importante en la proliferación y diferenciación celular y su expresión se detecta normalmente en la placenta, numerosos tejidos embrionarios, el ovario adulto, la glándula mamaria, el mesotelio, el pulmón y el riñón. En cambio, se ha detectado una sobreexpresión de GPC3 en el CHC, de forma que los niveles de expresión de la proteína y del gen del GPC3 en el tejido tumoral son más altos en los hígados con CHC que en los hígados sanos o no malignos (220).

Por otra parte, se ha observado que aproximadamente el 40% de los pacientes con CHC son positivos para el GPC3 y negativos para la AFP. En particular, no hay correlación entre el nivel de GPC3 y la AFP, lo que indica que ambos parámetros son funcionalmente independientes (221). Dado que cada vez hay más pruebas que indican la aplicación del GPC3 sérico como marcador no invasivo para el diagnóstico del CHC, muchos investigadores

han explorado esta cuestión con respecto a la eficacia diagnóstica de este biomarcador, en comparación con la AFP (219).

Recientemente, varios estudios mostraron que el GPC3 funciona como una proteína oncofetal, pudiendo estimular el crecimiento, la migración y la adhesión de las células de CHC mediante la regulación de la señalización Wnt canónica autocrina/paracrina. Además, otros estudios identificaron que el GPC3 se expresaba claramente en las células madre del cáncer de hígado CD90+, que desempeñan un papel importante en la progresión del tumor y la metástasis. El GPC3 se expresa de forma diferencial durante el crecimiento invasivo del cáncer de hígado, lo que sugiere que este biomarcador está potencialmente implicado en el desarrollo del CHC. Asimismo, la neutralización del GPC3 da lugar a la inhibición de la migración y la invasión de las células del CHC, por lo que el GPC3 estaría implicado, además, en la metástasis y la invasión de esta patología (219).

Otras enfermedades asociadas al GPC3 son el melanoma, el cáncer de ovario, el carcinoma de células escamosas de pulmón, los tumores testiculares de células germinales no seminomatosos, el liposarcoma y los tumores embrionarios como el neuroblastoma y el tumor de Wilms (219). Curiosamente, el GPC3 parece funcionar de forma diferente en diversos tipos de cáncer; mientras que GPC3 está regulado a la baja en el cáncer de mama, el cáncer de ovario y el adenocarcinoma de pulmón, está regulado al alza en el CHC (159).

El GPC3 está implicado en la proliferación celular, la supervivencia y la supresión de tumores, pero normalmente está ausente en los hepatocitos sanos y no malignos. Según un estudio llevado a cabo por Liu H. y cols., este marcador se asocia significativamente con un mal pronóstico del CHC, pudiendo jugar un importante papel en la invasión y progresión del cáncer (222). Por lo tanto, el GPC3 podría funcionar como un marcador tumoral nuevo e independiente para los pacientes con CHC (223).

En la figura 7 se resumen los mecanismos de participación del GPC3 en la progresión del CHC, incluida la estimulación de la señalización Wnt, la interacción con los factores de crecimiento, la estimulación del reclutamiento de macrófagos y la promoción de la EMT.

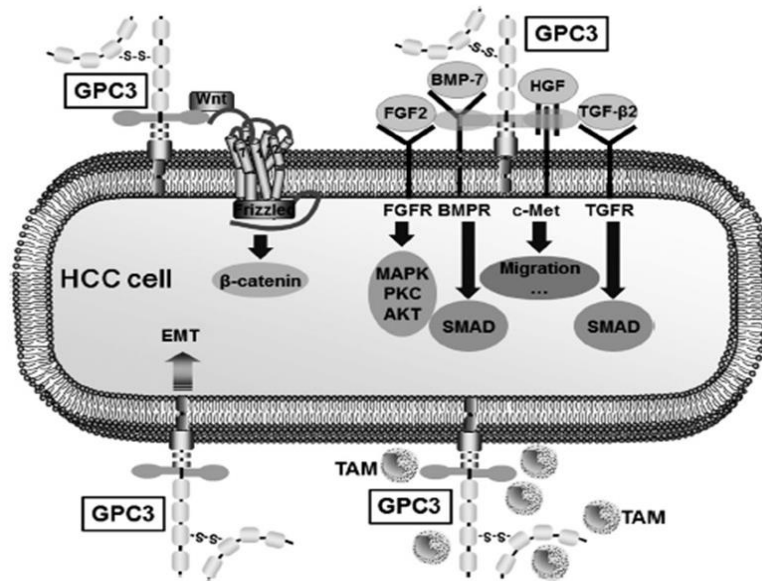


Figura 7. Diagrama esquemático de la participación de GPC3 en el desarrollo del CHC. El GPC3 funciona en la progresión del CHC mediante la estimulación de la señalización Wnt, la interacción con factores de crecimiento (FGF2, BMP-7, HGF y TGF-β2), la estimulación del reclutamiento de macrófagos y la promoción de la EMT. (BMP-7: proteína morfogenética ósea 7; BMPR: receptor de la proteína morfogenética ósea; EMT: transición epitelial-mesenquimal FGF2: factor de crecimiento de fibroblastos-2; FGFR: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos; GPC3: glipicano-3; HCC: carcinoma hepatocelular; HGF: factor de crecimiento de los hepatocitos; HGFR: receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos; TAMs: macrófagos asociados a tumores; TGF-β2, factor de crecimiento transformante-β2; TGFR: receptor del factor de crecimiento transformador. Adaptada de Zhou F. y cols., 2017).

1.3.4 Metaloproteasas de matriz (MMPs)

Los componentes de la matriz extracelular (MEC), que están compuestos de glicosaminoglicanos y proteínas fibrosas, pueden contribuir a la regulación y la progresión de la morfogénesis, la angiogénesis, la inflamación y la tumorigénesis. Las metaloproteinasas de matriz (MMPs), también conocidas como matrixinas, son una familia de endopeptidasas dependientes del calcio y zinc que desempeñan un papel fundamental en el reclutamiento, la migración, la diferenciación, la angiogénesis, la muerte celular y el control de la degradación de los componentes de las matrices de tejido conectivo (224).

En los tumores malignos, como el CHC, las MMPs funcionan dentro del microambiente del tumor para inducir cambios durante la EMT y ayudan a facilitar este proceso a través de comportamientos de invasión y metástasis. Las MMPs parecen jugar un papel importante,

ya que los miembros de esta familia tienen varias implicaciones en la compleja patogénesis de la EMT en el CHC (225).

La mayoría de las moléculas de MMP son sintetizadas como proenzimas latentes. Esto significa que muchas de estas moléculas poseen un dominio central catalítico (en el que se halla un átomo de cinc), un dominio propéptido situado en la porción aminoterminal (en el que un residuo de cisteína actúa como quelante del átomo de cinc), encargado de que la actividad enzimática sea latente, y un dominio hemopexina que reconoce los sustratos en los que puede ser activa y a los inhibidores naturales que se identifican como TIMP (*tissue inhibitor of matrix proteinase*) (figura 8). Se conocen cuatro TIMPs diferentes: TIMPs-1, -2, -3 y -4. Además, este sistema enzimático tiene dos aspectos adicionales de relevancia en la biología del cáncer: las TIMPs son capaces de impactar en el comportamiento de las células tumorales *in vivo* como consecuencia de su capacidad de descomponer factores de crecimiento, receptores de superficie celular, moléculas de adhesión celular y quimiocinas/citoquinas.

Existen 24 MMPs en los mamíferos (23 en humanos), las cuales se denominan de forma incremental, empezando por la MMP-1 y terminando con la MMP-28, pero sin incluir las MMP-4, MMP-5, MMP 6 y MMP-22, ya que estas enzimas fueron descubiertas simultáneamente por diferentes equipos de investigación. Basándose en el sustrato objetivo y la estructura química, las MMPs se dividen en varios grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMPs de tipo membrana y otras MMPs no clasificadas (225). Las MMPs promueven la degradación de varias proteínas de la MEC, lo que conduce a cambios arquitectónicos en los entornos de las células y los tejidos. Las citoquinas, quimiocinas y varios receptores también pueden ser objetivo de varias MMPs. Estas enzimas no sólo descomponen los componentes de la MEC sino que también están involucradas en la regulación de las vías de señalización intra e intercelular mediante la proteólisis. Las MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-11 y MMP-13 están entre las MMPs expresadas constitucionalmente en hígados normales, mientras que los demás pueden aparecer en diversos procesos patológicos, como lesiones hepáticas agudas o crónicas.

Existen varios niveles de regulación de las MMPs: transcripción de genes, compartimentación de secreciones, activación de progenitores, endocitosis e inhibición de la actividad enzimática. Una vez activadas, las MMPs activan posteriormente otras MMPs que están en una forma de zimógeno inactivo (pro-MMP). Esto puede conducir a una

cascada de activación, y esta red de interacción entre las MMPs puede potenciar sus efectos en la EMT.

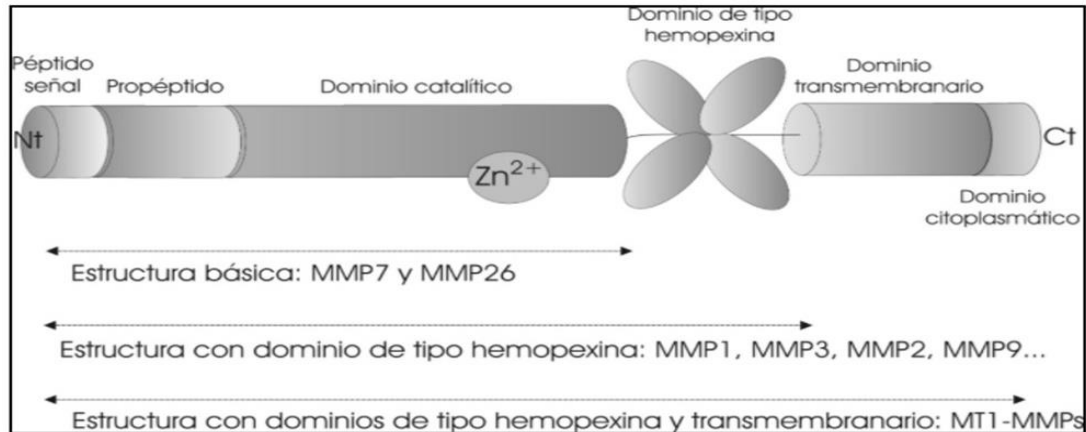


Figura 8. Estructura general de las MMPs.

1.3.4.1 Metaloproteasa-1 (MMP-1)

El estado de homeostasis de las MMPs está bajo el control de una red compleja, y el desequilibrio de estas MMPs, entre ellas la MMP-1, es una característica común de la etiología del CHC (226). En particular, se ha considerado que las MMP-1 están involucradas en el proceso de invasión vascular de las células malignas (227).

La MMP-1 es una proteína secretada que pertenece al grupo de las colagenasas, por ello es también conocida como colagenasa-1. Es la MMP más abundante en la MEC y está bajo el control de la proteína activadora-1 (AP1) (224). Una característica clave de las colagenasas es su capacidad de descomponer colágenos intersticiales y otras moléculas de la MEC. La MMP1 degrada específicamente la proteína de unión del factor de crecimiento de los fibroblastos, las proteínas de unión del factor de crecimiento similar a la insulina y la proteína de unión del factor de crecimiento transformante- β y libera esas proteínas. Durante la carcinogénesis, las MMPs pueden mediar la metástasis y promover la iniciación y el crecimiento de tumores a través de la pérdida de adhesión celular, la desregulación de la división celular y la evasión de la apoptosis (228).

La MMP-1, se une a la región promotora de la cinasa activada por mitógenos a través de la actividad potenciadora del poliomavirus-3. Esta metaloproteasa posee un sitio

polimórfico en la región promotora que, según la literatura, controla la actividad transcripcional del gen MMP-1 y también se correlaciona con la incidencia y la progresión de varios tipos de cáncer (224). En particular, se ha demostrado que MMP-1 está relacionada con la invasión y el mal pronóstico del carcinoma de mama, el cáncer de ovario, el melanoma maligno, el cáncer gástrico, el cáncer colorrectal y el carcinoma de células escamosas del esófago. En los últimos años se han realizado varias investigaciones sobre la correlación de la expresión de la MMP-1 con la progresión del CHC; sin embargo, sus resultados son controvertidos (229).

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El CHC es una de las neoplasias más frecuentes y una de las principales causas de muerte relacionadas con el cáncer en todo el mundo (6). En las últimas décadas se ha avanzado considerablemente en la comprensión de la epidemiología, los factores de riesgo y los perfiles moleculares del CHC. Sin embargo, la incidencia y la mortalidad específica por cáncer siguen aumentando en muchos países, y la mayoría de los pacientes con CHC siguen presentándose en una fase avanzada (13). Los tratamientos curativos para el CHC incluyen intervenciones quirúrgicas como la resección hepática y el TOH, siendo el trasplante la opción de tratamiento más efectiva, ya que elimina no sólo el tumor sino también el hígado afecto, que tiene una capacidad funcional limitada y una tendencia a desarrollar CHC metacrónicos adicionales dentro del campo de tejido cirrótico propenso a la carcinogénesis. Por tanto, el trasplante hepático es un tratamiento excelente para el CHC en fase inicial en el contexto de una disfunción hepática que impide la resección quirúrgica (13).

A pesar del continuo desarrollo de los métodos de tratamiento tradicionales, el problema de la recurrencia y la metástasis del CHC, que causan efectos adversos en la supervivencia y el pronóstico de los pacientes, sigue siendo un reto notable. El CHC es una enfermedad heterogénea y camaleónica con implicación del microambiente tumoral. Las células del CHC pueden desprenderse del sitio primario, migrar e invadir la matriz extracelular, trasladarse a los órganos diana y formar lesiones metastásicas (230). Como consecuencia, la tasa de recurrencia local y de metástasis extrahepáticas después de estas intervenciones quirúrgicas sigue siendo alta, lo que explica en parte la alta mortalidad por CHC (231).

Los biomarcadores séricos podrían tener una función clínica muy importante en el diagnóstico temprano, pronóstico y respuesta al tratamiento de esta enfermedad, sin embargo durante las últimas décadas no ha habido una mejoría clínica significativa en los biomarcadores para el manejo y la vigilancia del CHC (232). La AFP sérica es el biomarcador ampliamente aceptado y utilizado en clínica para la evaluación y monitorización del CHC, especialmente tras el tratamiento. Este marcador tumoral puede estar elevado en otras condiciones benignas, como la hepatitis aguda y crónica o malignas, como el colangiocarcinoma intrahepático y los tumores embrionarios, por lo que su especificidad se ve comprometida. Por lo tanto, es importante desarrollar otros biomarcadores para la

monitorización de la enfermedad tras el tratamiento (233). Los países asiáticos han propuesto incluir biomarcadores distintos de la AFP, pero los países occidentales, de momento, no los incluyen en sus recomendaciones (6,234). En consecuencia, hasta la fecha no se ha alcanzado un consenso internacional en cuanto al biomarcador ideal que debe utilizarse como instrumento de vigilancia para monitorizar la progresión de la enfermedad.

Numerosos estudios recientes sugieren que los niveles séricos de PIVKA-II pueden ser un marcador tumoral independiente y útil para el manejo del CHC, pudiendo utilizarse como complemento de la AFP. Además, varios autores han demostrado que los valores de PIVKA-II se asocian con algunas características patológicas que representan la invasividad del tumor y/o el mal pronóstico y han constatado su utilidad para evaluar la eficacia de la cirugía del cáncer de hígado. Aunque PIVKA-II ha demostrado potencial como biomarcador sérico para el manejo de CHC, este marcador requiere investigación adicional. Además, PIVKA-II se ha estudiado principalmente en los países asiáticos y la experiencia con este marcador en los países occidentales continúa siendo bastante limitada (159). Algunas guías recomiendan la detección de PIVKA-II en el cribado de CHC y para predecir el pronóstico del tratamiento como la Asociación Asiática del Pacífico para el Estudio del Hígado (APASL, versión 2010) o la Sociedad Japonesa de Hepatología (JSH, versión 2015), mientras que otras pautas rechazan el uso de PIVKA-II para el diagnóstico y pronóstico del CHC como las remitidas por la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (AEEH) y la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EASL-EORTC) (versión 2018). La Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades Hepáticas (AASLD versión 2011) tampoco recomienda su uso en la detección temprana.

Por todo ello consideramos útil y necesario nuestro estudio, para comprobar si PIVKA-II y el resto de marcadores (IL-6, IL-8, OPN, GPC3 y MMP-1) podrían ser adecuados como instrumento de vigilancia para monitorizar la progresión de la enfermedad tras el trasplante hepático, contribuyendo así a un mejor manejo del paciente trasplantado por CHC.

2.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Niveles elevados de PIVKA-II, así como de IL-6, IL-8, OPN, GPC3 y MMP-1, en sangre periférica de pacientes afectos de CHC y en lista de espera de trasplante hepático, se asocian con una mayor progresión tumoral tras el trasplante y a una menor supervivencia libre de recidiva tras el mismo.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo general

El objetivo principal de este estudio es evaluar la utilidad clínica del PIVKA-II y otros biomarcadores como IL-6, IL-8, OPN, GPC3 y MMP-1 en la monitorización de pacientes sometidos a trasplante hepático por CHC y establecer la relación de estos marcadores con la progresión de la enfermedad y con la supervivencia tras el trasplante.

2.3.2. Objetivos específicos

1. Estudiar las características generales de los pacientes con CHC en espera de TOH incluidos en el estudio y realizar una descripción de las distintas variables, tanto clínicas como de laboratorio.
2. Estudiar la asociación entre el biomarcador PIVKA-II y los parámetros demográficos (edad y sexo) y clínicos (etiología del CHC, número de LOES, tamaño tumoral, escala MELD, número de TACES pre-trasplante, invasión vascular, necrosis tumoral, metástasis post-trasplante y éxitus post-trasplante) en los pacientes con CHC en lista de espera de trasplante hepático.
3. Establecer la relación entre el PIVKA-II y los parámetros de laboratorio pre-trasplante estudiados, indicadores de progresión de enfermedad, en los pacientes con CHC en lista de espera de trasplante hepático.

4. Estudiar la asociación entre las concentraciones pre-trasplante de IL-6, IL-8, OPN, GPC3 y MMP-1 y los parámetros clínicos y de laboratorio pre-trasplante, así como con PIVKA-II y con AFP, biomarcador establecido de la enfermedad, tanto antes como después del trasplante.
5. Comparar las concentraciones de PIVKA-II y del resto de biomarcadores estudiados entre los pacientes antes y después del trasplante, estudiando también si existen diferencias entre estos marcadores pre- y post-trasplante en pacientes con y sin recidiva tumoral post-trasplante y con y sin invasión vascular tumoral.
6. Analizar el punto de corte de los niveles pre-trasplante de PIVKA-II y resto de biomarcadores estudiados con mejor sensibilidad y especificidad para predecir recidiva post-trasplante y comparar la eficacia de predicción de recidiva entre estos marcadores.
7. Determinar la SG y SLE tras el trasplante hepático y comparar las curvas de supervivencia entre grupos de pacientes con diferentes características clínicas y analíticas.

3. *PACIENTES Y MÉTODOS*

3.1 DISEÑO Y ÁMBITO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio analítico observacional de cohortes dinámicas prospectivas llevado a cabo en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (HCUVA), conjuntamente entre la Unidad de Trasplantes del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo y el Servicio de Análisis Clínicos de este mismo hospital. También se han incluido en el estudio algunos pacientes procedentes del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

Los pacientes fueron reclutados entre septiembre de 2014 y mayo de 2021, en dos etapas distintas: entre septiembre de 2014 y octubre de 2017 en el HCUVA, y entre septiembre de 2020 y mayo de 2021, tanto en el HCUVA como en el HUCA. El reclutamiento de pacientes se llevó a cabo dentro de los programas de trasplante hepático de ambos hospitales, y se ha realizado un seguimiento a los pacientes trasplantados, de tal forma que la obtención de muestras ha seguido la siguiente secuencia:

- Antes del trasplante: al entrar en lista de espera para TOH.
- Al mes tras el trasplante.
- A los 6 meses tras el trasplante.
- Al año tras el trasplante.
- A los 2 años tras el trasplante.
- A los 3 años tras el trasplante.

3.2 PACIENTES

Este estudio incluye a pacientes diagnosticados de CHC, que, en cumplimiento con los criterios de Milán, se incluyen en lista de espera de trasplante ortotópico de hígado (TOH), tras ser evaluados por la Comisión de Trasplantes del HCUVA y del HUCA. Se trata de pacientes BCLC A (estadio inicial) o BCLC B (estadio intermedio), según este sistema de estadificación. Se realizó terapia puente hasta el trasplante (TACE) en la mayoría de pacientes, con la finalidad de prevenir la progresión tumoral durante el tiempo de permanencia en lista de espera. Para el reclutamiento de los pacientes se establecieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

3.2.1 Criterios de inclusión

- Edad comprendida entre 18-80 años.
- Pacientes con el diagnóstico de CHC candidatos a TOH. El diagnóstico del mismo se establece en base a la presencia de al menos dos exploraciones de imagen compatibles o la existencia de un diagnóstico histológico compatible.
- Firma del Consentimiento Informado Específico para acceder a la lista de espera de TOH y para formar parte del estudio (anexo II).

3.2.2 Criterios de exclusión

- Pacientes con CHC fuera de los criterios de Milán.
- CHC metastásico.
- Toma de fármacos antagonistas de la vitamina K, como los anticoagulantes acenocumarol o warfarina, o de vitamina K, en los 6 meses anteriores a la extracción de las muestras.

3.3 VARIABLES DEL ESTUDIO

3.3.1 Datos demográficos

- **Edad:** expresada en años, al momento de la inclusión del paciente en lista de espera para trasplante hepático.
- **Sexo:** masculino o femenino.

3.3.2 Variables clínicas

- **Etiología de la cirrosis:** se recogió de la historia clínica de cada paciente la etiología de la cirrosis. Consideramos 10 etiologías distintas: alcoholismo (ALCH), infección por virus de la hepatitis B (VHB), infección por virus de la hepatitis C (VHC), infección por los virus de la hepatitis B+C (VHB+VHC), infección por VHC más alcoholismo (VHC+ALCH), infección por VHB más alcoholismo (VHB+ALCH,) esteatosis no alcohólica (EHNA), hemocromatosis (HEMO), infección por VHC + alcoholismo + sobrecarga férrica (VHC+ALCH+Fe) y criptogénica (CRIPTO). La etiología de la

enfermedad hepática se consideró criptogénica si no fue identificada ninguna causa. A continuación clasificamos las distintas etiologías en 3 grupos: etiología viral (VHB, VHC, VHB+VHC), etiología no viral (ALCH, EHNA, HEMO, CRIPTO) y etiología mixta, la cual engloba una etiología viral más una no viral (VHC+ALCH y VHC+ALCH+Fe).

- **MELD:** se obtuvo el valor del índice MELD con los datos obtenidos de las variables bilirrubina, INR y creatinina. Dichos parámetros analíticos fueron determinados en la muestra pre-trasplante. La fórmula para calcular el índice MELD es la siguiente (235):

$$3,8 [\log_e \text{bilirrubina sérica (mg/dL)}] + 11,2 [\log_e \text{INR}] + 9,6 [\log_e \text{creatinina sérica (mg/dL)}] + 6,4$$

- **Child-Pugh:** según los datos obtenidos de la historia clínica de cada paciente, se clasificó a los mismos en Child-Pugh A, B o C.
- **Nº de LOES:** número de lesiones ocupantes de espacio o número de tumores presentes, determinadas por pruebas de imagen al diagnóstico.
- **Tamaño del tumor:** diámetro en centímetros del mayor nódulo tumoral determinado por pruebas de imagen al diagnóstico.
- **Necrosis tumoral:** presencia o no de necrosis tumoral, determinada por biopsia del explante hepático.
- **Invasión vascular:** presencia o no de invasión microvascular tumoral, determinada por biopsia del explante hepático.
- **TACES:** número de quimioembolizaciones transarteriales previas a la extracción de la muestra pre-trasplante.
- **Recidiva/metástasis:** presencia de recidiva o metástasis tumoral tras el trasplante hepático.
- **SG desde el trasplante:** supervivencia general desde el trasplante, expresada en meses y definida como el tiempo entre el trasplante hepático y el fallecimiento, si lo hubiera, o fecha de cierre de la base de datos.
- **SLE:** supervivencia libre de enfermedad, expresada en meses y definida como el tiempo entre el trasplante hepático y la fecha de recidiva o metástasis, si la hubiera, o fecha de cierre de la base de datos.
- **Éxito:** fallecimiento o no del paciente durante el tiempo de estudio.

3.3.3 Variables de laboratorio

3.3.3.1 Parámetros bioquímicos

- **Albúmina:** expresada en g/dL. [Valores de referencia (V.R.) 3,5-5,2 g/dL].
- **Bilirrubina total:** expresada en mg/dL. [V.R. 0,05-1,20 mg/dL].
- **Ferritina:** expresada en ng/mL. [V.R. 30-400 ng/mL].
- **Colesterol total:** expresada en mg/dL. [V.R. <190 mg/dL].
- **Triglicéridos:** expresada en mg/dL. [V.R. <150 mg/dL].
- **GOT:** expresada en U/L. [V.R. 5-40 U/L].
- **GPT:** expresada en U/L. [V.R. 5-41 U/L].
- **Gamma GT:** expresada en U/L. [V.R. 10-71 U/L].
- **Fosfatasa alcalina:** expresada en UI/L. [V.R. 40-130 U/L].
- **LDH:** expresada en U/L. [V.R. 135-225 U/L].
- **PCR:** expresada en mg/dL. [V.R. 0-0,50 mg/dL].

3.3.3.2 Parámetros hematológicos

- **Leucocitos:** recuento de leucocitos totales en sangre. [V.R. $4,5-11 \times 10^3/\mu\text{L}$].
- **Plaquetas:** recuento de plaquetas en sangre. [V.R. $150-350 \times 10^3/\mu\text{L}$].
- **RNL:** ratio neutrófilos-linfocitos, obtenido de la división del número absoluto de neutrófilos entre el número absoluto de linfocitos. [V.R. 0,10-3,13].
- **RPL:** ratio plaquetas-linfocitos, obtenido de la división del número absoluto de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) entre el número absoluto de linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

3.3.3.3 Parámetros de coagulación

- **Tiempo de protrombina (TP):** expresado en segundos. [V.R. 9,4-12,5 segundos].
- **INR:** *international normalized ratio* o razón internacional normalizada. [V.R. 0,9-1,20].

3.3.3.4 Marcadores tumorales clásicos

- **Alfa-fetoproteína sérica (AFP).** [V.R. 0-11 ng/mL].

3.3.3.5 Marcadores tumorales en estudio

- **PIVKA-II sérico:** proteína inducida por la ausencia de vitamina K o antagonista-II, expresado en mAU/mL. El rango de referencia calculado por la casa comercial (Fujirebio®) es de 16-48 mAU/mL.
- **IL-6 sérica:** interleucina-6 humana, expresada en pg/mL. El intervalo de referencia facilitado por la casa comercial (Roche Diagnostics®) es de 0-7 pg/mL.
- **IL-8 plasmática:** interleucina-8 humana, expresada en pg/mL.
- **OPN plasmática:** osteopontina humana, expresada en ng/mL.
- **GPC3 sérico:** glipicano-3, medido en ng/mL.
- **MMP-1 sérica:** metaloproteasa de matriz 1, expresado en ng/mL.

3.4 RECOGIDA DE VARIABLES

Las variables demográficas y clínicopatológicas se obtuvieron de la historia clínica informatizada de cada paciente. Todas las variables (demográficas, clínicas y de laboratorio) fueron recogidas de forma prospectiva en una base de datos confeccionada al inicio del estudio.

3.4.1 Recogida de las muestras

La recogida de las muestras de cada paciente se llevó a cabo a distintos tiempos a lo largo del estudio, de forma repetida: las muestras pre-trasplante fueron extraídas una vez que los pacientes fueron incluidos en lista de espera de trasplante hepático, mientras que las muestras post-trasplante se recogieron al mes, a los 6 meses, al año, a los dos años y a los tres años tras el trasplante. Todas las muestras para el estudio fueron extraídas por personal de enfermería cualificado mediante punción venosa antecubital. Tras dicha extracción, la sangre se recogió en tubos de vacío BD Vacutainer® con diferentes aditivos

(tabla 8). El tubo con citrato sódico fue rellenado de forma que contuviese 9 partes de sangre y 1 de citrato.

Las muestras destinadas a la medición de nuevos biomarcadores fueron recogidas, procesadas y cedidas por el Biobanco en Red de la Región de Murcia, BIOBANC-MUR, inscrito en el Registro Nacional de Biobancos (número de registro: B.0000859), siguiendo procedimientos normalizados de trabajo y con la aprobación del Comité de Ética y del Comité Científico. Estas muestras, tras la retracción del coágulo de fibrina en el caso del tubo de suero, fueron centrifugadas a 3500 revoluciones por minuto durante 20 minutos a 4°C y alicuotadas y congeladas a -80°C para la posterior determinación de dichos marcadores.

Tabla 8. Tipos de tubos utilizados y parámetros analizados en cada extracción. (TP: tiempo de protrombina; INR: razón internacional normalizada; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; BT: bilirrubina total; GOT: transaminasa glutámico-oxalacética; GPT; transaminasa glutámico-pirúvica; ALP: fosfatasa alcalina; LDH: lactato deshidrogenasa; AFP: alfa-fetoproteína; PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; IL-6: interleucina-6; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1).

Tipo de tubo/aditivo	Número de tubos extraídos		Parámetros analizados
Coagulación/citrato sódico	1		Parámetros coagulométricos: TP e INR.
Hemograma/EDTA 3K	2	1	Parámetros hematológicos: leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y plaquetas.
		1	IL-8 y OPN.
Suero/tubo seco	2	1	Parámetros bioquímicos (albúmina, CT, TG, BT, GOT, GPT, GGT, ALP, LDH) y AFP.
		1	PIVKA-II, IL-6, GPC3 y MMP-1.

3.4.2 Procesamiento analítico de las muestras

El procesamiento analítico de las muestras se realizó en los laboratorios del Servicio de Análisis Clínicos del HCUVA.

- Hemograma

El tubo de hemograma para la obtención de los parámetros hematológicos se analizó en el equipo Sysmex XE5000 (Roche Diagnostics®) mediante citometría de flujo fluorescente.

- Coagulación

La muestra de plasma para la determinación de los parámetros coagulométricos se analizó en el equipo ACLTOP 300 CTS (Werfen®), concretamente el TP fue analizado mediante método foto-óptico coagulométrico y el INR, que es un parámetro calculado, se obtuvo a partir del TP, con el objetivo de estandarizar los resultados de este parámetro entre los distintos laboratorios, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{INR} = [\text{TP paciente} / \text{TP control}]^{\text{ISI}}$$

El ISI o índice de sensibilidad internacional viene asignado por el fabricante y es distinto para cada lote de reactivo. El cálculo del TP control debe realizarlo cada laboratorio, a partir de plasmas de individuos sanos.

- Bioquímica

Las determinaciones de los parámetros bioquímicos se analizaron por el equipo Cobas 8000 *Modular Analyzer Series* (Roche Diagnostics®), mediante métodos colorimétricos, enzimáticos e inmunoturbidimétricos, en el módulo c711 del analizador.

- Marcadores tumorales clásicos

La determinación de AFP sérica se obtuvo por métodos de electroquimioluminiscencia (ECLIA) en el módulo Cobas e601 del analizador Cobas 8000 *Modular Analyzer Series* (Roche Diagnostics®).

- Nuevos marcadores tumorales

- PIVKA-II:

La determinación de PIVKA-II se llevó a cabo en el analizador LUMIPULSE G 1200 *system* (Fujirebio Europe® N.V., Gent, Belgium) con un rango de análisis de 5-75000 mAU/mL. La técnica empleada por el analizador fue electroquimioluminiscencia (ECLIA), mediante un método de inmunoensayo tipo sándwich en dos pasos (figura 9):

El PIVKA-II presente en las muestras se une específicamente al anticuerpo monoclonal (anticuerpo murino MU-3) anti PIVKA-II de las partículas y se forman inmunocomplejos antígeno-anticuerpo. A continuación, las partículas son lavadas para eliminar materiales no unidos. Los anticuerpos policlonales, de conejo, anti-protrombina marcados con fosfatasa alcalina (ALP, de vacuno) se unen específicamente al PIVKA-II de los inmunocomplejos de las partículas, formándose inmunocomplejos adicionales. Las partículas son lavadas para eliminar materiales no unidos y se añade la solución de sustrato, mezclándose con las partículas. El AMPPD [sal disodio de 3-(2'-espiroadamantil)-4-metoxi-4-(3''-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano] que contiene la solución de sustrato es desfosforilado por catálisis de la ALP conjugada indirectamente a las partículas. La reacción de defosforilación del AMPPD genera luminiscencia a una longitud de onda máxima de 477 nm. Dicha señal luminiscente refleja la cantidad de PIVKA-II.

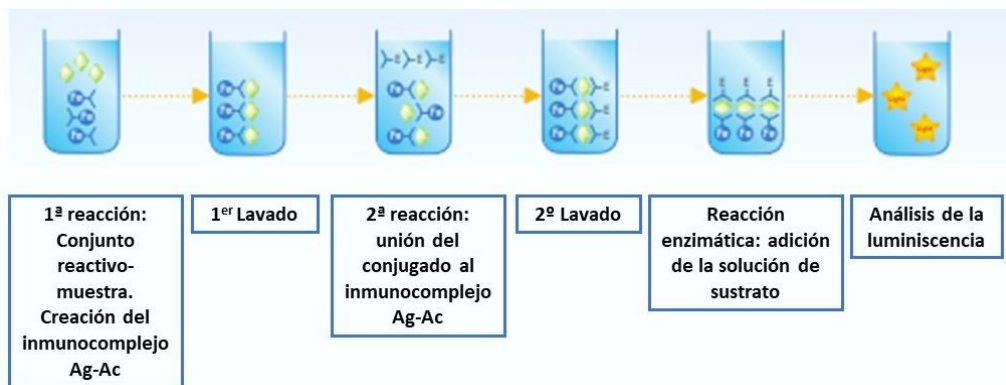


Figura 9. Análisis de PIVKA-II mediante electroquimioluminiscencia (ECLIA).

- IL-6:

Se determinó IL-6 en el analizador Cobas e 411 (Roche diagnostics®), con un intervalo de medición de 1,5-5000 pg/mL y mediante técnica sándwich:

- 1ª incubación: 30 µL de muestra se incuban con un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-IL-6.

- 2ª incubación: tras añadir un anticuerpo monoclonal anti-IL-6 marcado con quelato de rutenio y micropartículas recubiertas de estreptavidina, los anticuerpos y el antígeno de la muestra forman un complejo sándwich.
 - La mezcla de reacción es trasladada a la célula de medida donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con ProCell/ProCell M. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador.
 - Los resultados se determinan mediante una curva de calibración generada específicamente para el instrumento a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster proporcionada por el código de barras del reactivo o el código de barras electrónico.
- IL-8, OPN, GPC3 y MMP-1:

Estos marcadores fueron determinados mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida, siguiendo las especificaciones de cada fabricante (tabla 9 y figura 10).

Los ensayos inmunoenzimáticos ELISA son ensayos en placa para detectar y cuantificar una proteína específica en una mezcla compleja, como muestras humanas de suero o plasma. La detección y cuantificación de la proteína diana específica en un ELISA tipo sándwich se lleva a cabo mediante el uso de anticuerpos altamente específicos que inmovilizan la proteína diana (antígeno) en la placa y detectan indirectamente la presencia de la proteína diana. Este tipo de ensayo de captura se denomina ensayo sándwich porque el analito que se mide está unido entre dos anticuerpos primarios, cada uno de los cuales detecta un epítipo diferente del antígeno: el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección.

Estos ensayos muestran una correlación directa entre la concentración del antígeno y la respuesta del sustrato. El anticuerpo de "captura" se encuentra recubierto en la placa de 96 pocillos suministrada con el kit, para unir el antígeno de interés tras la adición de la muestra. Durante una segunda incubación, el antígeno

se une al anticuerpo de "detección" que también es específico del antígeno. El anticuerpo de detección puede estar unido a un anticuerpo secundario conjugado con una enzima, o el propio anticuerpo de detección está conjugado con una enzima. Cuando se añade el sustrato cromogénico al ensayo para desarrollar coloración, las muestras con alta concentración de antígeno generan más señal que aquellas con baja concentración del mismo, produciendo una señal directamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra. Esta señal es medida espectrofotométricamente en forma de absorbancia en el lector de placas y puede utilizarse para extrapolar la concentración de antígeno en una muestra desconocida a partir de una curva estándar.

El procedimiento simplificado de un ELISA tipo sándwich es el siguiente:

1. Adición de estándares y muestras que contienen una cantidad desconocida de la proteína diana a los pocillos que contienen el anticuerpo de captura.
2. Lavado para eliminar las moléculas no unidas.
3. Adición de un anticuerpo de detección, e incubación para que se produzca la unión al antígeno creando un "sándwich".
4. Lavado para eliminar el exceso de anticuerpo de detección.
5. Adición del conjugado anticuerpo secundario-enzima y lavado. La enzima conjugada suele ser la peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina. Este paso puede omitirse si la enzima informante se conjuga directamente con el anticuerpo de detección.
6. Adición del sustrato, que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación de la proteína unida.
7. Medición de la señal en el lector de placas.

Tabla 9. Características de cada ensayo ELISA utilizado específico para cada marcador.

Marcador tumoral y casa comercial	Ac 1 ^{ario}	Ac 2 ^{ario} o conjugado	Sustrato	Longitud de onda (nm)
IL-8 (Invitrogen™)	Ac monoclonal biotinilado específico para IL-8	Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano	Tetrametil-benzidina (TMB)	450
OPN (Enzo Life Sciences®)	Ac monoclonal biotinilado específico para OPN	Estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina	p-nitrofenil fosfato	405
GPC3 (MyBiosource®)	Ac monoclonal específico para GPC-3	Ac policlonal conjugado con peroxidasa de rábano	Solución cromógena A y B	450
MMP-1 (MyBiosource®)	Ac monoclonal específico para MMP-1	Ac policlonal conjugado con peroxidasa de rábano	Sustrato de peroxidasa A y B	450

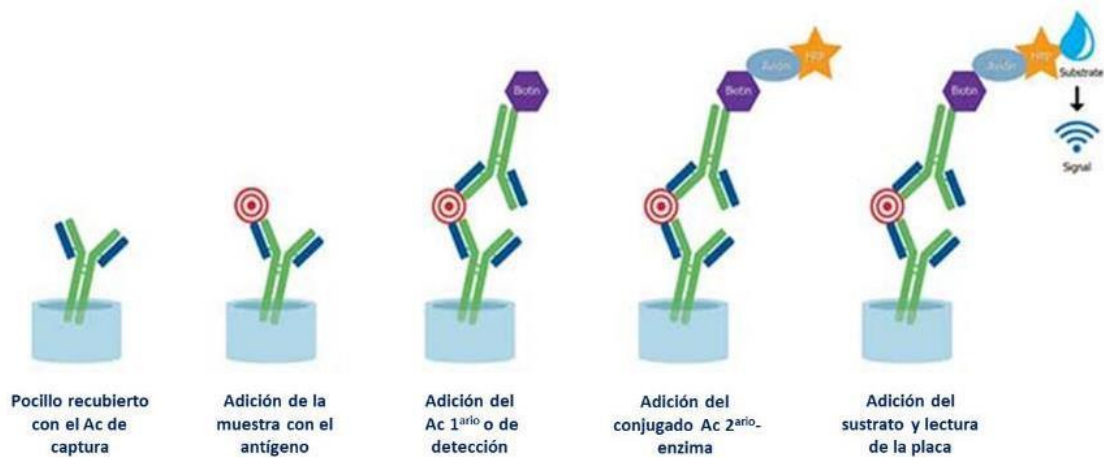


Figura 10. Procedimiento de un ELISA tipo sándwich.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez obtenidas y recogidas todas las variables en la base de datos, se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando el programa *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM® SPSS® Statistics) versión 23.

En primer lugar, se realizó la estadística descriptiva de cada una de las variables. Se aplicó el test de Shapiro-Wilk para comprobar la distribución de las mismas, siendo las variables cuantitativas representadas con la media \pm desviación estándar o con la mediana y el rango intercuartílico (RI), según presentasen o no una distribución normal, respectivamente. Las variables cualitativas se expresaron con la frecuencia absoluta y frecuencia relativa, esta última mediante porcentajes.

Para el análisis de correlación entre las distintas variables continuas se utilizó el test Rho de Spearman. Las comparaciones de variables entre 2 grupos se realizaron mediante test de U de Mann Whitney, y entre 3 o más grupos mediante el test de Kruskal-Wallis.

Para comparar los niveles medianos de los biomarcadores entre las muestras pre-trasplante y las muestras post-trasplante se aplicó el test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas.

Para estudiar la predicción de recidiva post-trasplante de los niveles pre-trasplante de los marcadores estudiados se empleó el análisis "*Receiver Operating Characteristic*" (ROC).

Para comparar la eficacia de predicción de recidiva de los distintos marcadores se estimó el Área Bajo la Curva (AUC) y el punto de corte correspondiente a la máxima sensibilidad y especificidad de cada marcador, o máximo índice de Youden. A continuación se realizó un análisis ROC combinado para determinar si se podía conseguir un poder predictivo adicional, tras construir un modelo mediante regresión logística binaria por el método de introducir para cada combinación de marcadores.

Se utilizó el método de Curvas de Supervivencia de Kaplan Meier para estudiar la Supervivencia General (SG) y la Supervivencia Libre de Recidiva o Metástasis (SLE) tras el trasplante hepático. La comparación de estas curvas entre los pacientes del estudio con distintas características clínicas y analíticas se llevó a cabo con el test de Log Rank (Mantel-Cox), utilizando en el caso de los biomarcadores los puntos de corte obtenidos previamente en el análisis de las curvas ROC y en el caso de los parámetros bioquímicos indicadores de progresión tumoral, el límite superior del intervalo de referencia de dichos parámetros de laboratorio.

El nivel de significación estadística utilizado en los contrastes de hipótesis fue $p \leq 0,05$ para todas las situaciones.

3.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HCUVA (anexo I). Todos los pacientes del estudio fueron correctamente informados del mismo y firmaron el Consentimiento Informado para formar parte del estudio y autorizar el almacenamiento de muestras biológicas en el Biobanco de la Región de Murcia (anexo II).

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA DE PACIENTES

Se incluyeron un total de 46 pacientes diagnosticados de CHC en lista de espera de TOH, entre septiembre de 2014 y mayo de 2021. La mediana de la duración del seguimiento de todos los pacientes fue de 57 meses (RI 4,5-76,5), un tiempo mínimo de seguimiento de 2 meses y un tiempo máximo de seguimiento de 84 meses, considerándose como fecha inicial de cada paciente la extracción de la muestra sanguínea pre-trasplante y como fecha final el fallecimiento del paciente, si lo hubiera, o la fecha de cierre de la base de datos (junio 2021).

En el presente estudio, hasta la fecha de cierre de la base de datos, se recogieron un total de 46 muestras sanguíneas pre-trasplante, 28 muestras al mes post-trasplante, 24 muestras a los 6 meses post-trasplante, 24 muestras al año post-trasplante, 23 muestras a los 2 años post-trasplante y 20 muestras a los tres años post-trasplante.

De los 46 pacientes inicialmente incluidos en lista de espera de trasplante hepático, 35 fueron finalmente trasplantados, de los cuales 4 (11,43%) presentaron recidiva tumoral o metástasis extrahepática constatada por imagen tras el trasplante. De ellos, el paciente 7 presentó metástasis ósea, pulmonar y hepática; el paciente 13 desarrolló metástasis suprarrenal bilateral; el paciente 19 presentó metástasis ósea y hepática y, por último, el paciente 23 presentó recidiva intrahepática y metástasis ósea. Estos 4 pacientes con recidiva acabaron falleciendo por la progresión de la enfermedad. En total, de los 46 pacientes reclutados, 11 de ellos (23,91%) fallecieron durante el estudio, de los cuales 4 fallecieron antes de ser trasplantados y 7 fallecieron después del trasplante hepático. El motivo de éxitus de los pacientes que fallecieron tras el trasplante fue la recidiva tumoral en 4 pacientes, la sepsis biliar (absceso hepático) en 2 pacientes, y un evento cardiovascular en otro paciente.

4.2 ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES DEMOGRÁFICAS, CLINICOPATOLÓGICAS Y DE LABORATORIO

Las principales variables clínico-demográficas de los pacientes incluidos en el estudio se describen en la tabla 10.

Tabla 10. Principales variables clínico-demográficas de los pacientes incluidos en el estudio. (TOH: trasplante ortotópico de hígado; LOE: lesiones ocupantes de espacio; MELD: *model for end-stage liver disease*; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

VARIABLE CLÍNICO-DEMOGRÁFICA	NÚMERO DE PACIENTES (%)
Sexo	n=46
Hombre	41 (89,1%)
Mujer	5 (10,9%)
Edad	n=46
<60 años	24 (52,2%)
≥60 años	22 (47,8%)
Pacientes en lista de espera para TOH	n=46
Trasplantados	35 (76,09%)
No trasplantados	11 (23,91%)
LOES	n=46
Única	23 (50%)
Múltiple	23 (50%)
Tamaño tumoral	n=46
≤3 cm	33 (71,74%)
>3 cm	13 (28,26%)
TACES pre-trasplante	n=46
Sí	31 (67,4%)
No	15 (32,6%)
Invasión vascular	n=31
Sí	4 (12,9%)
No	27 (87,1%)
Necrosis tumoral	n=36
Sí	22 (61,1%)
No	14 (38,9%)
Recidiva/metástasis post-trasplante	n=35
Sí	4 (11,43%)
No	31 (88,57%)
Éxito post-trasplante	n=35
Sí	7 (20%)
No	28 (80%)

En cuanto al sexo de los pacientes, se puede observar un claro predominio masculino con un 89,1% de hombres y un 10,9% de mujeres, y con una relación hombre: mujer de 8,2:1. La edad de los pacientes en el momento de inclusión en la lista de espera de trasplante oscilaba entre los 47 y los 76 años, con una media de $58,86 \pm 5,72$ años.

El 50% de los pacientes de nuestro estudio presentaba una única LOE hepática mientras que el otro 50% presentaba más de una LOE. En relación al tamaño tumoral, un 71,74% presentaban un diámetro de la mayor lesión tumoral ≤ 3 cm, mientras que un 28,26% presentaban un diámetro > 3 cm.

Respecto a los tratamientos previos al TOH, el 67,4% de los pacientes de nuestro estudio recibieron al menos una TACE antes del trasplante.

De los 35 pacientes trasplantados, 4 de ellos presentaron recidiva tumoral tras el trasplante (11,4%), y en torno al 13% presentaban invasión microvascular, coexistiendo en un paciente (paciente 19) la invasión microvascular y la presencia de recidiva tumoral post-trasplante. Por otra parte, alrededor del 61% de los trasplantados presentaba necrosis tumoral.

Un 20% de los pacientes trasplantados fallecieron en el seguimiento post-trasplante, representando la recidiva tumoral un 57,14% de todas las muertes tras el TOH.

Las variables clínico-demográficas cuantitativas se muestran en la tabla 11 y las variables clínicas cualitativas en las tablas 12 y 13.

Los resultados de las variables de laboratorio se muestran en las tablas 14-22. Los parámetros hematológicos, coagulométricos, marcadores de inflamación y marcadores tumorales (AFP) pre-trasplante de los 46 pacientes incluidos en el estudio se recogen en la tabla 14, mientras que los parámetros bioquímicos pre-trasplante de todos los pacientes se muestran en la tabla 15. Los niveles de PIVKA-II antes y después del trasplante se muestran en la tabla 16, y los valores pre- y post-trasplante de los marcadores IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 y AFP, se recogen en las tablas 17, 18, 19, 20, 21 y 22, respectivamente.

Tabla 11. Variables clínicas y demográficas cuantitativas: edad, nº de LOES, tamaño tumoral, escala MELD, nº de TACES pre-TH, SLE, SG y tiempo de seguimiento. (LOES: lesiones ocupantes de espacio; MELD: *Model for End-stage Liver Disease*; TACES: quimioembolizaciones transarteriales; TOH: trasplante ortotópico de hígado; SLE: supervivencia libre de enfermedad o recidiva; SG: supervivencia general).

Paciente	Edad	Nº LOES	TAMAÑO TUMORAL (cm)	MELD	Nº TACES Pre-TOH	SLE (meses)	SG (meses)	Tiempo de seguimiento (meses)
1	51	1	6	7	0	NO TOH	NO TOH	4
2	56	2	6	15	1	NO TOH	NO TOH	9
3	64	1	5,5	7	2	NO TOH	NO TOH	-
4	58	2	1,8	9	1	76	76	84
5	54	4	5,8	9	2	80	80	84
6	64	1	2,5	7	2	73	73	81
7	55	4	2,5	10	3	6	13	18
8	64	2	4,3	6	0	NO TOH	NO TOH	10
9	56	1	4,6	15	1	71	71	80
10	60	2	1,4	7	1	78	78	79
11	60	2	2,2	8	1	12	12	12
12	48	1	2,7	11	1	73	73	79
13	56	1	1,2	8	0	4	8	25
14	62	3	2	12	1	70	70	79
15	63	1	6,8	7	2	77	77	79
16	60	3	2,6	8	1	71	71	79
17	65	1	3	7	1	71	71	78
18	57	4	1,8	9	0	70	70	78
19	60	7	3	8	4	5	13	23
20	67	1	2,8	7	2	72	72	75
21	60	4	1,2	9	0	70	70	75
22	58	1	1,5	-	0	70	70	73
23	47	2	4,7	10	1	21	31	44
24	60	4	3	21	1	68	68	69
25	63	3	6	10	2	NO TOH	NO TOH	2

26	54	1	2,2	15	1	47	47	68
27	54	2	3	14	2	67	67	68
28	53	1	1,8	20	0	65	65	66
29	60	1	1,5	9	0	64	64	66
30	54	1	3	12	0	56	56	57
31	55	1	9	17	4	55	55	57
32	52	4	5,3	11	6	1	1	2
33	50	1	1,2	10	1	51	51	57
34	65	1	2,4	9	1	55	55	57
35	76	2	5,6	8	1	NO TOH	NO TOH	2
36	68	2	2,5	8	1	9	9	10
37	58	1	2,2	10	1	8	8	9
38	64	2	2,5	9	1	8	8	9
39	60	3	2,6	8	2	1	1	5
40	59	1	2	13	2	NO TOH	NO TOH	4
41	55	2	2,1	-	0	4	4	4
42	63	1	2	14	0	2	2	3
43	55	2	1,8	7	0	NO TOH	NO TOH	3
44	64	1	2,9	8	0	NO TOH	NO TOH	3
45	57	1	1,8	10	0	NO TOH	NO TOH	2
46	55	1	3,8	-	0	NO TOH	NO TOH	1
Shapiro-Wilk	0,975	0,750	0,846	0,842	0,784	0,788	0,803	0,814
p	0,469	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Media	58,86	2	3,24	10,21	1,15	46,60	47,43	52,34
DE	5,72	1,33	1,79	3,52	1,25	30,23	29,30	30,06
Mediana	60	2	2,6	9	1	64	64	66
RI	55-63	1-3	2-4,6	8-12	0-2	8-71	12-71	18-79

Tabla 12. Variables clínicas cualitativas: etiología de la cirrosis y escala Child-Pugh. (ALCH: alcoholismo; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; Fe: sobrecarga férrica; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HEMO: hemocromatosis; CRIPTO: criptogénica).

Paciente	ETIOLOGÍA		CHILD-PUGH
1	ALCH	NO VIRAL	B
2	VHC+ALCH	MIXTA	C
3	VHB+ALCH	MIXTA	A
4	VHC	VIRAL	B
5	VHC+ALCH+Fe	MIXTA	-
6	CRIPTO	NO VIRAL	B
7	VHC	VIRAL	-
8	VHC	VIRAL	A
9	VHC	VIRAL	-
10	VHC+ALCH	MIXTA	A
11	VHC+ALCH	MIXTA	A
12	VHC	VIRAL	A
13	VHC	VIRAL	A
14	VHC+ALCH	MIXTA	-
15	ALCH	NO VIRAL	A
16	ALCH	NO VIRAL	-
17	CRIPTO	NO VIRAL	-
18	VHC	VIRAL	-
19	VHB+VHC	VIRAL	A
20	VHC	VIRAL	B
21	VHC	VIRAL	A
22	VHC	VIRAL	-
23	VHC+ALCH	MIXTA	A
24	HEMO	NO VIRAL	-
25	VHC+ALCH	MIXTA	B
26	VHC	VIRAL	-
27	CRIPTO	NO VIRAL	A
28	VHC+ALCH	MIXTA	C
29	ALCH	NO VIRAL	B
30	VHB	VIRAL	A
31	VHC	VIRAL	-
32	EHNA	NO VIRAL	C
33	ALCH	NO VIRAL	-
34	ALCH	NO VIRAL	A
35	EHNA	NO VIRAL	-
36	ALCH	NO VIRAL	-
37	VHC+ALCH	MIXTA	B
38	ALCH	NO VIRAL	B
39	ALCH	NO VIRAL	B
40	ALCH	NO VIRAL	A
41	ALCH	NO VIRAL	A
42	ALCH	NO VIRAL	A
43	VHC	VIRAL	A

44	VHC	VIRAL	A
45	VHC	VIRAL	A
46	VHC	VIRAL	A
Etiología (%)			
n=46			
ALCH	12 (26,1%)		
VHB	1 (2,2%)		
VHC	16 (34,8%)		
VHB+VHC	1 (2,2%)		
VHB+ALCH	1 (2,2%)		
VHC+ALCH	8 (17,4%)		
EHNA	2 (4,3%)		
HEMO	1 (2,2%)		
VHC+ALCH+Fe	1 (2,2%)		
CRIPTO	3 (6,5%)		
VIRAL			
VIRAL	18 (39,1%)		
NO VIRAL	18 (39,1%)		
MIXTA	10 (21,7%)		
CHILD-PUGH (%)			
n=32			
A	20 (62,5%)		
B	9 (28,1%)		
C	3 (9,4%)		

Tabla 13. Variables clínicas cualitativas: necrosis tumoral, invasión vascular, recidiva/metástasis post-trasplante y éxitus post-trasplante. (TOH: trasplante ortotópico de hígado).

Paciente	NECROSIS TUMORAL	INVASIÓN VASCULAR	RECIDIVA POST-TRASPLANTE	ÉXITUS POST-TRASPLANTE
1	NO TOH	NO TOH	NO TOH	NO TOH
2	NO TOH	NO TOH	NO TOH	NO TOH
3	NO TOH	NO TOH	NO TOH	NO TOH
4	NO	NO	NO	NO
5	SÍ	NO	NO	NO
6	SÍ	NO	NO	NO
7	SÍ	NO	SÍ	SÍ
8	NO TOH	NO TOH	NO TOH	NO TOH
9	SÍ	NO	NO	NO
10	NO	NO	NO	NO
11	NO	NO	NO	SÍ
12	SÍ	NO	NO	NO
13	SÍ	NO	SÍ	SÍ
14	NO	SÍ	NO	NO
15	SÍ	NO	NO	NO
16	SÍ	SÍ	NO	NO
17	NO	NO	NO	NO
18	SÍ	NO	NO	NO
19	NO	SÍ	SÍ	SÍ
20	SÍ	NO	NO	NO
21	NO	NO	NO	NO
22	SÍ	NO	NO	NO
23	SÍ	NO	SÍ	SÍ
24	SÍ	NO	NO	NO
25	NO TOH	NO TOH	NO TOH	NO TOH
26	SÍ	-	NO	NO
27	SÍ	NO	NO	NO
28	NO	NO	NO	NO
29	SÍ	NO	NO	NO
30	NO	NO	NO	NO
31	SÍ	NO	NO	NO
32	SÍ	NO	NO	SÍ
33	SÍ	NO	NO	NO
34	SÍ	NO	NO	NO
35	NO TOH	NO TOH	NO TOH	NO TOH
36	SÍ	NO	NO	SÍ
37	SÍ	-	NO	NO
38	NO	-	NO	NO
39	NO	-	NO	NO
40	NO TOH	NO TOH	NO TOH	NO TOH
41	NO	NO	NO	NO
42	NO	-	NO	NO
43	NO	SÍ	NO TOH	NO TOH
44	NO TOH	NO TOH	NO TOH	NO TOH
45	NO TOH	NO TOH	NO TOH	NO TOH
46	NO TOH	NO TOH	NO TOH	NO TOH
No (%)	14 (38,9%)	27 (87,1%)	31 (88,6%)	28 (80%)
Sí (%)	22 (61,1%)	4 (12,9%)	4 (11,4%)	7 (20%)

Tabla 14. Parámetros de laboratorio pre-trasplante: hematológicos, inflamatorios, marcadores tumorales (AFP) y coagulométricos. (LEUCOS: leucocitos; PLAQ: plaquetas; RNL: ratio neutrófilos-linfocitos; RPL: ratio plaquetas-linfocitos; PCR: proteína C reactiva; AFP: alfa-fetoproteína; TP: tiempo de protrombina; INR: razón internacional normalizada).

Paciente	LEUCOS x10 ³ /μL	PLAQ x10 ³ /μL	RNL	RPL	PCR (mg/dL)	AFP (ng/mL)	TP (seg)	INR
1	5	68,8	2,50	59,83	-	21	12,20	1,10
2	3,84	83,5	2,06	79,52	-	2025	17,10	1,53
3	2,9	72,3	2,02	83,10	-	10	11,70	1,06
4	3,72	63,2	3,39	89,01	-	5	13,10	1,18
5	4,91	79,7	3,26	76,63	0,32	15	13,50	1,08
6	4,22	103	1,79	86,55	2,24	2	10,40	0,95
7	4,08	66,4	2,45	65,74	0,54	3	13,10	1,18
8	4,86	123	1,13	62,12	0,03	31	10,80	0,98
9	3,24	45,9	4,41	90	0,93	6	15,20	1,36
10	4,58	56,7	2,69	49,74	0,19	3	12,10	1,10
11	4,4	109	3,33	128,24	0,81	1	13	1,17
12	4,63	58,4	1,83	42,94	0,5	2	14,60	1,31
13	3,89	72,3	3,61	97,70	0,12	253	12,80	1,16
14	10,1	186	0,45	34,44	0,99	14	13,90	1,25
15	4,91	70,9	1,71	45,16	0,63	6	11,80	1,07
16	4,03	73,8	4,95	125,08	0,3	4	12,50	1,13
17	4,39	95,9	2,03	81,27	0,52	4	11,60	1,08
18	4,07	110	0,52	44	0,02	21	11,80	1,10
19	3,34	88,2	1,45	76,70	0,83	11	12,30	1,16
20	4,57	85,6	2,37	70,74	0,1	7	11,50	1,07
21	5,3	74,6	1,21	34,38	0,01	7	13	1,21
22	7,93	217	3,05	129,17	0,36	11	-	-
23	6,55	71,1	1,96	38,23	0,15	4	14,90	1,36
24	3,63	33	4,14	56,90	1,32	5	18,60	1,69
25	10,73	224	2,45	100,45	1,49	3638	13,20	1,21

26	8,35	200	2,29	85,11	1,99	4	11,30	1,04
27	3,06	50	2,60	66,67	0,57	5	15,80	1,44
28	3,9	42	8,32	110,53	0,24	25	23	2,09
29	4,7	65	1,91	46,43	0,19	7	11	1,01
30	3,93	121	1,96	102,54	0,06	3	12,10	1,10
31	2,95	62	1,66	65,26	0,57	7	16	1,45
32	2,35	49	2,79	94,23	0,68	63	13,20	1,20
33	4,39	90	1,73	62,94	0,12	3	14,30	1,30
34	4,57	63	2,03	51,22	0,45	6	14,30	1,30
35	6,78	161	1,97	78,16	0,48	4412	12,30	1,12
36	7,9	164	2,06	70,69	0,38	7	13,20	1,20
37	5,88	98	1,29	44,75	0,55	8,3	15,40	1,39
38	4,86	88	2,20	70,97	0,11	4,5	13,90	1,25
39	4,27	116	1,40	81,69	0,21	808,9	12,90	1,17
40	2,7	40	2,58	66,67	1,44	152,8	17,90	1,56
41	1,76	72	0,77	92,31	0,06	2,1	-	-
42	6,04	72	1,28	32,29	0,61	11,1	16,40	1,48
43	5,87	178	1,65	98,34	0,12	3,9	12	1,05
44	1,44	40	0,40	47,06	0,06	1,4	13,50	1,18
45	3,42	182	1,05	129,08	0,06	2,3	15,50	1,36
46	7,32	275	2,07	132,21	0,38	3,7	-	-
Shapiro-Wilk	0,878	0,886	0,810	0,956	0,828	0,293	0,869	0,852
p	0,001	0,001	<0,001	0,128	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Media	4,82	95,09	2,28	72,09	0,54	245,44	13,70	1,24
DE	1,91	49,02	1,41	26,49	0,54	904,67	2,42	0,22
Mediana	4,40	79,70	1,97	70,69	0,45	6	13,20	1,18
RI	3,89-5,30	62-116	1,45-2,60	47,06-90	0,12-0,68	3,9-15	12,10-14,90	1,10-1,36

Tabla 15. Parámetros bioquímicos pre-trasplante. (ALB: albúmina; FERRIT: ferritina; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; GOT: transaminasa glutámico oxalacética; GPT: transaminasa glutámico pirúvica; GGT: gamma glutamil transferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; BT: bilirrubina total; ALP: fosfatasa alcalina).

Paciente	ALB (g/dL)	FERRIT (ng/mL)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	GOT (U/L)	GPT (U/L)	GGT (U/L)	LDH (U/L)	BT (mg/dL)	ALP (U/L)
1	3,90	29	160	58	34	32	95	-	0,62	130
2	3,40	36	118	82	34	28	36	-	2,51	289
3	4	13	173	56	46	28	144	-	0,71	99
4	3,20	28	188	89	43	-	114	-	1,18	162
5	3,60	282	134	62	165	125	343	231	1,60	184
6	3,90	-	171	152	125	68	787	203	0,77	268
7	3,70	775	106	106	89	74	42	150	1,43	-
8	4,90	245	118	98	131	143	208	225	0,84	-
9	3	334	157	80	233	144	74	310	3,48	127
10	3,90	23	142	84	65	83	108	187	0,85	-
11	4	28	152	84	26	20	65	221	0,64	-
12	3,90	239	192	85	34	30	99	190	1,71	-
13	4,40	45	165	100	23	20	26	193	0,75	-
14	3,40	16	192	102	42	19	40	289	1,98	-
15	4,90	228	198	114	38	36	89	237	1,05	-
16	4,60	24	198	104	34	25	106	187	0,66	-
17	4,30	84	192	153	34	23	75	158	0,45	-
18	4,20	2536	169	169	101	120	60	199	1,37	-
19	4	102	173	112	50	21	100	223	0,87	-
20	4,30	1120	185	93	115	130	77	179	1,04	-
21	4,30	31	145	143	66	54	52	178	0,84	-
22	3,60	175	168	126	-	14	66	-	1,02	-
23	3,60	20	169	51	27	14	79	185	0,59	-
24	2,40	-	101	51	85	43	50	271	9,34	190
25	3,20	79	160	196	146	38	335	234	1,37	358
26	2,90	170	210	118	40	20	154	216	0,23	173

27	3,60	113	210	190	58	39	187	221	2,59	117
28	3	48	95	74	46	26	29	199	3,85	63
29	4,70	62	188	145	33	18	85	-	0,97	159
30	4,70	61	113	70	35	42	65	218	0,75	141
31	3,20	151	184	64	60	30	56	357	6,01	154
32	3,50	84	185	52	77	118	622	293	1,86	554
33	3,90	44	163	71	30	12	232	218	1,09	86
34	3,80	587	179	135	35	29	60	176	0,74	186
35	4,40	31	167	108	36	27	156	288	0,60	94
36	4	20	211	138	30	22	122	141	0,66	120
37	4	14	107	55	27	20	66	201	0,88	146
38	4,30	153	177	86	36	25	143	185	1,02	90
39	3,60	299	76	44	56	34	164	212	0,81	134
40	-	318	-	-	38	28	494	191	1,71	269
41	-	140	99	43	22	12	83	123	0,76	46
42	3,20	1359	205	110	46	27	92	216	2,44	250
43	5,10	152	168	94	29	27	30	161	0,37	73
44	2,80	173	116	53	16	10	23	102	0,43	51
45	4,60	90	225	164	23	17	26	165	0,41	99
46	4,60	173	119	84	20	21	27	172	0,26	110
Shapiro-Wilk	0,953	0,593	0,950	0,894	0,681	0,643	0,768	0,951	0,787	0,722
p	0,394	<0,001	0,344	0,026	<0,001	<0,001	<0,001	0,349	<0,001	<0,001
Media	3,76	210,33	160,05	97,52	59,24	40,62	143,14	215,05	1,49	157,62
DE	0,66	295,35	42,68	44,81	55,04	38,09	144,65	59,02	1,46	113,90
Mediana	3,60	151	167	84	36	27	92	216	0,88	127
RI	3,20-4,35	54,50-227,50	117,50-195	63-126,50	29,50-59	20,50-38,50	43-175,50	174-232,50	0,52-2,15	92-178,50

Tabla 16. Niveles de PIVKA-II antes y después del trasplante (al mes, 6 meses, al año, a los 2 años y a los 3 años post-trasplante. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; TOH: trasplante ortotópico de hígado).

Paciente	PIVKA-II (mAU/mL) Pre-TOH	PIVKA-II (mAU/mL) 1 mes post-TOH	PIVKA-II (mAU/mL) 6 meses post-TOH	PIVKA-II (mAU/mL) 1 año post-TOH	PIVKA-II (mAU/mL) 2 años post-TOH	PIVKA-II (mAU/mL) 3 años post-TOH
1	49	-	-	-	-	-
2	363	-	-	-	-	-
3	1479	-	-	-	-	-
4	28	9	13	23	26	20
5	571	18	35	27	34	-
6	183	23	33	26	35	-
7	596	17	271	-	-	-
8	1403	-	-	-	-	-
9	19	16	-	25	37	32
10	116	17	20	29	-	-
11	156	14	16	-	-	-
12	152	13	26	23	19	33
13	19	112	45	-	-	-
14	24	18	-	20	38	25
15	382	58	37	36	74	47
16	20	27	-	21	31	26
17	26	15	-	30	35	34
18	36	22	-	28	44	38
19	725	52	4780	75000	-	-
20	39	32	35	27	32	33
21	23	24	-	17	32	28
22	244	30	-	25	43	44
23	71	33	36	1915	75000	-
24	588	24	29	37	36	-
25	20660	30	-	-	-	-
26	67	33	-	44	47	-

27	24	24	28	33	32	25
28	91	-	71	48	41	61
29	71	31	14	32	-	22
30	34	26	38	-	25	39
31	253	-	36	32	22	20
32	9482	-	-	-	-	-
33	40	21	38	43	58	82
34	84	21	67	49	41	40
35	2982	18	-	-	-	-
36	39	37	54	-	-	-
37	78	20	25	-	-	-
38	37	-	23	-	-	-
39	287	23	-	-	-	-
40	138	-	-	-	-	-
41	58	-	-	-	-	-
42	511	-	-	-	-	-
43	79	-	-	-	-	-
44	55	-	-	-	-	-
45	168	-	-	-	-	-
46	177	-	-	-	-	-
Shapiro-Wilk	0,285	0,928	0,879	0,933	0,881	0,821
p	<0,001	0,497	0,183	0,544	0,193	0,048
Media	928,75	27	35	33,25	38	37,50
DE	3308,71	15,55	15,36	9,27	19,04	20,31
Mediana	87,50	23,50	35,50	32,50	32	33
RI	38,50-367,75	14,75-35,75	26,50-37,75	24-41,25	23-53,75	21,25-45,25

Tabla 17. Niveles de IL-6 antes y después del trasplante (al mes, 6 meses, al año, 2 años y 3 años post-trasplante. (IL-6: interleucina 6; TOH: trasplante ortotópico de hígado).

Paciente	IL-6 (pg/mL) Pre-TOH	IL-6 (pg/mL) 1 mes post-TOH	IL-6 (pg/mL) 6 meses post-TOH	IL-6 (pg/mL) 1 año post-TOH	IL-6 (pg/mL) 2 años post-TOH	IL-6 (pg/mL) 3 años post-TOH
1	17,67	-	-	-	-	-
2	18,01	-	-	-	-	-
3	8,31	-	-	-	-	-
4	5,55	12,43	11,45	2,11	2,91	11,86
5	10,03	14,28	50,99	9,51	3,04	-
6	10,39	21,92	9,56	23,91	6,69	14,55
7	8,33	17,43	18,60	-	-	-
8	3,30	-	-	-	-	-
9	11	18,04	-	3,76	2,04	4,75
10	4,76	5,40	4,27	5,78	3,25	6,82
11	12,16	51,44	43,15	-	-	-
12	5,22	5,15	4,48	5,49	7,65	12,77
13	6,05	19,37	18,67	-	-	-
14	26,77	9,54	-	9,31	15,13	9,48
15	4,29	21,51	4,99	6,12	8,75	5,89
16	6,83	18,19	-	5,80	7,86	8,29
17	8,99	27,19	-	20,76	5,81	7,84
18	9,28	5,04	-	4,60	4,76	5,42
19	14,26	4,72	14,45	198,20	-	-
20	8,39	4,71	8,96	10,82	6,42	11,36
21	6,12	32,05	-	7,46	12,87	13,30
22	39,26	57,83	-	20,17	21,89	28,64
23	7,50	15,39	5,67	3,47	16,94	-
24	38,75	16,30	4,02	5,05	6,15	-
25	26,85	-	-	-	-	-
26	21,44	11	7,12	7,48	8,81	-

27	6,86	13,27	3,89	4,30	4,72	7,66
28	17,78	-	9,46	5,92	6,28	9,71
29	4,41	-	24,73	4,70	-	9,09
30	4,86	11,81	8,05	-	7,70	-
31	27,23	23,10	6,45	13,63	7,62	-
32	13,01	15,87	-	-	-	-
33	8,04	24,20	5,37	7,12	5,77	-
34	15,59	28,78	19,30	9,78	15,22	-
35	12,55	-	-	-	-	-
36	11,95	15,39	51,27	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
Shapiro-Wilk	0,899	0,844	0,840	0,757	0,940	0,919
p	0,328	0,107	0,099	0,015	0,641	0,463
Media	6,49	12,06	6,80	8,36	5,77	10,13
DE	2,21	7,46	3,09	7,34	2,21	3,32
Mediana	5,55	12,43	4,99	5,78	6,42	11,36
RI	4,76-8,39	5,15-21,51	4,27-9,56	4,30-10,82	3,25-7,65	6,82-12,77

Tabla 18. Niveles de IL-8 antes y después del trasplante: al mes, 6 meses, al año, 2 años y 3 años post-trasplante. (IL-8: interleucina-8; TOH: trasplante ortotópico de hígado).

Paciente	IL-8 (pg/mL) Pre-TOH	IL-8 (pg/mL) 1 mes post-TOH	IL-8 (pg/mL) 6 meses post-TOH	IL-8 (pg/mL) 1 año post-TOH	IL-8 (pg/mL) 2 años post-TOH	IL-8 (pg/mL) 3 años post-TOH
1	4,43	-	-	-	-	-
2	15,27	-	-	-	-	-
3	13,29	-	-	-	-	-
4	6,27	2,75	11,30	0	0	3,52
5	2,91	0	10,87	0	0	-
6	4,86	0	0	0	0	4,59
7	2,16	1,79	1,84	-	-	-
8	5,15	-	-	-	-	-
9	0	2,89	-	0,20	2,24	0
10	0	0	0	0	0,97	0
11	3,04	8,68	3,96	-	-	-
12	2,27	0	0	0	0	2,45
13	0	2,60	3,81	-	-	-
14	11,20	0	-	0	0,62	2,60
15	14,37	4,09	8,91	2,97	0,09	0
16	9,37	0	-	0	0,16	1,84
17	2,14	1,09	-	1,51	0	0,62
18	0	0	-	0	0	-
19	1,22	0	0	13,77	-	-
20	7,69	5,30	2,56	1,47	1,55	0
21	2,70	2,44	-	0,37	-	0
22	2,91	5,66	-	0	1,84	0,77
23	3,63	3,08	0,35	0	14,36	-
24	3,55	0,13	0	0	0	-
25	54,35	-	-	-	-	-
26	32,22	7,95	0	1,53	0	-

27	1,07	0,44	0	0	0,16	2,45
28	0,16	-	0	0	0,31	0
29	5,35	-	7,33	0	-	0
30	0,47	2,14	0	-	3,21	3,06
31	4,28	3,06	0	0	0	0
32	18,17	13,29	-	-	-	-
33	13,59	3,67	0	0	0,62	0
34	0,01	3,98	0	2,60	0	1,23
35	1,53	-	-	-	-	-
36	2,75	0	5,81	-	-	-
37	0	-	-	-	-	-
38	3,21	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
Shapiro-Wilk	0,620	0,805	0,719	0,399	0,422	0,811
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002
Media	6,73	2,68	2,58	1,02	1,19	1,22
DE	10,31	3,20	3,82	2,85	3,07	1,48
Mediana	3,12	2,29	0	0	0,12	0,62
RI	1,18-8,11	0-3,90	0-4,42	0-1,20	0-1,11	0-2,45

Tabla 19. Niveles de OPN antes y después del trasplante: al mes, 6 meses, al año, 2 años y 3 años post-trasplante. (OPN: osteopontina; TH: trasplante ortotópico de hígado).

Paciente	OPN (ng/mL) Pre-TOH	OPN (ng/mL) 1 mes post-TOH	OPN (ng/mL) 6 meses post-TOH	OPN (ng/mL) 1 año post-TOH	OPN (ng/mL) 2 años post-TOH	OPN (ng/mL) 3 años post-TOH
1	14,87	-	-	-	-	-
2	106,83	-	-	-	-	-
3	15,06	-	-	-	-	-
4	18,50	19,24	16,06	18,26	13,20	3,53
5	14,08	43,03	30,76	22,98	19,13	-
6	51,76	73,67	77,68	73,48	29,44	26,67
7	12,59	20,54	51,37	-	-	-
8	9,36	-	-	-	-	-
9	53,01	25,61	-	10,19	4,54	3,57
10	11,51	11,82	10,12	9,08	5,37	4,08
11	5,40	28,23	21,01	-	-	-
12	16,15	56,52	21,71	23,26	8,43	5,60
13	18,59	21,67	14,23	-	-	-
14	33,74	42,47	-	26,91	14,05	7,24
15	12,86	48,51	18,57	18,10	10,27	3,96
16	20,40	37,75	-	43,66	16,98	8,43
17	13,90	24,47	-	14,05	13,32	4,93
18	15,20	33,10	-	39,69	14,97	4,48
19	28,46	59,82	140,25	173,88	-	-
20	13,45	30,75	40,97	24,45	13,47	-
21	25,68	41,20	-	29,53	17,73	5,49
22	22,78	46,85	-	20,49	11,23	5,45
23	11,45	19	10,90	12,73	19,49	-
24	9,16	13,12	11,10	10,67	4,91	-
25	32,72	-	-	32,72	-	-
26	38,72	31,73	17,49	9,58	10,70	-

27	18,06	43,98	29,05	20	7,19	2,68
28	12,92	-	12,30	11,92	6,34	3,26
29	14,12	-	28,02	16,45	-	5,01
30	21,68	46,18	14,80	-	4,93	4,13
31	24,35	25,61	15,46	13,48	9,60	6,65
32	36,24	46,22	-	-	-	-
33	16,21	33,08	12,04	8,79	9,51	11,18
34	36,57	39,23	42,22	23,83	6,06	5,20
35	13,11	-	-	-	-	-
36	8,37	17,24	48,63	-	-	-
37	4,60	-	-	-	-	-
38	5,99	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
Shapiro-Wilk	0,797	0,985	0,760	0,655	0,694	0,680
p	0,019	0,986	0,007	<0,001	0,001	0,001
Media	22,88	39,07	26,99	23,14	11,01	7,51
DE	13,16	19,26	21,41	19,65	7,30	6,90
Mediana	18,06	39,23	18,57	18,26	9,51	5,20
RI	14,50-30,46	22,43-52,51	13,75-35,64	11,28-23,55	6,63-11,73	3,75-8,92

Tabla 20. Niveles de GPC3 antes y después del trasplante: al mes, 6 meses, al año, 2 años y 3 años post-trasplante. (GPC3: glipicano-3; TOH: trasplante ortotópico de hígado).

Paciente	GPC3 (ng/mL) Pre-TOH	GPC3 (ng/mL) 1 mes post-TOH	GPC3 (ng/mL) 6 meses post-TOH	GPC3 (ng/mL) 1 año post-TOH	GPC3 (ng/mL) 2 años post-TOH	GPC3 (ng/mL) 3 años post-TOH
1	4,35	-	-	-	-	-
2	7,99	-	-	-	-	-
3	6,30	-	-	-	-	-
4	14,13	12,16	9,27	10,07	9,05	1,12
5	2,48	7,59	10,32	6,10	9,71	-
6	17,78	25,84	26,91	26,24	10,53	3,47
7	4,85	3,33	4,14	-	-	-
8	16,47	-	-	-	-	-
9	3,65	7,05	-	3,30	3,57	1,36
10	13,05	9,46	16,28	7,25	3,98	1,82
11	13,83	5,81	7,43	-	-	-
12	13,56	14,82	17,75	11,71	13,86	1,40
13	7,86	6,95	6,12	-	-	-
14	18,13	22,55	-	20,50	2,20	1,40
15	23,45	21,98	25,43	37,05	31,18	16,13
16	5,75	13,73	-	7,42	1,15	2,68
17	4,87	6,03	-	4,46	6,24	1,84
18	1,30	10,55	-	7,16	3,21	0,54
19	5,29	10,89	9,24	5,40	-	-
20	6,21	11,19	5,92	7,76	9,50	1,22
21	34,57	13,49	-	11,77	5,01	1,34
22	16,77	19,46	-	8,59	1,27	0,78
23	8,82	6,85	8,42	6,95	0,80	-
24	4,49	5,57	5,53	2,77	1,07	-
25	2,86	-	-	-	-	-
26	1,74	1,93	1,52	1,49	2,09	-

27	2,07	9,71	10,36	11,79	1,18	0,55
28	23,73	-	22,46	23,59	3,99	4,53
29	44,59	-	42,65	43,13	1,25	-
30	31,89	7,65	0,86	0,99	0,70	-
31	5,23	5,92	6,90	1,47	0,71	0,68
32	5,36	6,95	-	-	-	-
33	12,44	7,50	3,93	2,59	2,75	1,51
34	40,03	15,78	18,64	1,32	2,19	1,22
35	5,92	-	-	-	-	-
36	3,40	7,40	8,99	-	-	-
37	1,71	-	1,97	-	-	-
38	1,91	-	2,94	-	-	-
39	1,61	-	-	-	-	-
40	1,45	-	-	-	-	-
41	2,10	-	-	-	-	-
42	1,83	-	-	-	-	-
43	2,02	-	-	-	-	-
44	1,04	-	-	-	-	-
45	4,39	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
Shapiro-Wilk	0,878	0,915	0,927	0,823	0,792	0,505
p	0,123	0,320	0,419	0,027	0,012	<0,001
Media	14,80	13,42	14,14	11,73	8,49	2,91
DE	10,84	6,35	8,10	11,49	9,17	4,71
Mediana	13,31	11,67	13,32	8,92	6,52	1,31
RI	5,97-19,19	8,97-17,33	6,66-20,34	2,31-15,40	1,94-11,36	1,01-2,23

Tabla 21. Niveles de MMP-1 antes y después del trasplante: al mes, 6 meses, al año, 2 años y 3 años post-trasplante. (MMP-1: metaloproteasa-1; TOH: trasplante ortotópico de hígado).

Paciente	MMP-1 (ng/mL) Pre-TOH	MMP-1 (ng/mL) 1 mes post-TOH	MMP-1 (ng/mL) 6 meses post-TOH	MMP-1 (ng/mL) 1 año post-TOH	MMP-1 (ng/mL) 2 años post-TOH	MMP-1 (ng/mL) 3 años post-TOH
1	1,92	-	-	-	-	-
2	5,19	-	-	-	-	-
3	1,22	-	-	-	-	-
4	1,07	0,89	0,86	0,84	0,83	2,04
5	1,82	1,39	3,71	1,34	1,51	-
6	1,18	1,50	1,49	1,52	1,59	2,71
7	1,35	1,29	5,54	-	-	-
8	3,41	-	-	-	-	-
9	1,72	1,31	-	1,27	1,27	2,09
10	1,48	1,29	1,32	1,26	1,26	2,18
11	1,26	1,27	1,32	-	-	-
12	1,26	1,23	1,23	1,27	1,48	2,10
13	9,24	1,74	2,24	-	-	-
14	2,15	1,27	-	1,27	2,45	2,60
15	1,58	1,36	1,32	1,32	1,36	2,21
16	1,54	1,21	-	1,16	0,82	2,09
17	1,47	1,28	-	1,29	1,26	2,14
18	2,28	1,33	-	1,28	1,03	2,06
19	1,64	1,27	4,48	5,33	-	-
20	1,61	1,26	1,24	1,54	1,22	4,46
21	1,64	1,21	-	1,39	0,86	3,19
22	1,84	1,27	-	1,35	5,57	4,17
23	1,41	1,27	1,32	0,86	2,29	-
24	1,52	1,44	1,38	1,30	2,10	-
25	1,99	-	-	-	-	-
26	1,03	2,49	2,33	2,33	2,20	-

27	1,46	1,21	1,22	1,22	2,06	2,06
28	2,65	-	0,87	0,85	2,23	2,29
29	1,13	-	0,85	0,84	-	2,08
30	0,90	0,90	0,95	2,39	-	2,41
31	1,26	1,08	1	3,06	3,06	3,11
32	4,36	0,85	-	-	-	-
33	0,91	0,79	10,52	11,90	10,62	11,72
34	1,15	0,81	0,80	2,04	2,04	2,05
35	2,65	-	-	-	-	-
36	1	0,88	0,83	-	-	-
37	2,07	-	2,08	-	-	-
38	2,06	-	2,09	-	-	-
39	2,07	-	-	-	-	-
40	2,12	-	-	-	-	-
41	2,07	-	-	-	-	-
42	2,05	-	-	-	-	-
43	2,02	-	-	-	-	-
44	2,12	-	-	-	-	-
45	10,13	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
Shapiro-Wilk	0,951	0,925	0,434	0,515	0,554	0,546
p	0,675	0,398	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Media	1,30	1,14	2,10	2,60	2,55	3,46
DE	0,23	0,24	2,96	3,33	2,90	3
Mediana	1,26	1,22	1,23	1,42	1,53	2,19
RI	1,13-1,51	0,87-1,30	0,97-1,36	1,25-2,29	1,25-2,31	2,06-3,45

Tabla 22. Niveles de AFP antes y después del trasplante: al mes, 6 meses, al año, 2 años y 3 años post-trasplante. (AFP: alfa-fetoproteína; TOH: trasplante ortotópico de hígado).

Paciente	AFP (ng/mL) Pre-TOH	AFP (ng/mL) 1 mes post-TOH	AFP (ng/mL) 6 meses post-TOH	AFP (ng/mL) 1 año post-TOH	AFP (ng/mL) 2 años post-TOH	AFP (ng/mL) 3 años post-TOH
1	21	-	-	-	-	-
2	2025	-	-	-	-	-
3	10	-	-	-	-	-
4	5	1	1	1	1	1
5	15	4	35	4	5	-
6	2	4	5	4	5	5
7	3	4	93	-	-	-
8	31	-	-	-	-	-
9	6	1	-	2	3	2
10	3	2	2	2	2	2
11	1	1	2	-	-	-
12	2	1	2	2	5	2
13	253	9	17	-	-	-
14	14	2	-	2	3	3
15	6	2	2	3	4	3
16	4	2	-	1	1	1
17	4	1	-	2	2	2
18	21	4	-	4	5	6
19	11	2	108	163	-	-
20	7	1	1	1	1	1
21	7	2	-	5	2	2
22	11	2	-	4	5	5
23	4	1	2	2	3	-
24	5	3	2	2	2	-
25	3638	-	-	-	-	-
26	4	2	2	2	1,9	-

27	5	2	2	1	2	2
28	25	-	2	1	2	1,6
29	7	-	2	2	-	1,6
30	3	3	4	-	3	3,8
31	7	4	6	7	5	5,7
32	63	1	-	-	-	-
33	3	1	1	1	1	0,9
34	6	1	1	2	2	3
35	4412	-	-	-	-	-
36	7	2	2	-	-	-
37	8,3	-	3,8	-	-	-
38	4,5	-	5,3	-	-	-
39	808,9	-	-	-	-	-
40	152,8	-	-	-	-	-
41	2,1	-	-	-	-	-
42	11,1	-	-	-	-	-
43	3,9	-	-	-	-	-
44	1,4	-	-	-	-	-
45	2,3	-	-	-	-	-
46	3,7	-	-	-	-	-
Shapiro-Wilk	0,887	0,738	0,728	0,766	0,805	0,862
p	0,158	0,003	0,002	0,006	0,017	0,081
Media	4,6	1,9	2,3	2,4	2,8	2,56
DE	1,96	1,20	1,77	1,90	1,75	1,66
Mediana	5	1,5	2	2	2	2
RI	2,75-6,25	1-2,5	1-2,75	1-3,25	1-5	1-3,5

4.3 ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE PIVKA-II Y LOS PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS ANTES DEL TRASPLANTE

Como se puede observar en la tabla 23, al estudiar la asociación entre los niveles de PIVKA-II pre-trasplante y las variables demográficas y clínicas cuantitativas (edad, número de LOES, tamaño tumoral, escala MELD y número de TACES) mediante el test de correlación Rho de Spearman, se obtuvo una correlación positiva estadísticamente significativa con el tamaño tumoral y con el nº de TACES pre-trasplante ($p < 0,05$).

Tabla 23. Test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación entre los niveles pre-trasplante de PIVKA-II y las variables demográficas y clínicas incluidas en el estudio. (PIVKA-II: proteína inducida por la ausencia de vitamina K o antagonista-II; LOES: lesiones ocupantes de espacio; MELD: *Model For End-Stage Liver Disease*; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

	PIVKA-II	Edad (años)	Nº de LOES	Tamaño tumoral (cm)	Escala MELD	Nº de TACES
Mediana	84	60	2	2,6	9	1
RI	37-382	55-63	1-3	2-4,6	8-12	1-2
Rho de Spearman		0,100	0,174	0,423	-0,020	0,372
p		0,508	0,248	0,003	0,900	0,011

Al aplicar el test U de Mann Whitney para estudiar la asociación de los niveles pre-trasplante de PIVKA-II con las variables demográficas y clínicas cualitativas dicotómicas (sexo, necrosis tumoral, invasión vascular, recidiva y éxitus) y con las variables clínicas cuantitativas categorizadas (edad, número de LOES, tamaño tumoral y número de TACES) (tabla 24), observamos que únicamente existían diferencias estadísticamente significativas en los niveles de PIVKA-II pre-trasplante entre los pacientes con tamaño tumoral ≤ 3 cm y > 3 cm ($p < 0,05$), de forma que los pacientes con tamaño tumoral > 3 cm presentaban niveles de PIVKA-II significativamente mayores a los pacientes con un tamaño tumoral ≤ 3 cm [372,50 mAU/mL (RI 45,25-1422) frente a 74,50 mAU/mL (RI 37,50-155)].

Tabla 24. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de PIVKA-II con variables clínicas cualitativas dicotómicas y con las variables clínicas cuantitativas categorizadas mediante el test U de Mann Whitney. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; LOES: lesiones ocupantes de espacio; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de PIVKA-II	U de Mann Whitney	p
Sexo n=46	Masculino	41	84 (RI 36,50-446,50)	99,5	0,916
	Femenino	5	168 (RI 39,50-248,50)		
Edad n=46	<60	24	78,50 (RI 37-227,25)	221	0,344
	≥60	22	136 (RI 38,50-622,25)		
Nº de LOES n=46	1	23	84 (RI 40-183)	230	0,448
	>1	23	116 (RI 36-596)		
Tamaño tumoral n=46	≤3 cm	33	74,50 (RI 37,50-155)	92	0,003
	>3 cm	13	372,50 (RI 45,25-1422)		
TACES Pre-TOH n=46	Sí	31	138 (RI 39-571)	188	0,297
	No	15	71 (RI 36-177)		
Necrosis tumoral n=36	Sí	22	74,50 (38,25-285,25)	139,5	0,64
	No	14	68,50 (27,50-188,75)		
Invasión vascular n=31	Sí	4	51,50 (RI 21-563,50)	45,5	0,62
	No	27	71 (RI 34-244)		
Recidiva n=35	Sí	4	333,50 (RI 32-692,75)	48	0,468
	No	31	71 (RI 34-244)		
Éxito Post-TOH n=35	Sí	7	156 (RI 39-725)	65,5	0,194
	No	28	69 (RI 29,50-228,75)		

Al estudiar la posible asociación de los niveles pre-trasplante de PIVKA-II con las variables cualitativas policotómicas (etiología y puntuación Child-Pugh) mediante el test de Kruskal-Wallis (tablas 25 y 26), no se obtuvo ninguna diferencia estadísticamente significativa en los niveles de PIVKA-II entre los diferentes grupos de pacientes ($p > 0,05$).

Tabla 25. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de PIVKA-II con la variable etiología mediante el test de Kruskal-Wallis. (ALCH: alcoholismo; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HEMO: hemocromatosis; Fe: sobrecarga férrica; CRIPTO: criptogénica; PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II).

Etiología	Nº de pacientes	Niveles medianos de PIVKA-II (mAU/mL)	X ²	p
ALCH	12	64,50 (RI 39,25-249,75)	15,288	0,083
VHB	1	34		
VHC	16	73 (RI 30-227,25)		
VHB+VHC	1	725		
VHB+ALCH	1	1479		
VHC+ALCH	8	103,50 (RI 72,75-311,25)		
EHNA	2	6232		
HEMO	1	588		
VHC+ALCH+Fe	1	571		
CRIPTO	3	26		
VIRAL	18	73 (RI 32,50-246,25)	2,059	0,357
NO VIRAL	18	77,50 (RI 38,50-414,25)		
MIXTA	10	136 (RI 76,25-798)		

Tabla 26. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de PIVKA-II con la variable CHILD-PUGH mediante el test de Kruskal-Wallis. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II).

CHILD-PUGH	Nº de pacientes	Niveles medianos de PIVKA-II (mAU/mL)	X ²	p
A	20	127 (RI 55,75-330,75)	2,427	0,297
B	9	71 (RI 38-235)		
C	3	363		

4.4 ASOCIACIÓN ENTRE PIVKA-II Y LOS PARÁMETROS DE LABORATORIO PRE-TRASPLANTE: BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS Y COAGULOMÉTRICOS

Al estudiar la asociación entre PIVKA-II y los parámetros de laboratorio pre-trasplante (bioquímicos, hematológicos y coagulométricos) mediante el test no paramétrico Rho de Spearman (tabla 27), se obtuvo una correlación positiva estadísticamente significativa con los niveles pre-trasplante de PCR, LDH y fosfatasa alcalina ($p < 0,05$).

Tabla 27. Estudio de correlación de los niveles de PIVKA-II con los parámetros de laboratorio antes del trasplante mediante el test Rho de Spearman. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; LEUCOS: leucocitos; PLAQ: plaquetas; RNL: ratio neutrófilos-linfocitos; RPL: ratio plaquetas-linfocitos; PCR: proteína C reactiva; AFP: alfa-fetoproteína; TP: tiempo de protrombina; INR: razón internacional normalizada; ALB: albúmina; FERRIT: ferritina; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; GOT: transaminasa glutámico oxalacética; GPT: transaminasa glutámico pirúvica; GGT: gamma glutamil transferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; BT: bilirrubina total; ALP: fosfatasa alcalina).

	Mediana	RI	Rho Spearman	p
PIVKA-II (mAU/mL)	84	37-382		
LEUCOS ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4,40	3,89-5,30	0,042	0,783
PLAQ ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	79,70	62-116	0,065	0,666
RNL	1,97	1,45-2,60	-0,058	0,702
RPL	70,69	47,06-90	0,067	0,658
PCR (mg/dL)	0,45	0,12-0,68	0,350	0,023
AFP (ng/mL)	6	3,9-15	0,273	0,067
TP (seg)	13,20	12,10-14,90	0,036	0,818
INR	1,18	1,10-1,36	-0,020	0,896
ALB (g/dL)	3,60	3,20-4,35	-0,122	0,431
FERRIT (ng/mL)	151	54,50-227,50	0,189	0,219
CT (mg/dL)	167	117,50-195	-0,201	0,185
TG (mg/dL)	84	63-126,50	-0,124	0,416
GOT (U/L)	36	29,50-59	0,273	0,070
GPT (U/L)	27	20,50-38,50	0,202	0,183
GGT (U/L)	92	43-175,50	0,250	0,094
LDH (U/L)	216	174-232,50	0,337	0,034
BT (mg/dL)	0,88	0,52-2,15	0,141	0,351
ALP (UI/L)	127	92-178,50	0,432	0,017

Tras comparar los niveles medianos de PIVKA-II entre los pacientes con valores dentro del rango de referencia y aquellos que presentaban valores fuera del rango de referencia de los parámetros de laboratorio pre-trasplante estudiados, mediante el test U de Mann Whitney, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de PIVKA-II entre los pacientes con niveles normales y elevados de LDH ($p < 0,05$), de forma que los pacientes con niveles de LDH ≤ 225 U/L presentaban menores niveles de PIVKA-II [78 U/L (RI 37-168)] que los pacientes con niveles de LDH > 225 U/L [571 U/L (RI 138,50-6232)] (tabla 28).

Tabla 28. Comparación de los niveles medianos de PIVKA-II antes del trasplante entre grupos de pacientes con valores normales y elevados de parámetros hematológicos, coagulométricos y bioquímicos. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; LEUCOS: leucocitos; PLAQ: plaquetas; RNL: ratio neutrófilos-linfocitos; RPL: ratio plaquetas-linfocitos; PCR: proteína C reactiva; AFP: alfa-fetoproteína; TP: tiempo de protrombina; INR: razón internacional normalizada; ALB: albúmina; FERRIT: ferritina; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; GOT: transaminasa glutámico oxalacética; GPT: transaminasa glutámico pirúvica; GGT: gamma glutamil transferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; BT: bilirrubina total; ALP: fosfatasa alcalina).

Parámetro	Niveles	n	Niveles medianos de PIVKA-II (mAU/mL)	U de Mann Whitney	p
LEUCOS ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$< 4,50$	24	114,50 (RI 29,50-344)	240,50	0,605
	$\geq 4,50$	22	81,50 (RI 46,50-414,25)		
PLAQ ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	≥ 150	9	168 (RI 53-1613)	139	0,446
	< 150	37	84 (36,50-372)		
RNL	$\leq 3,13$	38	100 (RI 39,75-367,75)	107	0,192
	$> 3,13$	8	59,50 (RI 19,25-467,25)		
TP (seg)	$\leq 12,5$	16	75 (RI 36,75-639,25)	211	0,9
	$> 12,5$	27	91 (RI 37-363)		
INR	$\leq 1,20$	25	79 (RI 37,50-583,50)	208	0,676
	$> 1,20$	18	87,50 (33,75-280,50)		
AFP (ng/mL)	≤ 11	32	74,50 (RI 37,50-181,50)	150	0,077
	> 11	14	325 (RI 45,75-1797,75)		
PCR (mg/dL)	$\leq 0,50$	25	71 (RI 38-172,50)	152,50	0,124
	$> 0,50$	17	183 (RI 46,50-592)		
ALB (g/dL)	$\leq 5,2$	44	87,50 (RI 37,50-377,25)	-	-
	$> 5,2$	0	-		
FERRIT (ng/mL)	≤ 400	39	79 (RI 37-287)	90,50	0,796
	> 400	5	84 (RI 37,50-553,50)		
CT (mg/dL)	≤ 190	35	91 (RI 40-571)	121,50	0,144
	> 190	10	53 (RI 24-221,50)		
TG (mg/dL)	≤ 150	39	84 (RI 39-382)	104,50	0,676
	> 150	6	102 (RI 25,50-5302,25)		
GOT (U/L)	≤ 40	24	71 (RI 39,25-155)	181	0,106
	> 40	21	253 (RI 32-660,50)		
GPT (U/L)	≤ 41	33	84 (RI 44,50-270)	187	0,778
	> 41	12	149,50 (RI 34,50-594)		

GGT (U/L)	≤71	18	87,50 (RI 35,50-246,25)	223	0,643
	>71	27	71 (RI 39-571)		
LDH (U/L)	≤225	31	78 (RI 37-168)	73	0,031
	>225	9	571 (RI 138,50-6232)		
BT (mg/dL)	≤1,20	31	71 (RI 39-183)	172,50	0,160
	>1,20	15	253 (RI 36-588)		
ALP (UI/L)	≤130	14	56,50 (RI 38,50-170,25)	65	0,051
	>130	16	218 (RI 72,75-556)		

4.5 ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 Y AFP CON LOS PARÁMETROS CLINICOPATOLÓGICOS PRE-TRASPLANTE

Como se puede observar en la tabla 29, al estudiar la asociación entre los niveles de los marcadores pre-trasplante con las variables clinicopatológicas: edad, nº de LOES, tamaño tumoral, escala MELD, nº de TACES, se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de IL-6 y la escala MELD ($p < 0,05$).

Tabla 29. Asociación de los niveles pre-trasplante de los marcadores IL-6, IL-8, OPN, GPC3 y MMP-1 con las variables demográficas y clínicas cuantitativas de los pacientes mediante el test de correlación Rho de Spearman. (IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glicipano-3; MMP-1: metaloproteasa-1; LOES: lesiones ocupantes de espacio; MELD: Model for End-Stage Liver Disease; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

	Edad	Nº de LOES	Tamaño tumoral	Escala MELD	Nº de TACES
IL-6 (pg/mL)	0,04 $p=0,980$	0,106 $p=0,538$	0,185 $p=0,279$	0,442 $p=0,008$	0,180 $p=0,294$
IL-8 (pg/mL)	0,049 $p=0,770$	0,041 $p=0,806$	0,284 $p=0,084$	-0,016 $p=0,927$	0,305 $p=0,063$
OPN (ng/mL)	-0,172 $p=0,301$	-0,059 $p=0,726$	0,040 $P=0,813$	0,306 $p=0,066$	0,128 $p=0,445$
GPC3 (ng/mL)	0,057 $p=0,709$	-0,144 $p=0,345$	-0,116 $p=0,450$	-0,149 $p=0,393$	-0,111 $p=0,466$
MMP-1 (ng/mL)	0,017 $p=0,912$	0,188 $p=0,217$	-0,018 $p=0,905$	0,029 $p=0,885$	-0,241 $p=0,111$
AFP (ng/mL)	0,135 $p=0,372$	0,206 $p=0,169$	0,189 $p=0,208$	0,075 $p=0,633$	0,130 $p=0,391$

Al realizar el estudio de asociación de los marcadores pre-trasplante (IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 y AFP) con las variables clínicas cualitativas (sexo, presencia o ausencia de necrosis tumoral, invasión vascular, recidiva o metástasis y éxitus post-trasplante) y con las variables clínicas cuantitativas categorizadas (edad, nº de LOES, tamaño tumoral y nº de TACES pre-trasplante), mediante el test U de Mann Whitney (tablas 30, 31, 32, 33, 34 y 35, respectivamente), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-8 pre-trasplante con el tamaño tumoral (tabla 31), de forma que aquellos pacientes con un tamaño tumoral >3 cm, presentaban mayores niveles medianos de IL-8 que los pacientes con un tamaño tumoral ≤3 cm [3,63 pg/mL (RI 1,37-13,83) frente a 2,91 pg/mL (RI 0,16-7,69)]. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MMP-1, entre los pacientes que habían recibido TACEs pre-trasplante y aquellos que no habían recibido este tratamiento, presentando los pacientes tratados con TACE niveles significativamente menores de MMP-1 que los que no habían sido sometidos a este tratamiento [1,52 ng/mL (RI 1,26-2,06) frente a 2,06 ng/mL (RI 1,79-2,84)]. Por último, se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de AFP con el tamaño tumoral (tabla 35), de forma que los pacientes con un tamaño tumoral >3 cm, presentaban mayores niveles medianos de AFP pre-trasplante que los pacientes con un tamaño tumoral ≤3 cm [8,5 ng/mL (RI 4,8-39) frente a 5,5 ng/mL (RI 3-11,08)].

Tabla 30. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de IL-6 con variables clínicas cualitativas dicotómicas y con las variables clínicas cuantitativas categorizadas mediante el test U de Mann Whitney. (IL-6: interleucina-6; LOES: lesiones ocupantes de espacio; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de IL-6 (pg/mL)	U de Mann Whitney	p
Sexo n=36	Masculino	32	9,66 (RI 6,07-15,26)	39	0,208
	Femenino	4	17,81 (RI 8,13-36,25)		
Edad n=36	<60	18	9,66 (RI 6,66-17,84)	147	0,635
	≥60	18	9,69 (RI 5,78-14,59)		
Nº de LOES n=36	1	17	8,99 (RI 5,64-17,73)	157	0,887
	>1	19	10,03 (RI 6,83-14,26)		
Tamaño tumoral n=36	≤3 cm	24	8,39 (RI 6,05-15,59)	123	0,481
	>3 cm	12	11 (RI 7,18-17,84)		
TACES pre-TOH n=36	Sí	27	10,39 (RI 7,50-15,59)	92	0,281
	No	9	6,12 (RI 4,64-17,73)		
Necrosis tumoral n=30	Sí	21	9,28 (RI 6,85-14,30)	87	0,734
	No	9	8,99 (RI 5,21-16,02)		

Invasión vascular n=29	Sí	3	14,26	26	0,352
	No	26	8,69 (RI 5,93-12,37)		
Recidiva n=30	Sí	4	7,92 (RI 6,41-12,78)	44	0,625
	No	26	9,66 (RI 5,98-16,14)		
Éxito post-TOH n=30	Sí	7	11,95 (RI 7,50-13,01)	72	0,677
	No	23	8,99 (RI 5,55-17,78)		

Tabla 31. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de IL-8 con variables clínicas cualitativas dicotómicas y con las variables clínicas cuantitativas categorizadas mediante el test U de Mann Whitney. (IL-8: interleucina-8; LOES: lesiones ocupantes de espacio; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de IL-8 (pg/mL)	U de Mann Whitney	p
Sexo n=38	Masculino	34	2,97 (RI 1,11-8,59)	43	0,234
	Femenino	4	5,98 (RI 3,25-12,12)		
Edad n=38	<60	19	2,91 (RI 0,39-8,10)	146	0,313
	≥60	19	4,21 (RI 1,99-9,83)		
Nº de LOES n=38	1	18	4,28 (RI 0,31-10,49)	167	0,704
	>1	20	3,04 (RI 1,53-9,37)		
Tamaño tumoral n=38	≤3 cm	26	2,91 (RI 0,16-7,69)	89	0,035
	>3 cm	12	3,63 (RI 1,37-13,83)		
TACES pre-TOH n=38	Sí	29	3,55 (RI 1,84-12,24)	86	0,126
	No	9	2,70 (RI 0,08-4,79)		
Necrosis tumoral n=32	Sí	22	3,23 (RI 0,81-8,11)	88	0,370
	No	10	2,42 (RI 0,39-3,97)		
Invasión vascular n=29	Sí	3	9,37	24	0,282
	No	26	2,83 (RI 0,39-4,99)		
Recidiva n=32	Sí	4	1,69 (RI 0,30-3,26)	36	0,254
	No	28	2,97 (RI 0,92-8,11)		
Éxito post-TOH n=32	Sí	7	2,76 (RI 0,46-7,69)	82	0,802
	No	25	2,91 (RI 1,22-3,63)		

Tabla 32. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de OPN con variables clínicas cualitativas dicotómicas y con las variables clínicas cuantitativas categorizadas mediante el test U de Mann Whitney. (OPN: osteopontina; LOES: lesiones ocupantes de espacio; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de OPN (ng/mL)	U de Mann Whitney	p
Sexo n=38	Masculino	34	15,67 (RI 12,87-31,65)	57	0,601
	Femenino	4	19,50 (RI 14,14-23,96)		
Edad n=38	<60	19	18,28 (RI 14,67-27,32)	138	0,215
	≥60	19	14,01 (RI 10,97-29,53)		
Nº de LOES n=38	1	18	16,21 (RI 14,01-30,46)	143	0,279
	>1	20	15,20 (RI 11,45-28,46)		
Tamaño tumoral n=38	≤3 cm	26	16,21 (RI 12,92-25,68)	138	0,572
	>3 cm	12	15,06 (RI 12,98-30,59)		
TACES pre-TOH n=38	Sí	29	16,15 (RI 12,04-33,23)	130	0,986
	No	9	15,20 (RI 13,52-22,23)		
Necrosis tumoral n=32	Sí	22	16,18 (RI 12,79-27,32)	98	0,626
	No	10	16,20 (RI 10,13-26,37)		
Invasión vascular n=29	Sí	3	28,46	16	0,100
	No	26	15,67 (RI 12,79-23,17)		
Recidiva n=32	Sí	4	15,59 (RI 11,74-26)	50	0,732
	No	28	17,13 (RI 13,31-27,69)		
Éxito Post-TOH n=32	Sí	7	12,59 (RI 8,37-28,46)	66	0,327
	No	25	18,06 (RI 13,90-25,68)		

Tabla 33. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de GPC3 con variables clínicas cualitativas dicotómicas y con las variables clínicas cuantitativas categorizadas mediante el test U de Mann Whitney. (GPC3: glipicano-3; LOES: lesiones ocupantes de espacio; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de GPC3 (ng/mL)	U de Mann Whitney	p
Sexo n=45	Masculino	40	7,08 (RI 4,39-17,45)	83	0,539
	Femenino	5	9,33 (RI 5,47-15,69)		
Edad n=45	<60	23	6,61 (RI 3,35-13,70)	199	0,220
	≥60	22	9,67 (RI 5,18-19,46)		
Nº de LOES n=45	1	22	12,44 (RI 5,05-23,59)	216	0,401
	>1	23	5,75 (RI 3,40-13,83)		
Tamaño tumoral n=45	≤3 cm	33	13,56 (RI 5,75-18,13)	187	0,778
	>3 cm	12	5,29 (RI 4-8,41)		

TACES pre-TOH n=45	Sí	31	5,36 (RI 2,86-13,05)	204	0,750
	No	14	6,12 (RI 1,97-25,77)		
Necrosis tumoral n=36	Sí	22	5,55 (RI 3,17-14,36)	146	0,795
	No	14	9,17 (RI 2-19,53)		
Invasión vascular n=31	Sí	4	5,52 (RI 2,84-15,03)	43	0,517
	No	27	8,82 (RI 4,49-17,78)		
Recidiva n=35	Sí	4	6,57 (RI 4,96-8,58)	60	0,917
	No	31	12,75 (RI 4,28-19,46)		
Éxito post-TOH n=35	Sí	7	5,36 (RI 4,85-8,82)	94	0,869
	No	28	13,05 (RI 4,49-23,45)		

Tabla 34. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de MMP-1 con variables clínicas cualitativas dicotómicas y con las variables clínicas cuantitativas categorizadas mediante el test U de Mann Whitney. (MMMP-1: metaloproteasa-1; LOES: lesiones ocupantes de espacio; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de MMP-1 (ng/mL)	U de Mann Whitney	p
Sexo n=45	Masculino	40	1,53 (RI 1,23-2,11)	91	0,745
	Femenino	5	1,44 (RI 1-1,78)		
Edad n=45	<60	23	1,59 (RI 1,21-2,37)	221	0,467
	≥60	22	1,53 (RI 1,21-1,73)		
Nº de LOES n=45	1	22	1,26 (RI 1,14-1,78)	202	0,247
	>1	23	1,64 (RI 1,41-2,28)		
Tamaño tumoral n=45	≤3 cm	33	1,35 (RI 1,13-1,84)	150	0,218
	>3 cm	12	1,64 (RI 1,43-2,32)		
TACES pre-TOH n=45	Sí	31	1,52 (RI 1,26-2,06)	120	0,017
	No	14	2,06 (RI 1,79-2,84)		
Necrosis tumoral n=36	Sí	22	1,49 (RI 1,17-1,83)	115	0,206
	No	14	1,83 (RI 1,42-2,07)		
Invasión vascular n=31	Sí	4	1,83 (RI 1,56-2,12)	29	0,141
	No	27	1,47 (RI 1,18-1,82)		
Recidiva n=35	Sí	4	1,52 (RI 1,36-7,34)	53	0,641
	No	31	1,48 (RI 1,14-1,75)		
Éxito post-TOH n=35	Sí	7	1,41 (RI 1,15-1,72)	96	0,934
	No	28	1,48 (RI 1,26-4,36)		

Tabla 35. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de AFP con variables clínicas cualitativas dicotómicas y con las variables clínicas cuantitativas categorizadas mediante el test U de Mann Whitney. (AFP: alfa-fetoproteína; LOES: lesiones ocupantes de espacio; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de AFP (ng/mL)	U de Mann Whitney	p
Sexo n=46	Masculino	41	6 (RI 3,95-21)	83	0,491
	Femenino	5	7 (RI 2,65-9)		
Edad n=46	<60	24	5,5 (RI 3,18-21)	251,50	0,783
	≥60	22	7 (RI 4-11,83)		
Nº de LOES n=46	1	23	6 (RI 3-11)	221	0,338
	>1	23	7 (RI 4-31)		
Tamaño tumoral n=46	≤3 cm	33	5,5 (RI 3-11,08)	109	0,010
	>3 cm	13	8,5 (RI 4,8-39)		
TACES pre-TOH n=46	Sí	31	6 (RI 4-14)	232	0,991
	No	15	7 (RI 3-21)		
Necrosis tumoral n=36	Sí	22	6 (RI 4-8,98)	115	0,206
	No	14	4,75 (RI 3-11,83)		
Invasión vascular n=31	Sí	4	7,5 (RI 3,93-13,25)	29	0,141
	No	27	6 (RI 3-7)		
Recidiva n=35	Sí	4	7,5 (RI 3,25-192,5)	56,50	0,775
	No	31	6 (RI 4-11)		
Éxito post-TOH n=35	Sí	7	7 (RI 3-63)	90,50	0,756
	No	28	6 (RI 4-10,33)		

Tras realizar el estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 y AFP con la variable etiología de la cirrosis mediante el test de Kruskal-Wallis (tablas 36-41, respectivamente), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de pacientes en ningún biomarcador analizado ($p>0,05$).

Tabla 36. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de IL-6 con la variable etiología mediante el test de Kruskal-Wallis. (ALCH: alcoholismo; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HEMO: hemocromatosis; Fe: sobrecarga férrica; CRIPTO: criptogénica; IL-6: interleucina-6).

Etiología	Nº de pacientes	Niveles medianos de IL-6 (pg/mL)	X ²	p
ALCH	12	8,04 (RI 4,41-15,59)	8,121	0,522
VHB	1	-		
VHC	16	8,36 (RI 7,50-26,77)		
VHB+VHC	1	-		
VHB+ALCH	1	-		
VHC+ALCH	8	17,78 (7,50-26,77)		
EHNA	2	12,78		
HEMO	1	-		
VHC+ALCH+Fe	1	-		
CRIPTO	3	8,99		
VIRAL	18	8,36 (RI 5,47-16,06)	1,315	0,518
NO VIRAL	18	10,39 (RI 6,85-14,30)		
MIXTA	10	12,16 (RI 7,91-22,39)		

Tabla 37. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de IL-8 con la variable etiología mediante el test de Kruskal-Wallis. (ALCH: alcoholismo; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HEMO: hemocromatosis; Fe: sobrecarga férrica; CRIPTO: criptogénica; IL-8: interleucina-8).

Etiología	Nº de pacientes	Niveles medianos de IL-8 (pg/mL)	X ²	p
ALCH	12	4,89 (RI 2,87-12,54)	5,329	0,805
VHB	1	-		
VHC	16	2,81 (RI 0,54-5,99)		
VHB+VHC	1	-		
VHB+ALCH	1	-		
VHC+ALCH	8	3,33 (RI 0,04-14,25)		
EHNA	2	9,85		
HEMO	1	-		
VHC+ALCH+Fe	1	-		
CRIPTO	3	2,14		
VIRAL	18	2,48 (RI 0,35-5,43)	1,746	0,418
NO VIRAL	18	3,99 (RI 1,99-10,43)		
MIXTA	10	3,33 (RI 0,12-13,78)		

Tabla 38. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de OPN con la variable etiología mediante el test de Kruskal-Wallis. (ALCH: alcoholismo; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HEMO: hemocromatosis; Fe: sobrecarga férrica; CRIPTO: criptogénica; OPN: osteopontina).

Etiología	Nº de pacientes	Niveles medianos de OPN (ng/mL)	X ²	p
ALCH	12	14,49 (RI 9,49-19,35)	6	0,740
VHB	1	-		
VHC	16	18,54 (RI 13,88-25,35)		
VHB+VHC	1	-		
VHB+ALCH	1	-		
VHC+ALCH	8	12,21 (RI 6,91-33,48)		
EHNA	2	24,68		
HEMO	1	-		
VHC+ALCH+Fe	1	-		
CRIPTO	3	18,06		
VIRAL	18	20,14 (RI 14,76-26,37)	2,709	0,258
NO VIRAL	18	14,49 (RI 11,93-24,36)		
MIXTA	10	13,50 (RI 9,94-32,97)		

Tabla 39. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de GPC3 con la variable etiología mediante el test de Kruskal-Wallis. (ALCH: alcoholismo; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HEMO: hemocromatosis; Fe: sobrecarga férrica; CRIPTO: criptogénica; GPC3: glipicano-3).

Etiología	Nº de pacientes	Niveles medianos de GPC3 (ng/mL)	X ²	p
ALCH	12	3,88 (RI 1,85-20,70)	4,671	0,862
VHB	1	-		
VHC	16	5,23 (RI 2,02-14,13)		
VHB+VHC	1	-		
VHB+ALCH	1	-		
VHC+ALCH	8	10,93 (4,14-17,05)		
EHNA	2	5,64		
HEMO	1	-		
VHC+ALCH+Fe	1	-		
CRIPTO	3	4,87		
VIRAL	18	5,29 (RI 2,83-15,30)	0,945	0,624
NO VIRAL	18	4,68 (RI 2,03-13,77)		
MIXTA	10	8,41 (RI 2,76-14,90)		

Tabla 40. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de MMP-1 con la variable etiología mediante el test de Kruskal-Wallis. (ALCH: alcoholismo; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HEMO: hemocromatosis; Fe: sobrecarga férrica; CRIPTO: criptogénica; MMP-1: metaloproteasa-1).

Etiología	Nº de pacientes	Niveles medianos de MMP-1 (ng/mL)	X ²	p
ALCH	12	1,75 (RI 1,13-2,07)	11,072	0,271
VHB	1	-		
VHC	16	1,72 (RI 1,26-2,28)		
VHB+VHC	1	-		
VHB+ALCH	1	-		
VHC+ALCH	8	2,03 (RI 1,42-2,53)		
EHNA	2	3,50		
HEMO	1	-		
VHC+ALCH+Fe	1	-		
CRIPTO	3	1,46		
VIRAL	18	1,64 (RI 1,26-1,20)	0,646	0,724
NO VIRAL	18	1,56 (RI 1,17-2,07)		
MIXTA	10	1,90 (RI 1,37-2,28)		

Tabla 41. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de AFP con la variable etiología mediante el test de Kruskal-Wallis. (ALCH: alcoholismo; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HEMO: hemocromatosis; Fe: sobrecarga férrica; CRIPTO: criptogénica; AFP: alfa-fetoproteína).

Etiología	Nº de pacientes	Niveles medianos de AFP (ng/mL)	X ²	p
ALCH	12	6,5 (RI 4,13-18,53)	10,441	0,316
VHB	1	-		
VHC	16	5,5 (RI 3,18-10)		
VHB+VHC	1	-		
VHB+ALCH	1	-		
VHC+ALCH	8	11,15 (RI 3,25-1525)		
EHNA	2	2237,5		
HEMO	1	-		
VHC+ALCH+Fe	1	-		
CRIPTO	3	4		
VIRAL	18	5,5 (RI 3-11)	2,157	0,340
NO VIRAL	18	6 (RI 4-31,50)		
MIXTA	10	12 (RI 3,75-525)		

Tras estudiar la asociación de los niveles pre-trasplante de IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 y AFP con la variable puntuación Child-Pugh mediante el test de Kruskal-Wallis (tablas 42, 43, 44, 45, 46 y 47, respectivamente), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de pacientes Child-Pugh con los biomarcadores IL-6 y AFP ($p < 0,05$).

Tabla 42. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de IL-6 con la variable CHILD-PUGH mediante el test de Kruskal-Wallis. (IL-6: interleucina-6).

CHILD-PUGH	Nº de pacientes	Niveles medianos de IL-6 (pg/mL)	X ²	p
A	20	6,12 (RI 4,81-10,24)	6,132	0,047
B	9	9,39 (RI 5,27-19,97)		
C	3	17,78		

Tabla 43. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de IL-8 con la variable CHILD-PUGH mediante el test de Kruskal-Wallis. (IL-8: interleucina-8).

CHILD-PUGH	Nº de pacientes	Niveles medianos de IL-8 (pg/mL)	X ²	p
A	20	2,27 (RI 0,24-4,39)	3,877	0,144
B	9	5,80 (RI 4,76-19,35)		
C	3	15,27		

Tabla 44. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de OPN con la variable CHILD-PUGH mediante el test de Kruskal-Wallis. (OPN: osteopontina).

CHILD-PUGH	Nº de pacientes	Niveles medianos de OPN (ng/mL)	X ²	p
A	20	16,15 (RI 11,48-23,68)	1,848	0,397
B	9	16,68 (RI 13,95-37,48)		
C	3	36,24		

Tabla 45. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de GPC3 con la variable CHILD-PUGH mediante el test de Kruskal-Wallis. (GPC3: glipicano-3).

CHILD-PUGH	Nº de pacientes	Niveles medianos de GPC3 (ng/mL)	X ²	p
A	20	13,56 (RI 7,08-27,67)	0,848	0,654
B	9	10,17 (RI 3,98-24,48)		
C	3	7,99		

Tabla 46. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de MMP-1 con la variable CHILD-PUGH mediante el test de Kruskal-Wallis. (MMP-1: metaloproteasa-1).

CHILD-PUGH	Nº de pacientes	Niveles medianos de MMP-1 (ng/mL)	X ²	p
A	20	1,46 (RI 1,24-1,64)	5,843	0,054
B	9	1,39 (RI 1,11-1,94)		
C	3	4,36		

Tabla 47. Estudio de la asociación de los niveles pre-trasplante de AFP con la variable CHILD-PUGH mediante el test de Kruskal-Wallis. (AFP: alfa-fetoproteína).

CHILD-PUGH	Nº de pacientes	Niveles medianos de AFP (ng/mL)	X ²	p
A	20	4,50 (RI 2,48-10,75)	6,682	0,035
B	9	7 (RI 4,75-414,95)		
C	3	63		

4.6 ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6, IL-8, OPN, GPC3 Y MMP-1 CON LOS NIVELES DE PIVKA-II y AFP ANTES Y DESPUÉS DEL TRASPLANTE

En las tablas 48-53 se muestran los resultados obtenidos tras estudiar la asociación de los niveles de los distintos marcadores con PIVKA-II y AFP, antes y después del trasplante, mediante el test de correlación Rho de Spearman.

Al estudiar la asociación de los niveles de los marcadores con PIVKA-II, únicamente se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de PIVKA-II y MMP-1 a los 2 años post-trasplante ($p < 0,05$) (tabla 52).

Al estudiar la asociación de los niveles de los marcadores con AFP, se obtuvo una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de AFP y MMP-1 ($p < 0,05$), tanto antes del trasplante, como al mes, a los 6 meses y al año post-trasplante (tablas 48, 49, 50 y 51, respectivamente). Asimismo, se obtuvo una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de AFP e IL-6 ($p < 0,05$), tanto antes del trasplante (tabla 48) como al año post-trasplante (tabla 51), y entre los niveles de AFP e IL-8 ($p < 0,05$), al mes post-trasplante (tabla 49).

Tabla 48. Asociación de los niveles de los distintos marcadores con PIVKA-II y AFP antes del trasplante mediante el test de correlación Rho de Spearman (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; AFP: alfa-fetoproteína; IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1).

	PIVKA-II (mAU/mL)	AFP (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	OPN (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)
Mediana	87,50	5	5,55	3,12	18,06	13,31	1,26
RI	38,50- 367,75	2,75-6,25	4,76-8,39	1,18- 8,11	14,50- 30,46	5,97- 19,19	1,13- 1,51
Rho Spearman con PIVKA-II	-	0,273	0,275	0,290	-0,117	-0,013	0,161
p	-	0,067	0,104	0,077	0,485	0,931	0,290
Rho Spearman con AFP	0,273	-	0,337	0,072	0,157	-0,082	0,537
p	0,067	-	0,044	0,669	0,348	0,592	<0,001

Tabla 49. Asociación de los niveles de los distintos marcadores con PIVKA-II y AFP al mes post-trasplante mediante el test de correlación Rho de Spearman. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; AFP: alfa-fetoproteína; IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1).

	PIVKA-II (mAU/mL)	AFP (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	OPN (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)
Mediana	23,50	1,5	12,43	2,29	39,23	11,67	1,22
RI	14,75- 35,75	1-2,5	5,15-21,51	0-3,90	22,43- 52,51	8,97- 17,33	0,87- 1,30
Rho Spearman con PIVKA-II	-	0,238	0,028	0,165	0,173	0,093	0,135
p	-	0,223	0,889	0,400	0,380	0,636	0,493
Rho Spearman con AFP	0,238	-	-0,052	-0,435	0,056	-0,066	0,478
p	0,223	-	0,793	0,021	0,776	0,739	0,010

Tabla 50. Asociación de los niveles de los distintos marcadores con PIVKA-II y AFP a los 6 meses post-trasplante mediante el test de correlación Rho de Spearman (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; AFP: alfa-fetoproteína; IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1).

	PIVKA-II (mAU/mL)	AFP (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	OPN (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)
Mediana	35,50	2	4,99	0	18,57	13,32	1,23
RI	26,50- 37,75	1-2,75	4,27-9,56	0-4,42	13,75- 35,64	6,66- 20,34	0,97- 1,36
Rho Spearman con PIVKA-II	-	0,269	0,227	-0,236	0,233	-0,096	0,160
p	-	0,215	0,321	0,303	0,310	0,662	0,467
Rho Spearman con AFP	0,269	-	0,226	-0,042	0,256	-0,183	0,485
p	0,215	-	0,311	0,852	0,250	0,391	0,016

Tabla 51. Asociación de los niveles de los distintos marcadores con PIVKA-II y AFP al año post-trasplante mediante el test de correlación Rho de Spearman. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; AFP: alfa-fetoproteína; IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1).

	PIVKA-II (mAU/mL)	AFP (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	OPN (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)
Mediana	32,50	2	5,78	0	18,26	8,92	1,42
RI	24-41,25	1-3,25	4,30-10,82	0-1,20	11,28- 23,55	2,31- 15,40	1,25- 2,29
Rho Spearman con PIVKA-II	-	-0,030	0,056	0,290	-0,393	-0,378	0,227
p	-	0,888	0,794	0,169	0,057	0,068	0,286
Rho Spearman con AFP	-0,030	-	0,462	0,210	0,338	-0,093	0,460
p	0,888	-	0,023	0,325	0,106	0,667	0,024

Tabla 52. Asociación de los niveles de los distintos marcadores con PIVKA-II y AFP a los 2 años post-trasplante mediante el test de correlación Rho de Spearman. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; AFP: alfa-fetoproteína; IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1).

	PIVKA-II (mAU/mL)	AFP (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	OPN (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)
Mediana	32	2	6,42	0,12	9,51	6,52	1,53
RI	23-53,75	1-5	3,25-7,65	0-1,11	6,63- 11,73	1,94- 11,36	1,25- 2,31
Rho Spearman con PIVKA-II	-	0,010	0,251	0,233	0,063	-0,020	0,437
p	-	0,965	0,260	0,310	0,779	0,928	0,048
Rho Spearman con AFP	0,010	-	0,140	-0,123	0,143	0,096	0,251
p	0,965	-	0,525	0,586	0,514	0,665	0,260

Tabla 53. Asociación de los niveles de los distintos marcadores con PIVKA-II y AFP a los 3 años post-trasplante mediante el test de correlación Rho de Spearman. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; AFP: alfa-fetoproteína; IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1).

	PIVKA-II (mAU/mL)	AFP (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	OPN (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)
Mediana	33	2	11,36	0,62	5,20	1,31	2,19
RI	21,25-45,25	1-3,5	6,82- 12,77	0-2,45	3,75- 8,92	1,01- 2,23	2,06- 3,45
Rho Spearman con PIVKA-II	-	0,083	-0,059	-0,266	-0,036	0,402	0,318
p	-	0,744	0,840	0,302	0,892	0,122	0,198
Rho Spearman con AFP	0,083	-	-0,055	0,256	0,136	-0,267	0,056
p	0,744	-	0,841	0,291	0,579	0,284	0,815

4.7 EVOLUCIÓN DE LOS MARCADORES TRAS EL TRASPLANTE

4.7.1 Evolución de los niveles medianos de marcadores tras el trasplante en los pacientes incluidos en el estudio

Como se puede observar en la tabla 54, tras aplicar el test de Wilcoxon para la comparación de los niveles medianos de PIVKA-II antes y después del trasplante, se observaron diferencias significativas al mes, a los 6 meses y al año post-trasplante ($p < 0,05$), siendo estos valores medianos significativamente más bajos (figura 11). A pesar de no alcanzar la significancia estadística, también se puede observar que los niveles medianos a los 2 años y a los 3 años tras el TOH son menores que los niveles pre-trasplante, reflejando una tendencia general descendente en los niveles medianos de este marcador tras el TOH.

Tabla 54. Comparación de los niveles medianos de PIVKA-II antes y después del trasplante mediante el test de Wilcoxon de los rangos con signo (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II).

	PIVKA-II (mAU/mL) Pre- trasplante	PIVKA-II (mAU/mL) 1 mes post- trasplante	PIVKA-II (mAU/mL) 6 meses post- trasplante	PIVKA-II (mAU/mL) 1 año post- trasplante	PIVKA-II (mAU/mL) 2 años post- trasplante	PIVKA-II (mAU/mL) 3 años post- trasplante
n	46	28	23	24	22	18
Mediana	87,50	23,50	35,50	32,50	32	33
RI	38,50- 367,75	14,75- 35,75	26,50- 37,75	24-41,25	23-53,75	21,25- 45,25
Z	-	-4,042	-2,814	-2,315	-1,543	-1,460
p	-	<0,001	0,005	0,021	0,123	0,144

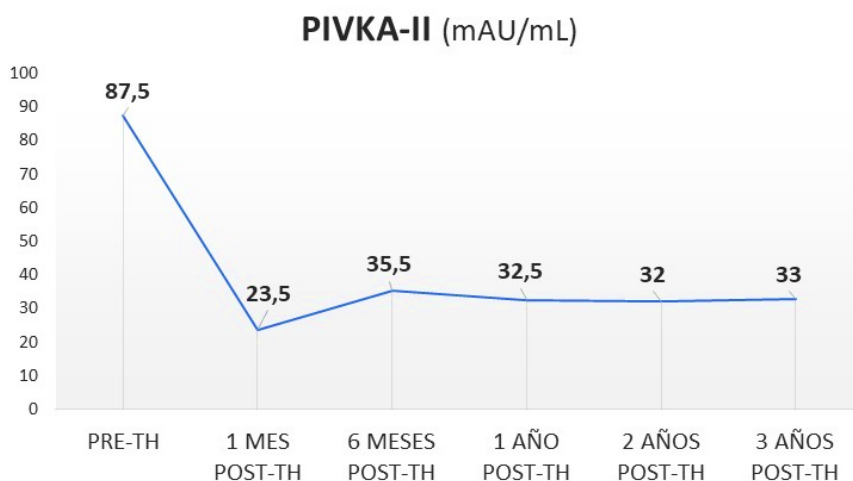


Figura 11. Evolución de los niveles medianos de PIVKA-II en el grupo de pacientes incluidos en el estudio tras el trasplante hepático (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; TH: trasplante hepático).

Tras aplicar el test de Wilcoxon para comparar los niveles medianos de IL-6 antes y después del trasplante (tabla 55), se observó que estos niveles eran significativamente más altos al mes y a los dos años post-trasplante ($p < 0,05$). Aunque no se logró la significancia estadística en el resto de muestras post-trasplante, los niveles medianos de este marcador se mantuvieron más o menos estables a los 6 meses y al año post-trasplante, experimentando un ascenso a los 3 años post-trasplante (figura 12).

Tabla 55. Comparación de los niveles medianos de IL-6 antes y después del trasplante mediante el test de Wilcoxon de los rangos con signo (IL-6: interleucina-6).

	IL-6 (pg/mL) Pre- trasplante	IL-6 (pg/mL) 1 mes post- trasplante	IL-6 (pg/mL) 6 meses post- trasplante	IL-6 (pg/mL) 1 año post- trasplante	IL-6 (pg/mL) 2 años post- trasplante	IL-6 (pg/mL) 3 años post- trasplante
n	36	28	22	24	23	16
Mediana	5,55	12,43	4,99	5,78	6,42	11,36
RI	4,76-8,39	5,15-21,51	4,27-9,56	4,30-10,82	3,25-7,65	6,82-12,77
Z	-	-2,368	-0,730	-1,714	-2,342	-0,207
p	-	0,018	0,465	0,086	0,019	0,836

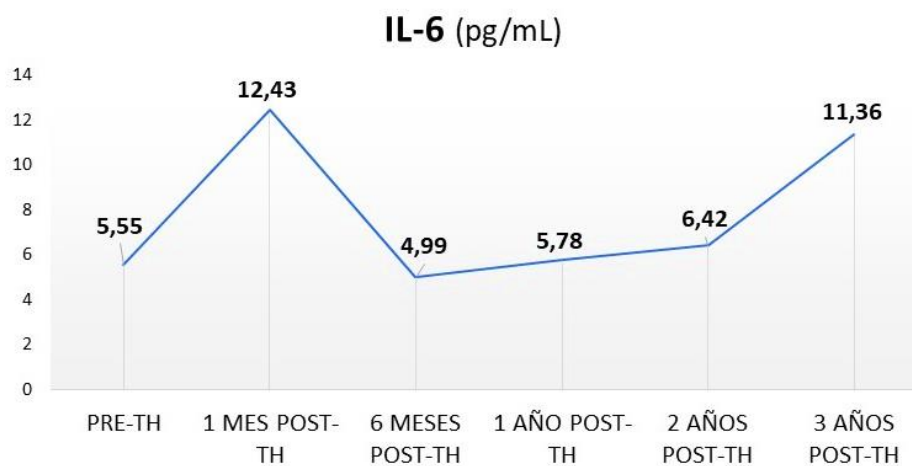


Figura 12. Evolución de los niveles medianos de IL-6 en el grupo de pacientes incluidos en el estudio tras el trasplante hepático (IL-6: interleucina-6; TH: trasplante hepático).

Como se muestra en la tabla 56, tras aplicar el test de Wilcoxon para comparar los niveles medianos de IL-8 pre- y post-trasplante, se observó que los niveles medianos de este marcador experimentan un descenso estadísticamente significativo al mes, al año, a los 2 años y a los 3 años post-trasplante ($p < 0,05$) (figura 13).

Tabla 56. Comparación de los niveles medianos de IL-8 antes y después del trasplante mediante el test de Wilcoxon de los rangos con signo (IL-8: interleucina-8).

	IL-8 (pg/mL) Pre-trasplante	IL-8 (pg/mL) 1 mes post-trasplante	IL-8 (pg/mL) 6 meses post-trasplante	IL-8 (pg/mL) 1 año post-trasplante	IL-8 (pg/mL) 2 años post-trasplante	IL-8 (pg/mL) 3 años post-trasplante
n	38	28	22	24	22	19
Mediana	3,12	2,29	0	0	0,12	0,62
RI	1,18-8,11	0-3,90	0-4,42	0-1,20	0-1,11	0-2,45
Z	-	-2,324	-1,547	-3,165	-2,624	-2,722
p	-	0,020	0,122	0,002	0,009	0,006

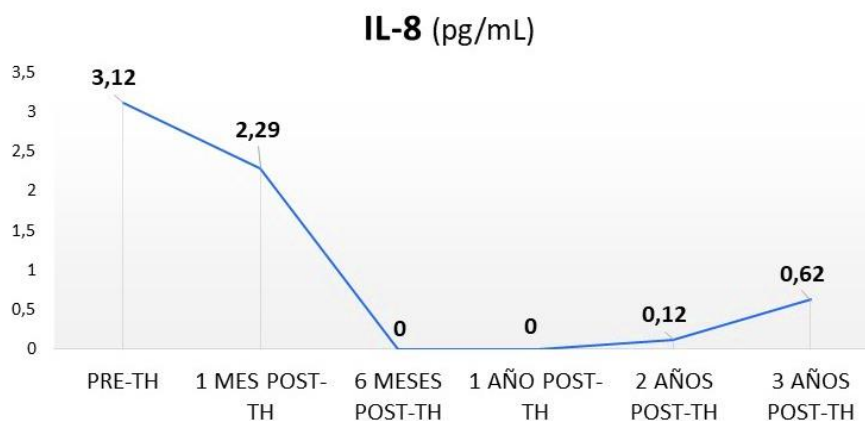


Figura 13. Evolución de los niveles medianos de IL-8 en el grupo de pacientes incluidos en el estudio tras el trasplante hepático (IL-8: interleucina-8; TH: trasplante hepático).

Al aplicar el test de Wilcoxon para contrastar los niveles medianos de OPN antes y después del trasplante (tabla 57), se observaron diferencias significativas al mes, a los 6 meses, a los 2 años y a los 3 años post-trasplante ($p < 0,05$), siendo estos niveles medianos significativamente más altos al mes y a los 6 meses respecto a los valores pre-trasplante, y más bajos a los 2 años y a los 3 años tras el TOH (figura 14).

Tabla 57. Comparación de los niveles medianos de OPN antes y después del trasplante mediante el test de Wilcoxon de los rangos con signo (OPN: osteopontina).

	OPN (ng/mL) Pre-trasplante	OPN (ng/mL) 1 mes post-trasplante	OPN (ng/mL) 6 meses post-trasplante	OPN (ng/mL) 1 año post-trasplante	OPN (ng/mL) 2 años post-trasplante	OPN (ng/mL) 3 años post-trasplante
n	38	28	22	25	23	19
Mediana	18,06	39,23	18,57	18,26	9,51	5,20
RI	14,50-30,46	22,43-52,51	13,75-35,64	11,28-23,55	6,63-11,73	3,75-8,92
Z	-	-3,917	-2,029	-0,686	-3,528	-3,823
p	-	<0,001	0,042	0,493	<0,001	<0,001

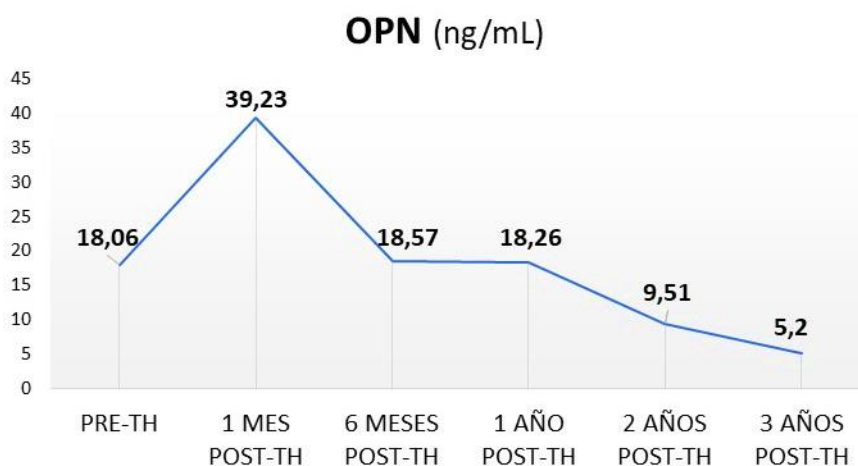


Figura 14. Evolución de los niveles medianos de OPN en el grupo de pacientes incluidos en el estudio tras el trasplante hepático (OPN: osteopontina; TH: trasplante hepático).

Como se muestra en la tabla 58, tras aplicar el test de Wilcoxon para comparar los niveles medianos de GPC3 antes y después del trasplante, se observó que los niveles de este marcador son significativamente más bajos a los 2 años y a los 3 años post-trasplante ($p < 0,05$). A pesar de no alcanzar la significancia estadística en el resto de muestras post-trasplante, se puede apreciar una tendencia global descendente en los niveles de este marcador tras el TOH (figura 15).

Tabla 58. Comparación de los niveles medianos de GPC3 antes y después del trasplante mediante el test de Wilcoxon de los rangos con signo (GPC3: glipicano-3).

	GPC3 (ng/mL) Pre- trasplante	GPC3 (ng/mL) 1 mes post- trasplante	GPC3 (ng/mL) 6 meses post- trasplante	GPC3 (ng/mL) 1 año post- trasplante	GPC3 (ng/mL) 2 años post- trasplante	GPC3 (ng/mL) 3 años post- trasplante
n	45	28	24	25	24	18
Mediana	13,31	11,67	13,32	8,92	6,52	1,31
RI	5,97-19,19	8,97-17,33	6,66-20,34	2,31-15,40	1,94-11,36	1,01-2,23
Z	-	-0,660	-0,171	-1,170	-2,886	-3,724
p	-	0,509	0,864	0,242	0,004	<0,001

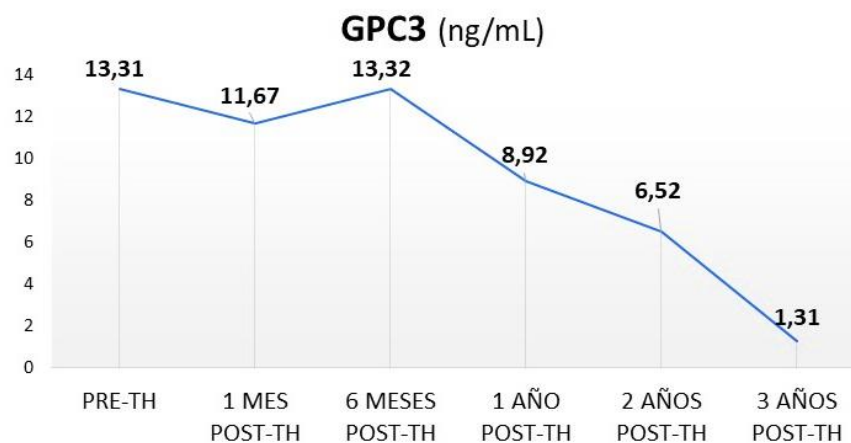


Figura 15. Evolución de los niveles medianos de GPC3 en el grupo de pacientes incluidos en el estudio tras el trasplante hepático (GPC3: glipicano-3; TH: trasplante hepático).

Tras aplicar el test de Wilcoxon para comparar los niveles medianos de MMP-1 antes y después del trasplante (tabla 59), se observaron diferencias estadísticamente significativas al mes y a los 3 años post-trasplante, siendo estos valores medianos significativamente más bajos al mes y significativamente más altos a los 3 años post-trasplante ($p < 0,05$). Asimismo, los niveles medianos de MMP-1 se mantienen más o menos estables a los 6 meses y comienzan una tendencia ascendente al año post-trasplante (figura 16).

Tabla 59. Comparación de los niveles medianos de MMP-1 antes y después del trasplante mediante el test de Wilcoxon de los rangos con signo (MMP-1: metaloproteasa-1).

	MMP-1 (ng/mL) Pre- trasplante	MMP-1 (ng/mL) 1 mes post- trasplante	MMP-1 (ng/mL) 6 meses post- trasplante	MMP-1 (ng/mL) 1 año post- trasplante	MMP-1 (ng/mL) 2 años post- trasplante	MMP-1 (ng/mL) 3 años post- trasplante
n	45	28	24	25	22	20
Mediana	1,26	1,22	1,23	1,42	1,53	2,19
RI	1,13-1,51	0,87-1,30	0,97-1,36	1,25-2,29	1,25-2,31	2,06-3,45
Z	-	-3,580	-0,486	-0,552	-1,007	-3,808
p	-	<0,001	0,627	0,581	0,314	<0,001

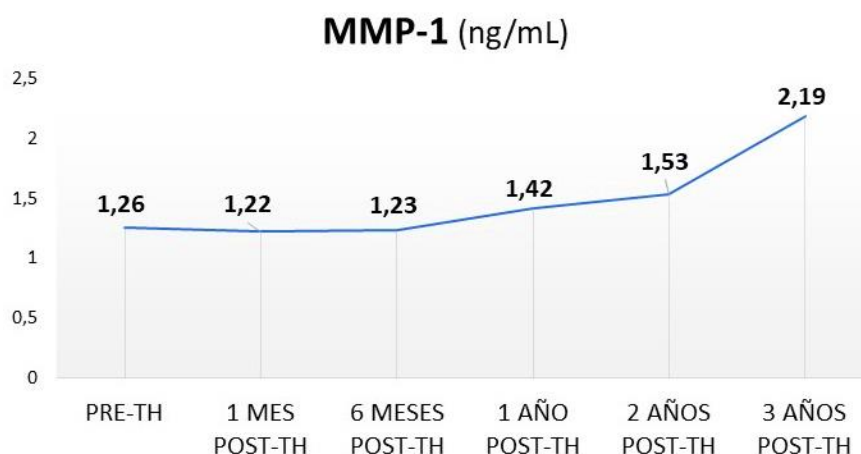


Figura 16. Evolución de los niveles medianos de MMP-1 en el grupo de pacientes incluidos en el estudio tras el trasplante hepático (MMP-1: metaloproteasa-1; TH: trasplante hepático).

Tras aplicar el test de Wilcoxon para comparar los niveles medianos de AFP antes y después del trasplante (tabla 60), se observó que los niveles de este marcador experimentan un descenso estadísticamente significativo al mes, al año, a los 2 años y a los 3 años post-trasplante ($p < 0,05$) (figura 17).

Tabla 60. Comparación de los niveles medianos de AFP antes y después del trasplante mediante el test de Wilcoxon de los rangos con signo (AFP: alfa-fetoproteína).

	AFP (ng/mL) Pre-trasplante	AFP (ng/mL) 1 mes post-trasplante	AFP (ng/mL) 6 meses post-trasplante	AFP (ng/mL) 1 año post-trasplante	AFP (ng/mL) 2 años post-trasplante	AFP (ng/mL) 3 años post-trasplante
n	46	28	24	24	23	20
Mediana	5	1,5	2	2	2	2
RI	2,75-6,25	1-2,5	1-2,75	1-3,25	1-5	1-3,5
Z	-	-4,262	-1,766	-3,257	-3,436	-3,469
p	-	<0,001	0,077	0,001	0,001	0,001

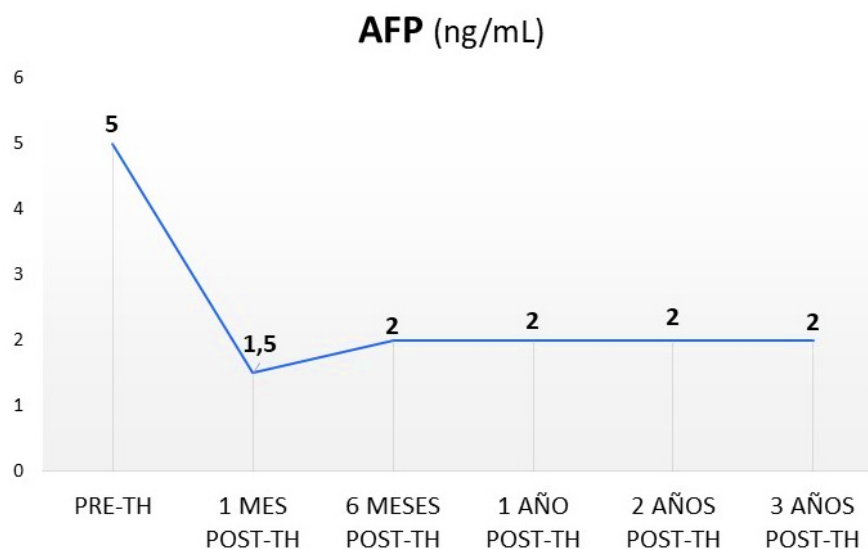


Figura 17. Evolución de los niveles medianos de AFP en el grupo de pacientes incluidos en el estudio tras el trasplante hepático (AFP: alfa-fetoproteína; TH: trasplante hepático).

4.7.2 Evolución de los niveles medianos de marcadores tras el trasplante en los pacientes sin recidiva y con recidiva post-trasplante

Tras agrupar los pacientes del estudio en aquellos que presentaron recidiva tumoral tras el trasplante y aquellos que no y aplicar el test de wilcoxon en estos 2 grupos de pacientes para todos los marcadores estudiados (PIVKA-II, IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 y AFP) con el objetivo de comparar los niveles medianos de los marcadores antes y después del trasplante (tablas 61-67, respectivamente), se encontraron diferencias significativas entre los niveles pre- y post-trasplante ($p < 0,05$) en el grupo de pacientes sin recidiva de PIVKA-II, IL-6, IL-8 y AFP, tanto al mes como al año post-trasplante (tablas 61, 62, 63 y 67, respectivamente). Los niveles medianos de PIVKA-II, IL-8 y AFP fueron significativamente más bajos tanto al mes como al año post-trasplante, mientras que los niveles de IL-6 fueron significativamente más altos al mes post-trasplante y significativamente más bajos al año post-trasplante.

Respecto a los niveles medianos de OPN y MMP-1 en los pacientes sin recidiva, se encontraron diferencias significativas únicamente al mes post-trasplante (tablas 64 y 66, respectivamente), de forma que los niveles medianos de OPN fueron significativamente más altos, mientras que los de MMP-1 fueron significativamente más bajos. En el caso del GPC3

no se encontraron diferencias significativas en el grupo de pacientes sin recidiva, ni al mes ni al año post-trasplante ($p>0,05$) (tabla 65).

En cuanto a los pacientes con recidiva, no se encontraron diferencias significativas en ningún marcador tras el trasplante. Sin embargo, se puede observar gráficamente el contraste en los niveles medianos de los biomarcadores analizados entre los pacientes sin recidiva post-trasplante (figura 18), en los cuales se observa una tendencia descendente en todos los marcadores y los pacientes con recidiva (figura 19), en los cuales se aprecia una tendencia ascendente en la mayoría de marcadores, a excepción del GPC3, que permanece invariable tras el trasplante.

Tabla 61. Comparación de los niveles medianos de PIVKA-II pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con recidiva y sin recidiva (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II).

Pacientes sin recidiva	PIVKA-II (mAU/mL) Pre-trasplante	PIVKA-II (mAU/mL) 1 mes post-trasplante	PIVKA-II (mAU/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	90	19,50	28
RI	25-324,50	10-50	23-35,25
Z		-4,015	-3,393
p		<0,001	0,001
Pacientes con recidiva			
Mediana	398	42,50	38457
RI	-	-	-
Z		-1,095	-1,342
p		0,273	0,180

Tabla 62. Comparación de los niveles medianos de IL-6 pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con recidiva y sin recidiva (IL-6: interleucina 6).

Pacientes sin recidiva	IL-6 (pg/mL) Pre-trasplante	IL-6 (pg/mL) 1 mes post-trasplante	IL-6 (pg/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	5,39	12,85	4,90
RI	4,52-6,53	6,97-19,45	2,66-5,96
Z		-2,200	-2,029
p		0,028	0,042
Pacientes con recidiva			
Mediana	10,88	10,06	100,84
RI	-	-	-
Z		-0,730	-0,447
p		0,465	0,655

Tabla 63. Comparación de los niveles medianos de IL-8 pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con recidiva y sin recidiva (IL-8: interleucina 8).

Pacientes sin recidiva	IL-8 (pg/mL) Pre-trasplante	IL-8 (pg/mL) 1 mes post-trasplante	IL-8 (pg/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	4,27	1,60	0
RI	1,37-12,35	0,11-3,75	0-2,23
Z		-2,354	-3,584
p		0,019	<0,001
Pacientes con recidiva			
Mediana	2,42	1,54	6,89
RI	-	-	-
Z		-0,365	-0,447
p		0,715	0,655

Tabla 64. Comparación de los niveles medianos de OPN pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con recidiva y sin recidiva (OPN: osteopontina).

Pacientes sin recidiva	OPN (ng/mL) Pre-trasplante	OPN (ng/mL) 1 mes post-trasplante	OPN (ng/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	17,10	46,24	19,13
RI	13,68-18,39	25,43-54,52	18,14-22,44
Z		-3,514	-0,276
p		<0,001	0,783
Pacientes con recidiva			
Mediana	19,95	39,40	93,30
RI	-	-	-
Z		-1,826	-1,342
p		0,068	0,180

Tabla 65. Comparación de los niveles medianos de GPC3 pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con recidiva y sin recidiva (GPC3: glipicano-3).

Pacientes sin recidiva	GPC3 (ng/mL) Pre-trasplante	GPC3 (ng/mL) 1 mes post-trasplante	GPC3 (ng/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	13,85	13,49	11,75
RI	4,95-21,12	10,32-20,19	10,48-30,74
Z		-0,657	-1,034
p		0,511	0,301
Pacientes con recidiva			
Mediana	7,06	8,87	6,18
RI	-	-	-
Z		-0,365	-0,447
p		0,715	0,655

Tabla 66. Comparación de los niveles medianos de MMP-1 pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con recidiva y sin recidiva (MMP-1: metaloproteasa-1).

Pacientes sin recidiva	MMP-1 (ng/mL) Pre-trasplante	MMP-1 (ng/mL) 1 mes post-trasplante	MMP-1 (ng/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	1,36	1,22	1,24
RI	1,12-1,55	0,97-1,33	0,93-1,30
Z		-3,133	-0,791
p		0,002	0,429
Pacientes con recidiva			
Mediana	1,52	-	3,10
RI	-	-	-
Z		-1,826	-0,447
p		0,068	0,655

Tabla 67. Comparación de los niveles medianos de AFP pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con recidiva y sin recidiva (AFP: alfa-fetoproteína).

Pacientes sin recidiva	AFP (ng/mL) Pre-trasplante	AFP (ng/mL) 1 mes post-trasplante	AFP (ng/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	5	1,50	1,50
RI	2,75-5,75	1-2	1-2,75
Z		-3,954	-3,782
p		<0,001	<0,001
Pacientes con recidiva			
Mediana	7,50	1,50	82,50
RI	-	-	-
Z		-1,461	-0,447
p		0,144	0,655

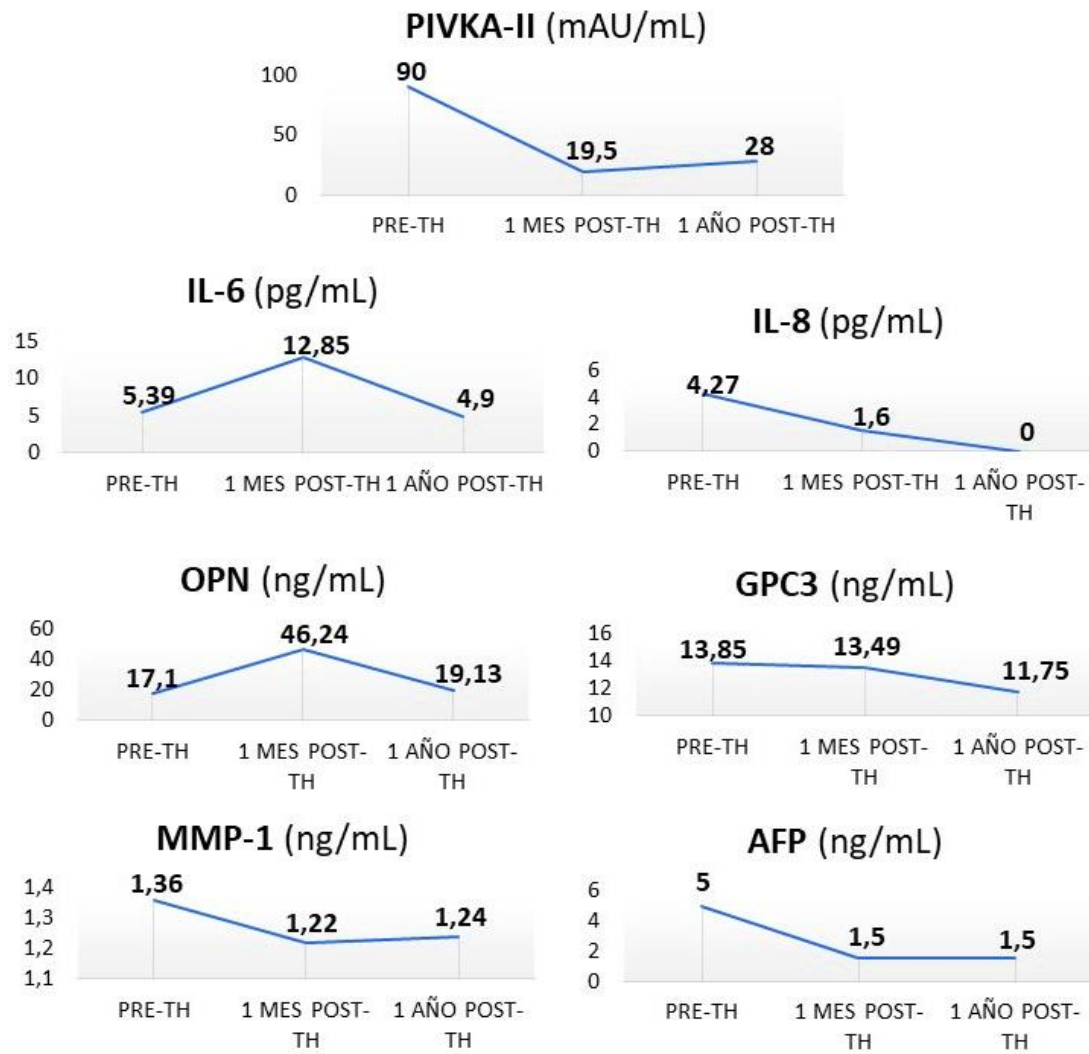


Figura 18. Evolución de los niveles medianos de los marcadores analizados en los pacientes sin recidiva tras el trasplante.

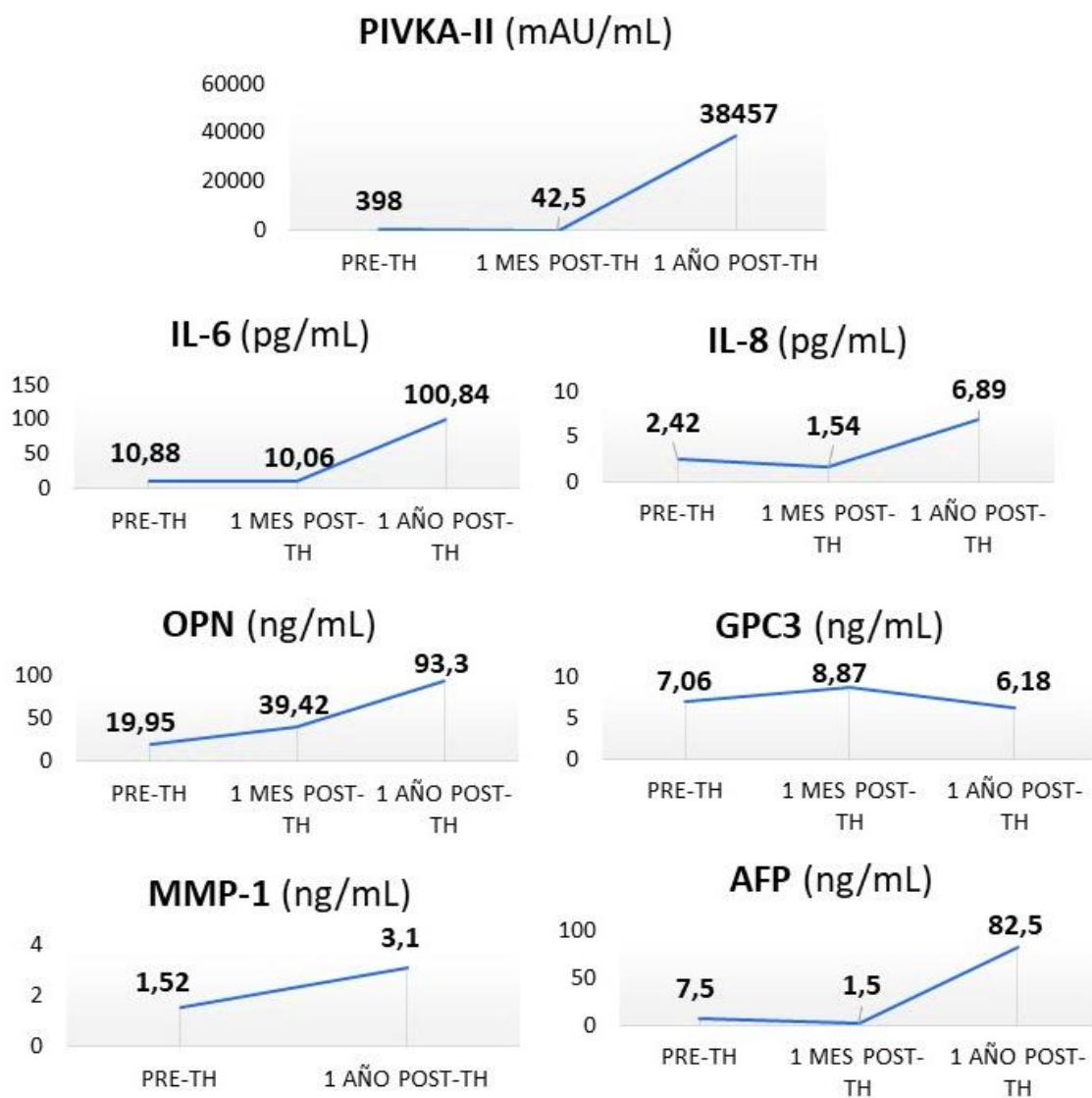


Figura 19. Evolución de los niveles medianos de los marcadores analizados en los pacientes con recidiva tras el trasplante.

4.7.3 Evolución de los niveles de marcadores tras el trasplante en los pacientes con recidiva post-trasplante

De los 35 pacientes trasplantados, 4 presentaron recidiva constatada por imagen tras el trasplante hepático, concretamente los pacientes 7, 13, 19 y 23, los cuales acabaron falleciendo por progresión de la enfermedad.

El paciente 7 presentó metástasis ósea, pulmonar y hepática, a los 6 meses tras el trasplante, con unos niveles pre-trasplante de PIVKA-II elevados (596 mAU/mL), que descendieron al mes post-trasplante hasta 17 mAU/mL y que volvieron a ascender hasta 271 mAU/mL a los 6 meses, coincidiendo aproximadamente con la aparición de la recidiva tumoral (figura 20). En este paciente, que terminó falleciendo a los 5 meses tras la detección de recidiva tumoral, el resto de marcadores también experimentaron un aumento en el momento de la recidiva (muestra a los 6 meses post-trasplante) con respecto al mes post-trasplante (figura 21): IL-6 aumentó de 17,43 a 18,6 pg/mL; IL-8 aumentó de 1,79 a 1,84 pg/mL; OPN de 20,535 a 51,37 ng/mL; GPC3 de 3,33 a 4,14 ng/mL; MMP-1, de 1,29 a 5,54 ng/mL y AFP de 4 a 93 ng/mL.

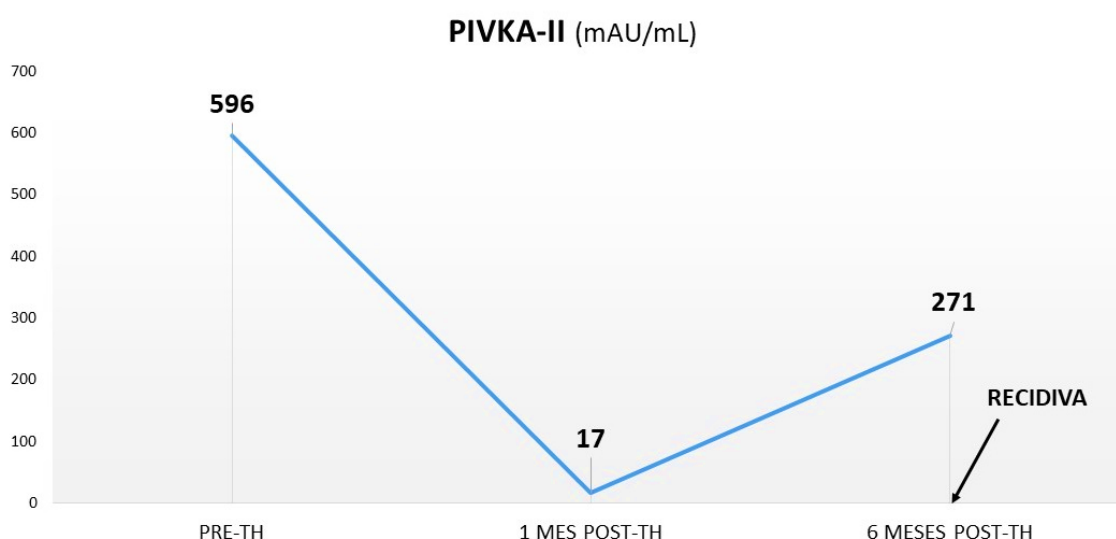


Figura 20. Evolución de los niveles de PIVKA-II en el paciente 7 tras el trasplante (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; TH: trasplante hepático).

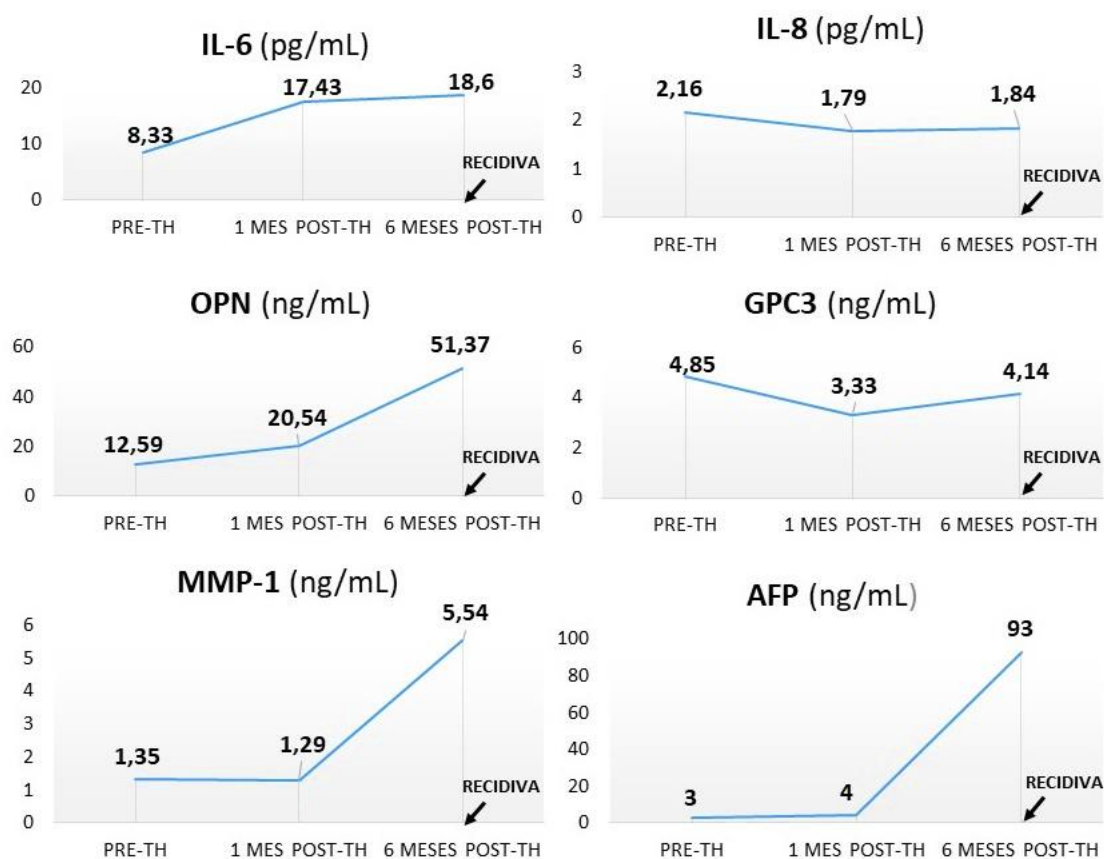


Figura 21. Evolución de los niveles del resto de marcadores (IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 y AFP) en el paciente 7 tras el trasplante. (IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glicoproteína-3; MMP-1: metaloproteasa-1; AFP: alfa-fetoproteína; TH: trasplante hepático).

El paciente 13 presentó metástasis suprarrenal bilateral, además de metástasis ósea y hepática, a los 6 meses tras el trasplante. Los niveles pre-trasplante de PIVKA-II fueron de 19 mAU/mL, aumentando hasta 112 mAU/mL al mes tras el trasplante y descendiendo hasta 45 mAU/mL a los 6 meses post-trasplante, momento en el que fue detectada la recidiva. Este paciente terminó falleciendo a los 4 meses tras la detección de recidiva tumoral. Algunos marcadores experimentaron un ascenso coincidiendo con la detección de la recidiva (muestra a los 6 meses post-trasplante) como IL-8, de 2,60 a 3,81 ng/mL; MMP-1, de 1,74 a 2,24 ng/mL y AFP de 9 a 17 ng/mL. El resto de marcadores no experimentaron ascenso entre la muestra al mes y la muestra a los 6 meses post-trasplante (figuras 22 y 23).

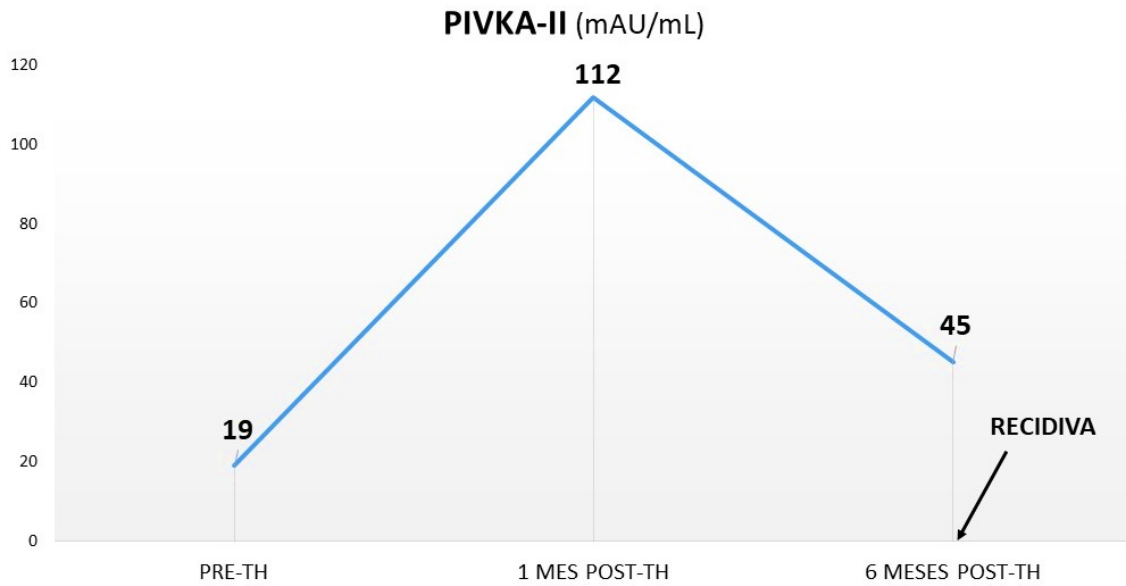


Figura 22. Evolución de los niveles de PIVKA-II en el paciente 13 tras el trasplante. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; TH: trasplante hepático).

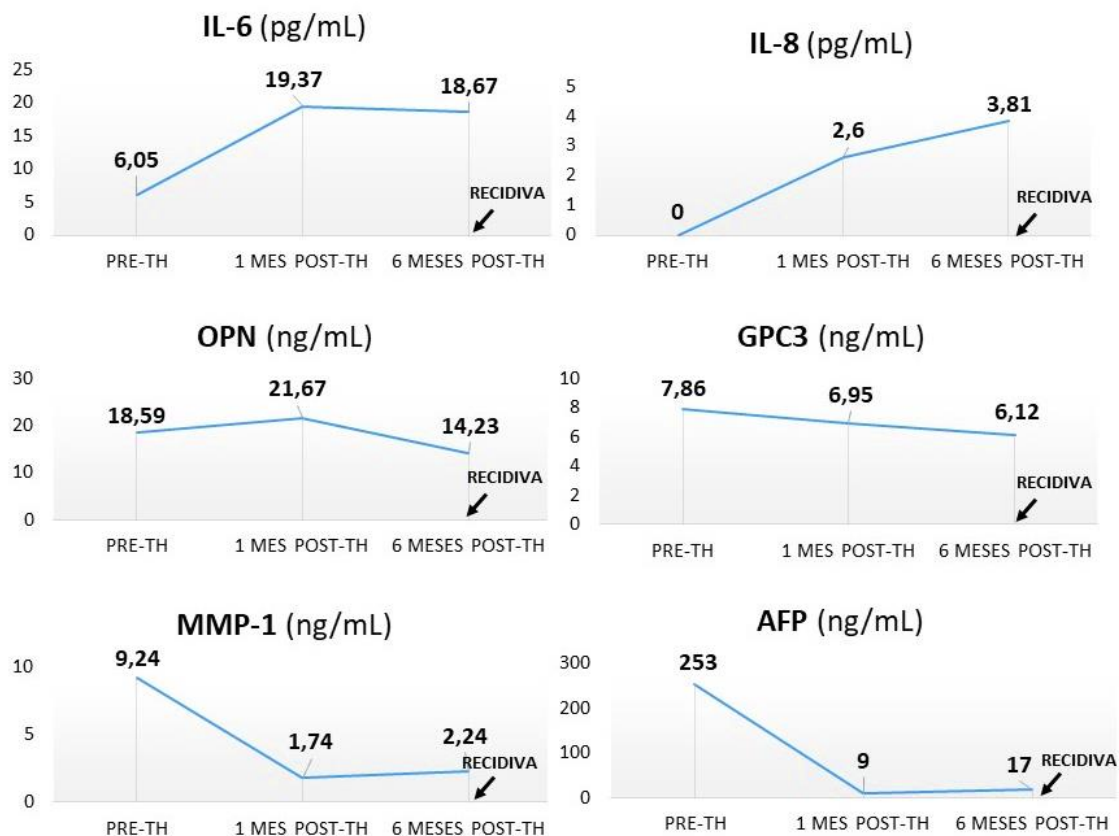


Figura 23. Evolución de los niveles del resto de marcadores (IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 y AFP) en el paciente 13 tras el trasplante. (IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glicoproteína-3; MMP-1: metaloproteasa-1; AFP: alfa-fetoproteína; TH: trasplante hepático).

El paciente 19 presentó metástasis ósea y hepática, a los 6 meses tras el trasplante. Los niveles pre-trasplante de PIVKA-II fueron elevados, concretamente de 725 mAU/mL, disminuyendo hasta 52 mAU/mL al mes tras el trasplante y volviendo a subir de forma abrupta hasta 4780 mAU/mL a los 6 meses post-trasplante, coincidiendo aproximadamente con la detección de recidiva tumoral por imagen. El valor de PIVKA-II al año post-trasplante fue de 75000 mAU/mL, momento en el que el paciente ya presentaba metástasis (figura 24). Este paciente terminó falleciendo a los 8 meses tras la detección de recidiva tumoral. La mayoría del resto de marcadores experimentaron un ascenso coincidiendo con la detección de la recidiva (muestra a los 6 meses post-trasplante) como IL-6, de 4,72 a 14,45 ng/mL; OPN, de 59,82 a 140,25 ng/mL; MMP-1, de 1,27 a 4,48 ng/mL y AFP de 2 a 108 ng/mL. GPC3 aumentó al mes post-trasplante, de 5,29 a 10,89 ng/mL, disminuyendo de forma discreta hasta 9,24 ng/mL a los 6 meses post-trasplante. Por último IL-8 aumentó al año post-trasplante respecto al valor de los 6 meses post-trasplante, elevándose estos niveles de 0 a 13,77 pg/mL (figura 25).

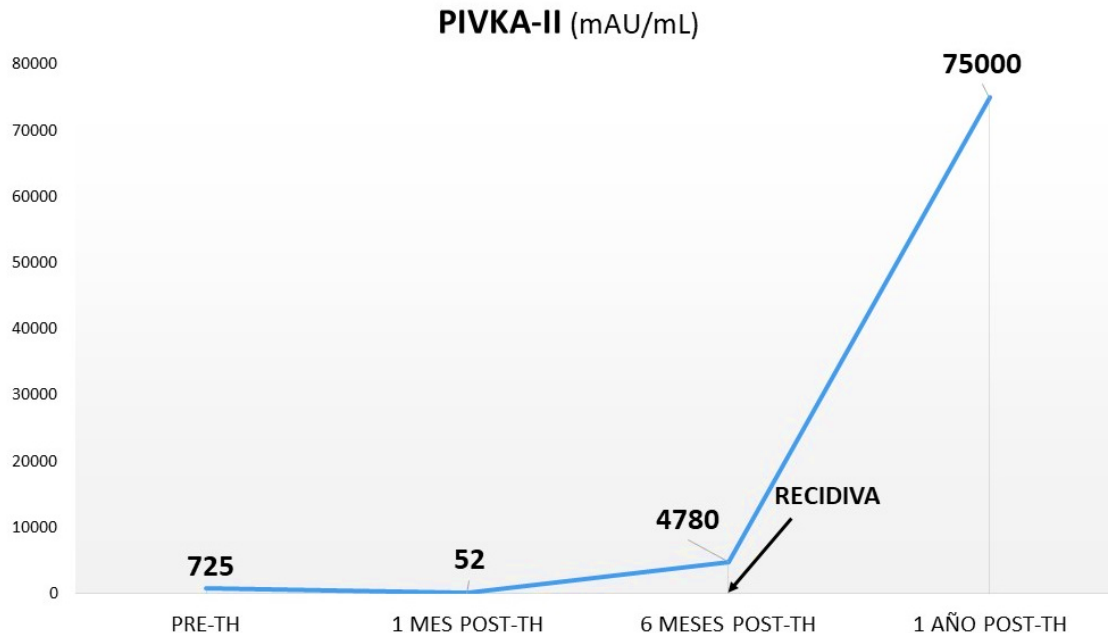


Figura 24. Evolución de los niveles de PIVKA-II en el paciente 19 tras el trasplante. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; TH: trasplante hepático).

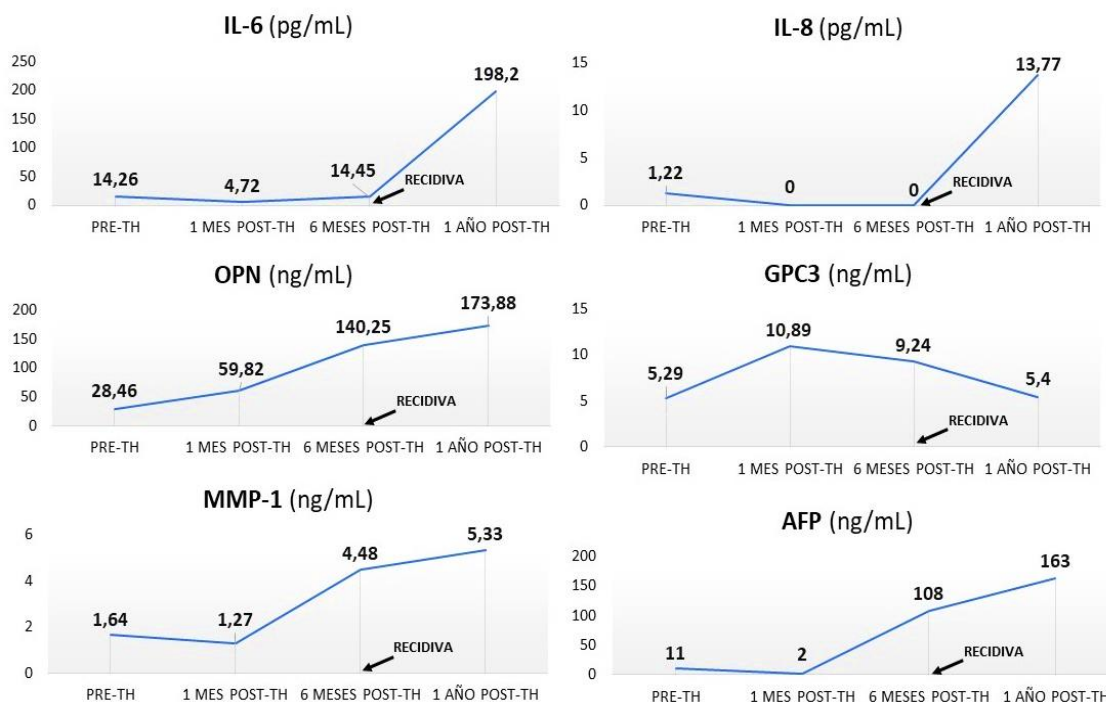


Figura 25. Evolución de los niveles del resto de marcadores (IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 y AFP) en el paciente 19 tras el trasplante. (IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glicoproteína-3; MMP-1: metaloproteasa-1; AFP: alfa-fetoproteína; TH: trasplante hepático).

El paciente 23 presentó metástasis pulmonar, ósea y hepática, aproximadamente al año y medio tras el trasplante. Los niveles pre-trasplante de PIVKA-II fueron de 71 mAU/mL, disminuyendo hasta 33 mAU/mL al mes tras el trasplante, manteniéndose en 36 mAU/mL a los 6 meses y ascendiendo hasta 1915 mAU/mL al año post-trasplante, adelantándose por tanto a la detección de recidiva por imagen, la cual tuvo lugar 8 meses más tarde. El valor de PIVKA-II a los 2 años post-trasplante fue de 75000 mAU/mL (figura 26). Este paciente falleció a los 12 meses tras la detección de recidiva tumoral por imagen. Respecto al resto de marcadores, IL-6 e IL-8 aumentan de forma clara a los 2 años post-trasplante respecto al año post-trasplante, concretamente IL-6 aumenta de 3,47 a 16,94 pg/mL e IL-8 aumenta de 0 a 14,36 pg/mL. También OPN aumenta de 12,73 a 19,49 ng/mL y MMP-1 aumenta de 0,86 a 2,29 ng/mL. AFP, en cambio, se mantiene dentro del intervalo de referencia, pasando de 2 ng/mL al año post-trasplante a 3 ng/mL a los 2 años post-trasplante, momento en el que el paciente ya presentaba recidiva tumoral y metástasis. Por otro lado, GPC3 disminuye a los 2 años tras el trasplante hasta 0,8 ng/mL (figura 27).

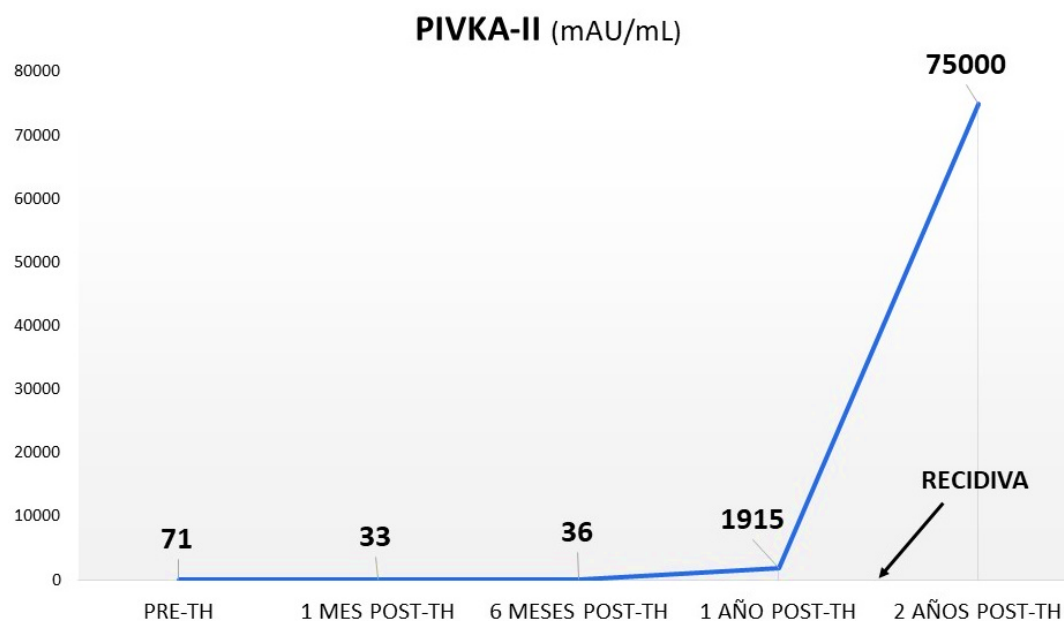


Figura 26. Evolución de los niveles de PIVKA-II en el paciente 23 tras el trasplante. (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; TH: trasplante hepático).

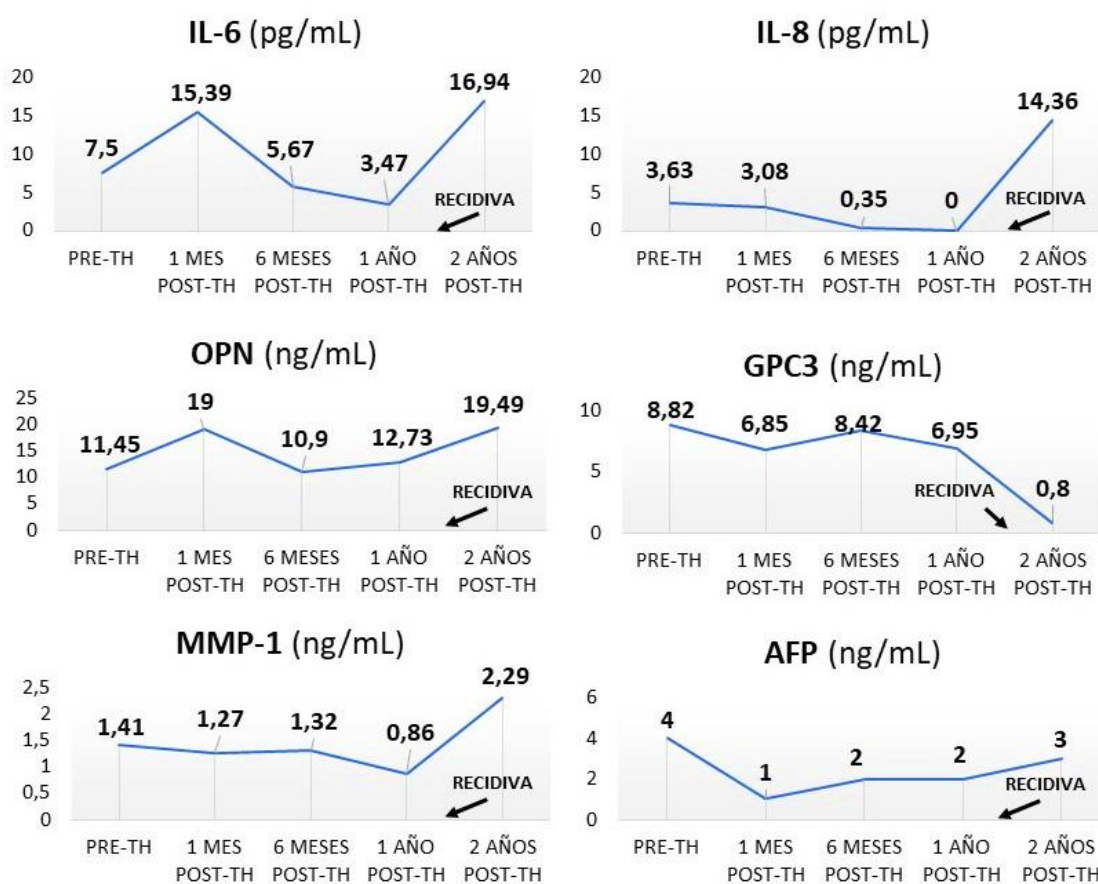


Figura 27. Evolución de los niveles del resto de marcadores (IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 y AFP) en el paciente 23 tras el trasplante. (IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glicoproteína-3; MMP-1: metaloproteasa-1; AFP: alfa-fetoproteína; TH: trasplante hepático).

4.7.4 Evolución de los niveles de marcadores tras el trasplante en los pacientes sin invasión vascular y con invasión vascular

Tras agrupar los pacientes del estudio en aquellos con invasión vascular y sin invasión vascular y aplicar el test de wilcoxon en estos 2 grupos de pacientes para todos los marcadores estudiados (PIVKA-II, IL-6, IL-8, OPN, GPC3, MMP-1 y AFP), con el objetivo de comparar los niveles medianos de los marcadores antes y después del trasplante (tablas 68-74), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles pre- y post-trasplante ($p < 0,05$) en el grupo de pacientes sin invasión vascular de PIVKA-II y AFP al mes y al año post-trasplante (tablas 68 y 74, respectivamente), de forma que tanto los niveles de PIVKA-II como los de AFP eran significativamente más bajos al mes y al año tras el TOH en estos pacientes. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas, en el grupo de pacientes sin invasión vascular, en los niveles de IL-6, OPN y MMP-1 al mes post-trasplante (tablas 69, 71 y 73, respectivamente), de forma que tanto los niveles de IL-6 como de OPN eran significativamente más altos y los de MMP-1, significativamente más bajos. Por último, se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-8 al año post-trasplante (tabla 70), de forma que estos niveles eran significativamente más bajos. En el caso del GPC3, no se encontraron diferencias significativas en el grupo de pacientes sin invasión vascular ni al mes ni al año post-trasplante ($p > 0,05$) (tabla 72).

En el grupo de pacientes con invasión vascular, no se encontraron diferencias significativas entre los valores pre- y post-trasplante en ninguno de los marcadores estudiados. En las figuras 28 y 29, se puede observar que no existe una diferencia notable en el comportamiento general de los biomarcadores analizados entre los pacientes sin invasión vascular respecto a los pacientes con invasión vascular, respectivamente.

Tabla 68. Comparación de los niveles medianos de PIVKA-II pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con invasión vascular y sin invasión vascular (PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II).

Pacientes sin invasión vascular	PIVKA-II (mAU/mL) Pre-trasplante	PIVKA-II (mAU/mL) 1 mes post-trasplante	PIVKA-II (mAU/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	103,50	23,50	28,50
RI	39-367,75	17,75-31,25	24,50-38,50
Z	-	-3,915	-2,781
p	-	<0,001	0,005
Pacientes con invasión vascular			
Mediana	24	27	21
RI	-	-	-
Z	-	-0,535	-0,535
p	-	0,593	0,593

Tabla 69. Comparación de los niveles medianos de IL-6 pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con invasión vascular y sin invasión vascular (IL-6: interleucina 6).

Pacientes sin invasión vascular	IL-6 (pg/mL) Pre-trasplante	IL-6 (pg/mL) 1 mes post-trasplante	IL-6 (pg/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	9,28	16,30	7,12
RI	6,09-16,63	11-24,20	4,60-10,82
Z	-	-2,839	-1,894
p	-	0,005	0,058
Pacientes con invasión vascular			
Mediana	14,26	9,54	9,31
RI	-	-	-
Z	-	-0,535	0,000
p	-	0,593	1

Tabla 70. Comparación de los niveles medianos de IL-8 pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con invasión vascular y sin invasión vascular (IL-8: interleucina 8).

Pacientes sin invasión vascular	IL-8 (pg/mL) Pre-trasplante	IL-8 (pg/mL) 1 mes post-trasplante	IL-8 (pg/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	2,91	2,76	0
RI	1,07-6,27	0-3,98	0-1,47
Z	-	-1,825	-3,461
p	-	0,068	0,001
Pacientes con invasión vascular			
Mediana	9,37	-	0
RI	-	-	-
Z	-	-1,604	0
p	-	0,109	1

Tabla 71. Comparación de los niveles medianos de OPN pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con invasión vascular y sin invasión vascular (OPN: osteopontina).

Pacientes sin invasión vascular	OPN (ng/mL) Pre-trasplante	OPN (ng/mL) 1 mes post-trasplante	OPN (ng/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	16,21	33,08	18,26
RI	13,45-25,68	24,47-43,98	10,67-23,83
Z	-	-3,592	-0,295
p	-	<0,001	0,768
Pacientes con invasión vascular			
Mediana	28,46	42,47	43,66
RI	-	-	-
Z	-	-1,604	-1,069
p	-	0,109	0,285

Tabla 72. Comparación de los niveles medianos de GPC3 pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con invasión vascular y sin invasión vascular (GPC3: glipicano-3).

Pacientes sin invasión vascular	GPC3 (ng/mL) Pre-trasplante	GPC3 (ng/mL) 1 mes post-trasplante	GPC3 (ng/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	10,63	9,58	7,05
RI	3,86-17,52	6,90-14,49	2,63-11,30
Z	-	-0,040	-1,445
p	-	0,968	0,149
Pacientes con invasión vascular			
Mediana	5,75	13,73	7,42
RI	-	-	-
Z	-	-1,604	-1,604
p	-	0,109	0,109

Tabla 73. Comparación de los niveles medianos de MMP-1 pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con invasión vascular y sin invasión vascular (MMP-1: metaloproteasa-1).

Pacientes sin invasión vascular	MMP-1 (ng/mL) Pre-trasplante	MMP-1 (ng/mL) 1 mes post-trasplante	MMP-1 (ng/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	1,47	1,27	1,33
RI	1,16-1,63	1,11-1,35	1,27-1,91
Z	-	-3,229	-0,633
p	-	0,001	0,527
Pacientes con invasión vascular			
Mediana	1,64	1,27	1,27
RI	-	-	-
Z	-	-1,604	0
p	-	0,109	1

Tabla 74. Comparación de los niveles medianos de AFP pre- y post-trasplante (al mes y al año tras el trasplante) en pacientes con invasión vascular y sin invasión vascular (AFP: alfa-fetoproteína).

Pacientes sin invasión vascular	AFP (ng/mL) Pre-trasplante	AFP (ng/mL) 1 mes post-trasplante	AFP (ng/mL) 1 año post-trasplante
Mediana	5	2	2
RI	4-7	1-3	2-4
Z	-	-3,977	-3,659
p	-	<0,001	<0,001
Pacientes con invasión vascular			
Mediana	11	-	2
RI	-	-	-
Z	-	-1,604	0
p	-	0,109	1

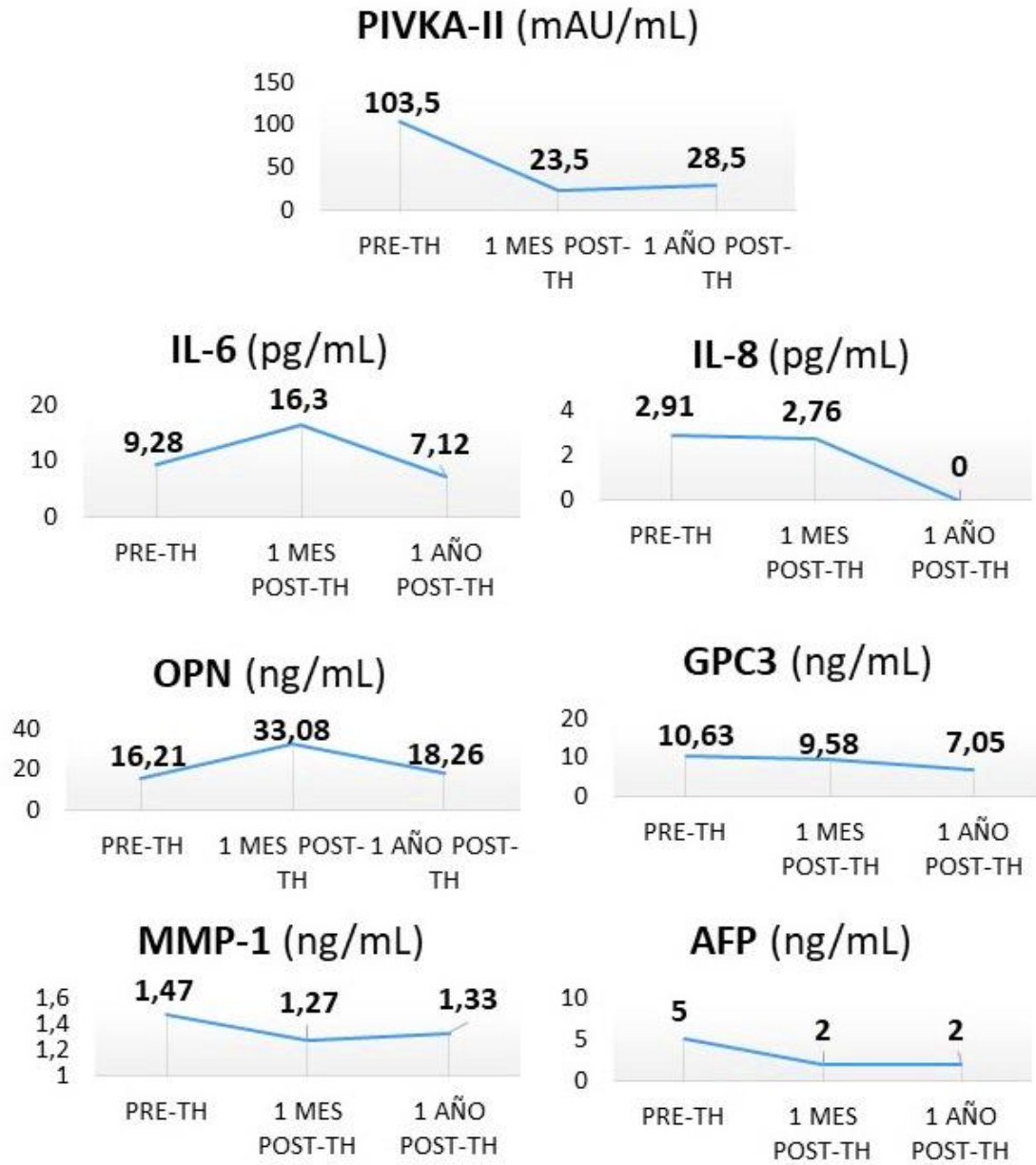


Figura 28. Evolución de los niveles medianos de los marcadores analizados en los pacientes sin invasión vascular tras el trasplante.

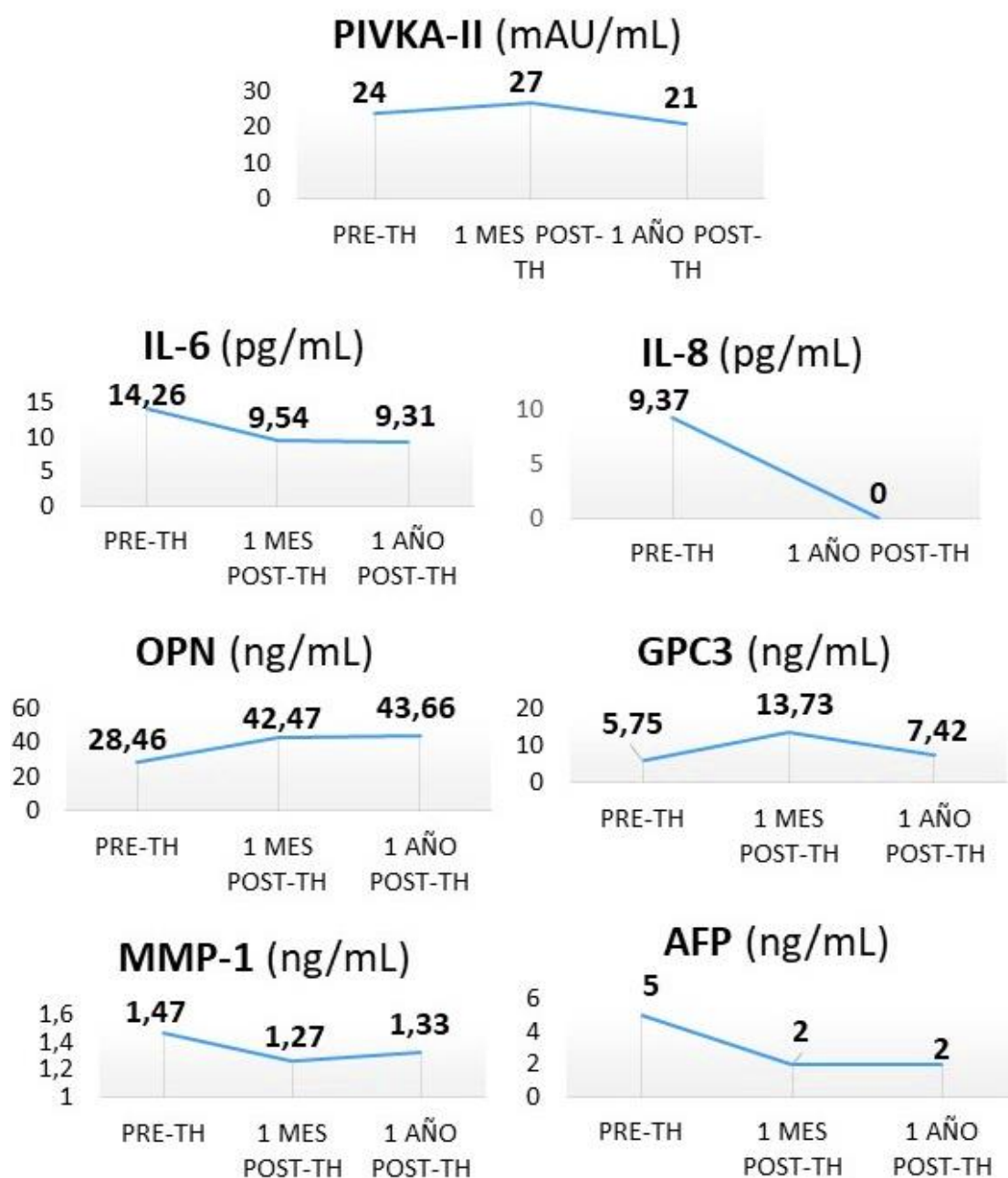


Figura 29. Evolución de los niveles medianos de los marcadores analizados en los pacientes con invasión vascular tras el trasplante.

4.8 EFICACIA DE LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MARCADORES PRE-TRASPLANTE EN LA PREDICCIÓN DE RECIDIVA POST-TRASPLANTE DEL CHC

De los 46 pacientes con CHC reclutados para el presente estudio, 35 fueron trasplantados, de los cuales 4 presentaron recidiva o metástasis tras el trasplante hepático.

En la tabla 75 se muestran los AUC obtenidos tras la elaboración de la curva ROC para cada marcador estudiado, los puntos de corte correspondientes al máximo índice de Youden, así como la sensibilidad y la especificidad de estos para cada marcador. La fórmula del índice de Youden es igual a sensibilidad+especificidad-1 y proporciona un valor entre 0 y 1, que representa la capacidad global de predecir la aparición de recidiva tumoral tras el TOH. Un índice de Youden próximo a 1 significa una sensibilidad y especificidad muy altas, mientras que un valor cercano a 0 representa una condición de escasa o nula sensibilidad y especificidad.

En las figuras 30-43 se muestran las curvas ROC y los índices de Youden para cada marcador estudiado.

Tabla 75. Comparación de los distintos AUC, puntos de corte y su sensibilidad y especificidad de cada marcador. (AUC: Área bajo la curva; IC95%: intervalo de confianza al 95%; S: sensibilidad; E: especificidad; PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; OPN: osteopontina; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1; AFP: alfa-fetoproteína).

Marcador pre-trasplante	AUC (%)	IC95%	p	Punto de corte	S (%)	E (%)
PIVKA-II (mAU/mL)	0,613 (61,3)	0,220-1	0,468	≥592	50	96,8
IL-6 (pg/mL)	0,423 (42,3)	0,183-0,663	0,625	≥5,80	100	23,1
IL-8 (pg/mL)	0,321 (32,1)	0,091-0,552	0,254	≥1,14	75	28,6
OPN (ng/mL)	0,446 (44,6)	0,161-0,732	0,732	≥10,30	100	17,9
GPC3 (ng/mL)	0,484 (48,4)	0,305-0,663	0,917	≥4,67	100	38,7
MMP-1 (ng/mL)	0,573 (57,3)	0,286-0,859	0,641	≥1,31	100	35,5
AFP (ng/mL)	0,544 (54,4)	0,206-0,883	0,776	≥9,65	50	74,2

De todos los AUC obtenidos para cada marcador, únicamente los correspondientes a PIVKA-II, MMP-1 y AFP están por encima del 50%, mínimo valor considerado para que una curva ROC sea capaz de discriminar entre pacientes sanos y enfermos. No obstante, estos resultados no son significativos ($p>0,05$) y el intervalo de confianza del área de la curva ROC (IC95%) en estos 3 casos incluye el valor 0,5, por lo que la prueba no es capaz de discernir entre los pacientes que desarrollarán recidiva y los que no.

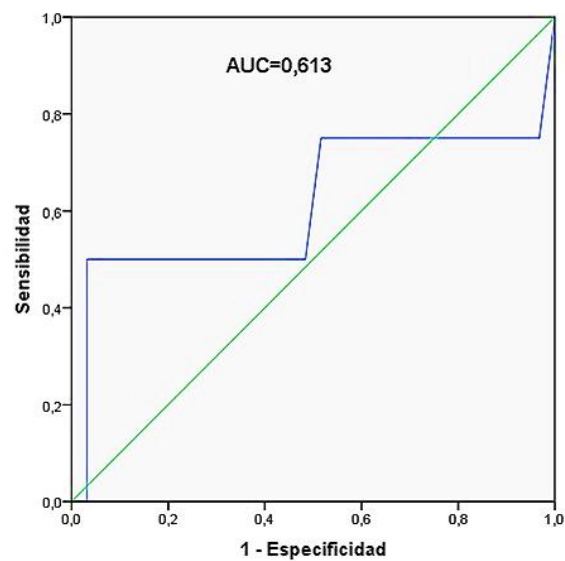


Figura 30. Curva ROC de los niveles de PIVKA-II pre-trasplante para la predicción de recidiva post-trasplante (AUC: área bajo la curva).

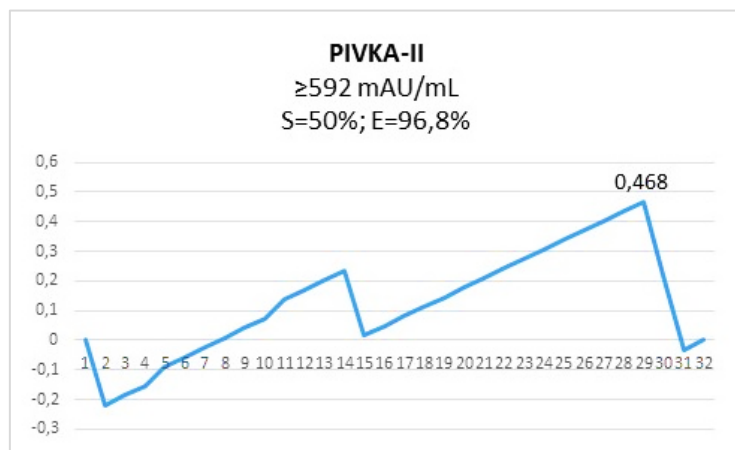


Figura 31. Máximo Índice de Youden para los niveles pre-trasplante de PIVKA-II.

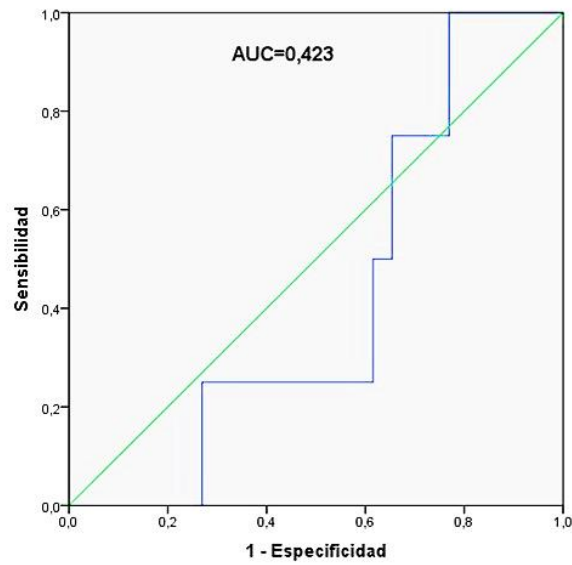


Figura 32. Curva ROC de los niveles de IL-6 pre-trasplante para la predicción de recidiva post-trasplante (AUC: área bajo la curva).

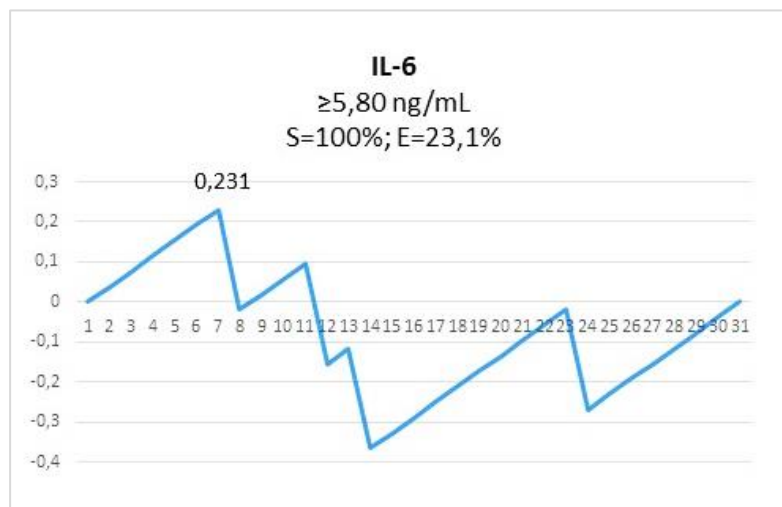


Figura 33. Máximo índice de Youden para los niveles pre-trasplante de IL-6.

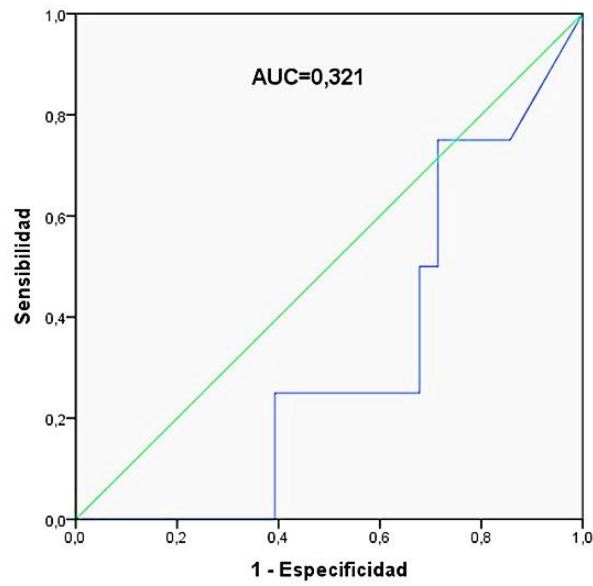


Figura 34. Curva ROC de los niveles de IL-8 pre-trasplante para la predicción de recidiva post-trasplante (AUC: área bajo la curva).

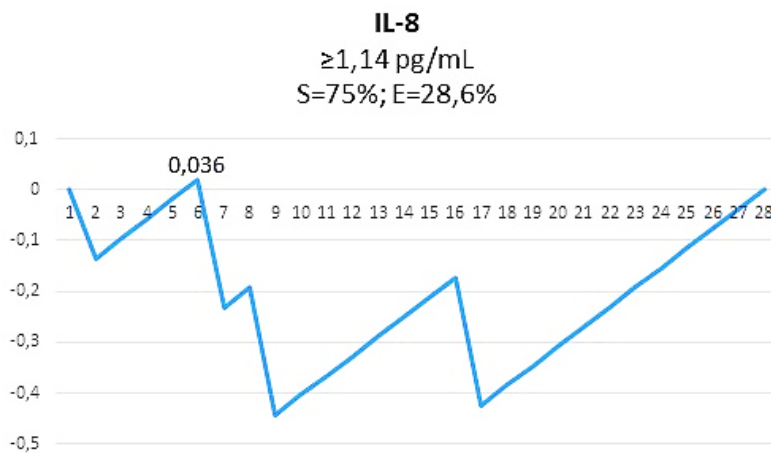


Figura 35. Máximo Índice de Youden de los niveles pre-trasplante de IL-8.

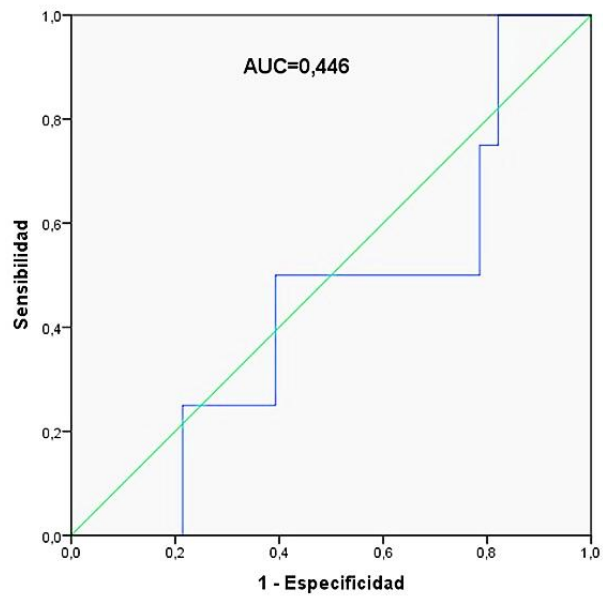


Figura 36. Curva ROC de los niveles de OPN pre-trasplante para la predicción de recidiva post-trasplante (AUC: área bajo la curva).

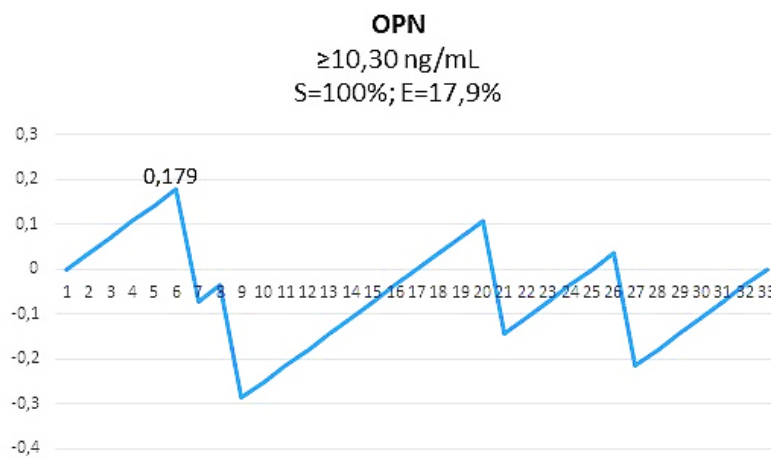


Figura 37. Máximo Índice de Youden de los niveles pre-trasplante de OPN.

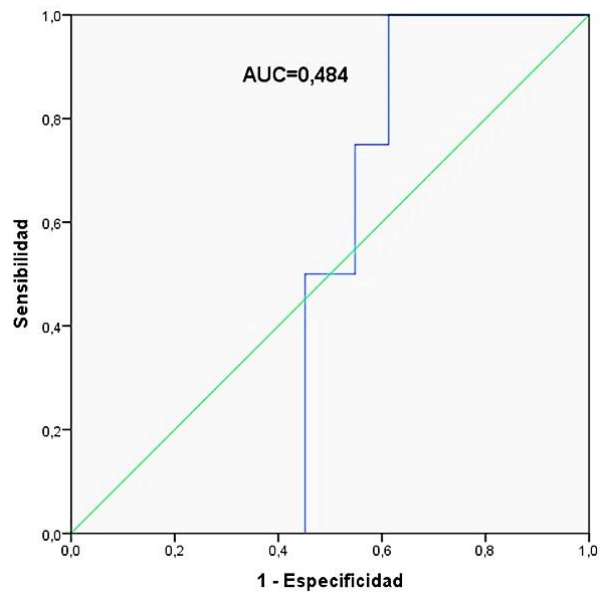


Figura 38. Curva ROC de los niveles de GPC3 pre-trasplante para la predicción de recidiva post-trasplante (AUC: área bajo la curva).

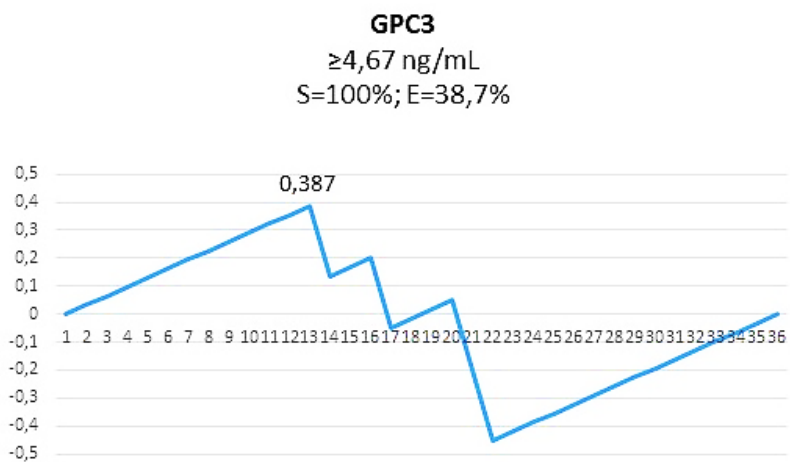


Figura 39. Máximo Índice de Youden de los niveles pre-trasplante de GPC3.

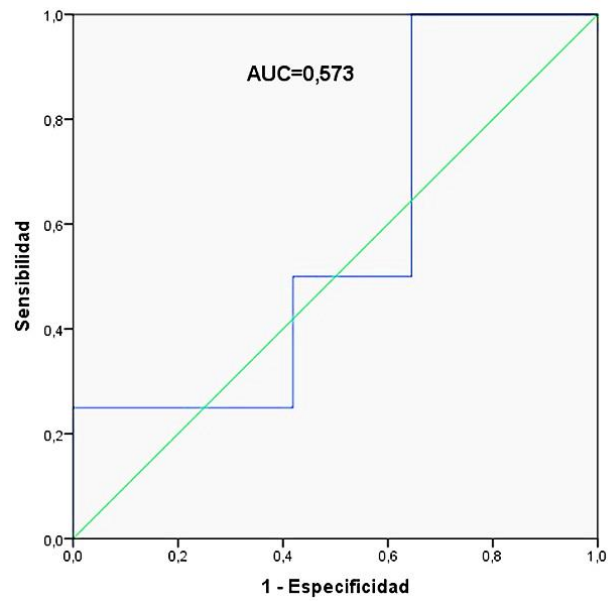


Figura 40. Curva ROC de los niveles de MMP-1 pre-trasplante para la predicción de recidiva post-trasplante (AUC: área bajo la curva).

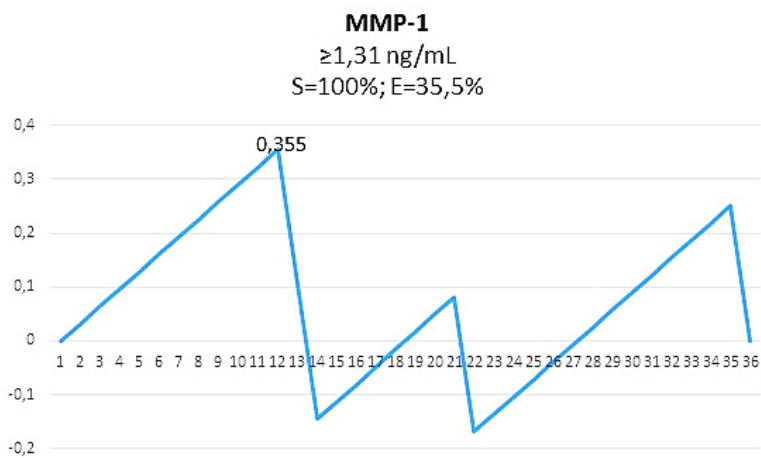


Figura 41. Máximo Índice de Youden de los niveles pre-trasplante de MMP-1.

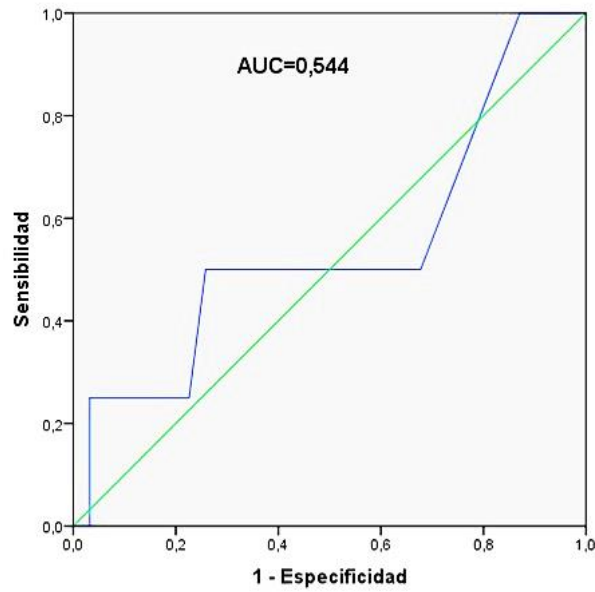


Figura 42. Curva ROC de los niveles de AFP pre-trasplante para la predicción de recidiva post-trasplante (AUC: área bajo la curva).

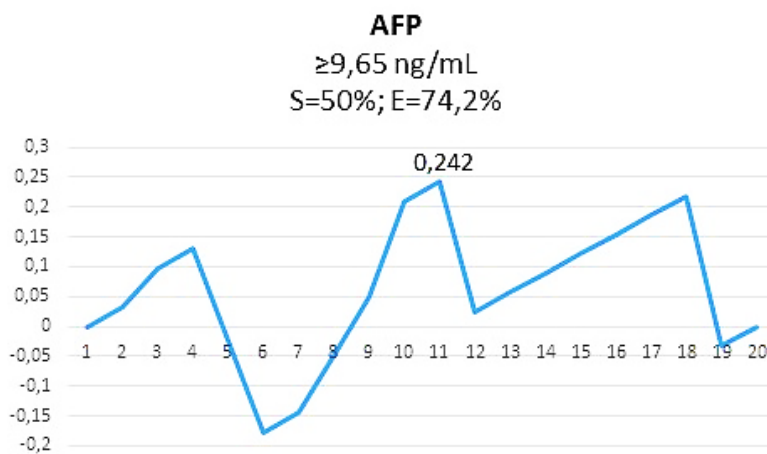


Figura 43. Máximo Índice de Youden de los niveles pre-trasplante de AFP.

Tras construir un modelo mediante regresión logística binaria para cada combinación de marcadores, partiendo de aquellos con un AUC en solitario $>0,5$ (PIVKA-II, AFP y MMP-1) y analizar mediante curva ROC la predicción de recidiva post-trasplante de los niveles pre-trasplante de PIVKA-II + AFP, PIVKA-II + MMP-1, AFP + MMP-1 y PIVKA-II + AFP + MMP-1, se encontró que el uso conjunto de los niveles pre-trasplante de PIVKA-II + AFP era la mejor combinación para predecir recidiva post-trasplante con un AUC de 0,742 (IC95% 0,520-0,964), si bien ninguna de estas combinaciones fue estadísticamente significativa ($p>0,05$) (Tabla 76 y figura 44).

Tabla 76. Comparación de los distintos AUC de las combinaciones de PIVKA-II, AFP y MMP-1. (AUC: Área bajo la curva; IC95%: intervalo de confianza al 95%; S: sensibilidad; E: especificidad; PIVKA-II: proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista-II; AFP: alfa-fetoproteína; MMP-1: metaloproteasa-1).

Combinación de marcadores pre-trasplante	AUC (%)	IC95%	p	S (%)	E (%)
PIVKA-II + AFP	0,742 (74,2%)	0,520-0,964	0,120	100	45,2
PIVKA-II + MMP-1	0,710 (71%)	0,463-0,956	0,178	100	41,9
AFP + MMP-1	0,524 (52,4)	0,225-0,824	0,876	100	35,5
PIVKA-II + AFP + MMP-1	0,694 (69,4%)	0,466-0,921	0,213	75	67,7

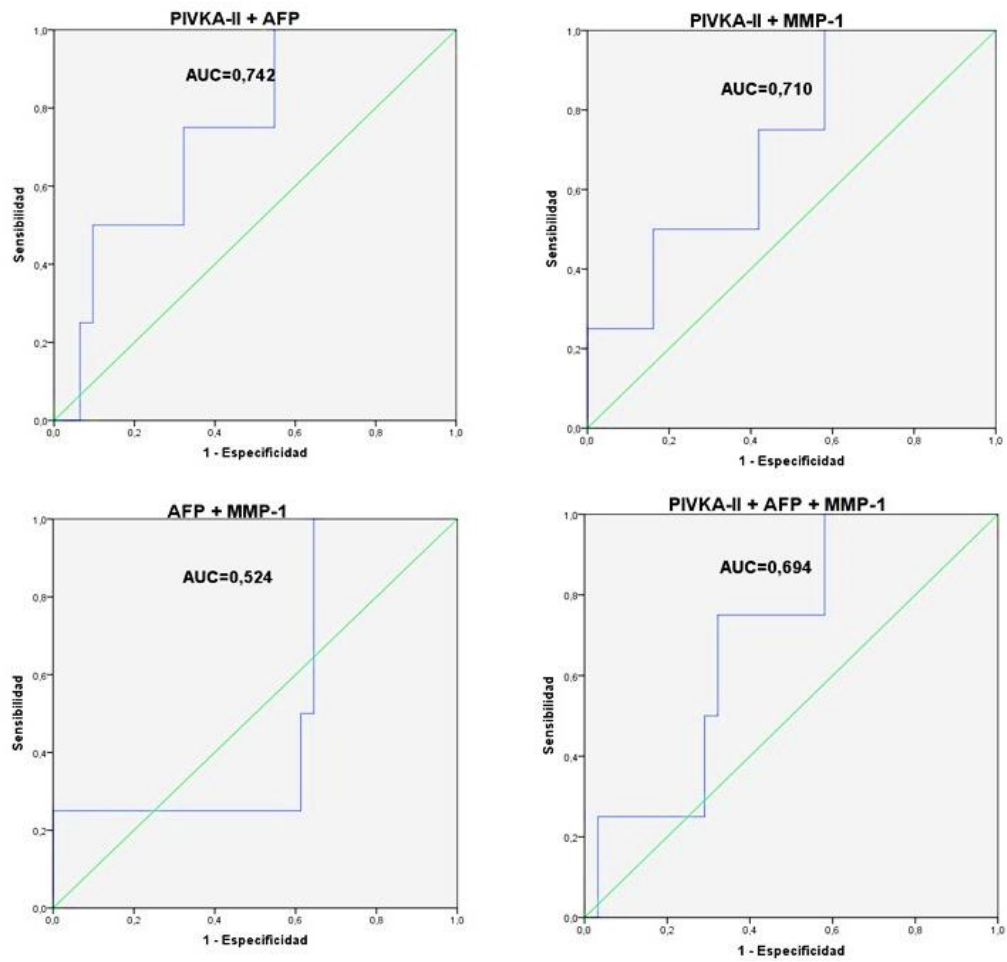


Figura 44. Curvas ROC para cada combinación de marcadores. (AUC: área bajo la curva).

4.9 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA TRAS EL TRASPLANTE

Tras realizar el análisis de la SG y de la SLE tras el TOH de los 35 pacientes trasplantados mediante la curva de supervivencia de Kaplan-Meier, se obtuvo la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva del paciente trasplantado, cuyos resultados se muestran en la tabla 77 y las curvas de supervivencia correspondientes, en la figura 45.

Tabla 77. Supervivencia media general y supervivencia media sin recidiva tras el trasplante de los 35 pacientes trasplantados (IC95%: intervalo de confianza al 95%).

SUPERVIVENCIA POST-TRASPLANTE	
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	64,68 [54,599-74,753]
Al mes	97%
A los 6 meses	97%
Al año	87%
A los 2 años	80%
A los 3 años	77%
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	70,59 [61,98-79,20]
Al mes	100%
A los 6 meses	90%
Al año	90%
A los 2 años	87%
A los 3 años	87%

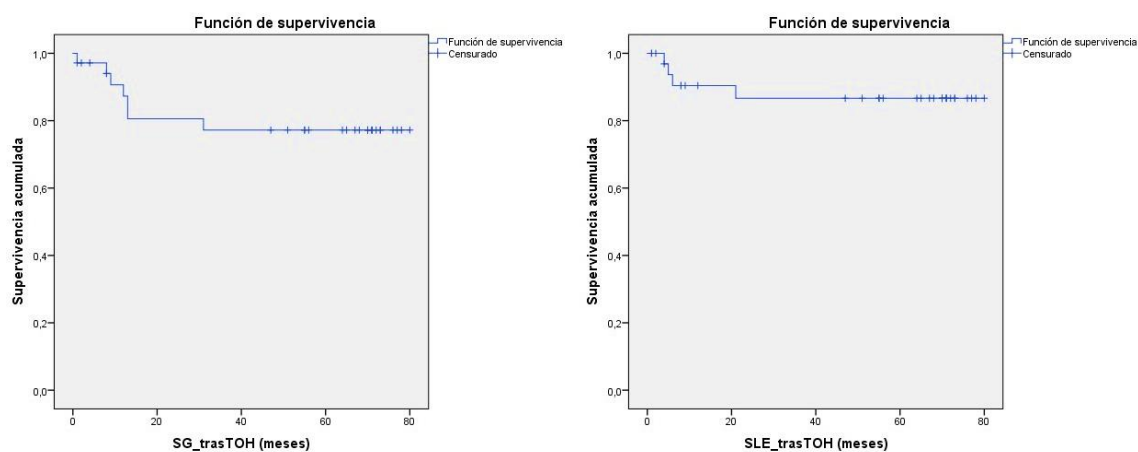


Figura 45. Curvas de SG y de SLE post-trasplante de los pacientes trasplantados.

4.9.1 Comparación de curvas de SG y SLE entre grupos de pacientes con diferentes características clínicas y analíticas

4.9.1.1 PIVKA-II

En la tabla 78 se puede observar el número de pacientes con niveles pre-trasplante de PIVKA-II <592 mAU/mL y \geq 592 mAU/mL y dentro de estos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 78. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con niveles pre-trasplante de PIVKA-II <592 mAU/mL y PIVKA-II \geq 592 mAU/mL.

PIVKA-II Pre-trasplante (mAU/mL)	Nº de pacientes	Recidiva Post-trasplante		Exitus Post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
<592	32	30	2	28	4
\geq 592	3	1	2	0	3

En la tabla 79 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con niveles pre-trasplante de PIVKA <592 mAU/mL y PIVKA-II \geq 592 mAU/mL. Las diferencias entre los grupos de pacientes fueron estadísticamente significativas en ambos casos ($p < 0,05$), según el método de Log Rank (Mantel-Cox), de forma que los pacientes con niveles pre-trasplante de PIVKA-II <592 mAU/mL presentaron una supervivencia media general y una supervivencia media sin recidiva significativamente mayores que el grupo con niveles pre-trasplante de PIVKA-II \geq 592 mAU/mL (figura 46).

Tabla 79. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de PIVKA-II <592 mAU/mL y PIVKA-II ≥592 mAU/mL mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	PIVKA-II <592 mAU/mL	PIVKA-II ≥592 mAU/mL	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	70,54 [61,86-79,21]	9 [1,16-16,84]	15,866 (p<0,001)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	75,09 [68,53-81,66]	5,5 [4,52-6,48]	21,882 (p<0,001)

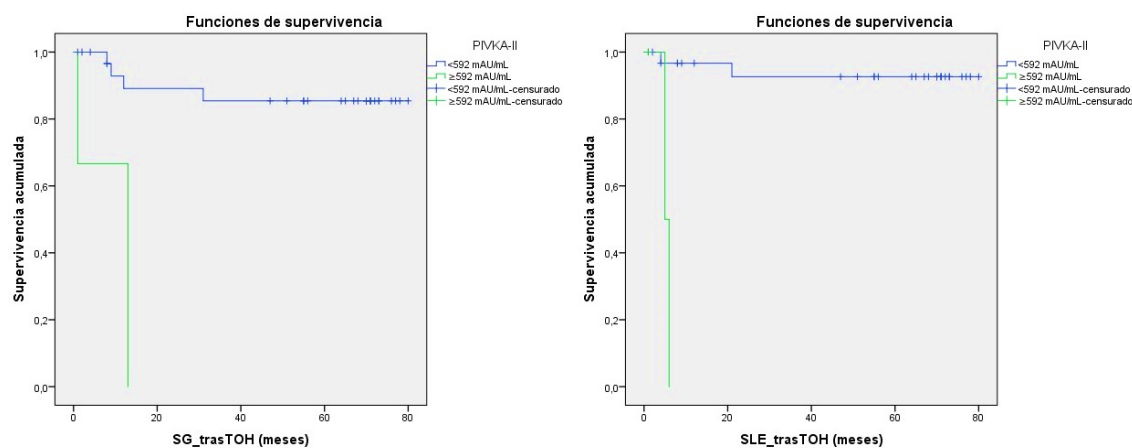


Figura 46. Curvas de SG y de SLE en función del valor pre-trasplante de PIVKA-II según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.2 IL-6

En la tabla 80 se puede observar el número de pacientes con niveles pre-trasplante de IL-6 <5,80 pg/mL y ≥5,80 pg/mL y dentro de estos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 80. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con niveles pre-trasplante de IL-6 <5,80 pg/mL e IL-6 ≥5,80 pg/mL.

IL-6 pre-trasplante (pg/mL)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
<5,80	6	6	0	6	0
≥5,80	24	20	4	17	7

La supervivencia media sin recidiva de los grupos con IL-6 <5,80 pg/mL e IL-6 ≥5,80 pg/mL no pudo calcularse, debido a que ningún paciente del grupo con IL-6 <5,80 pg/mL presentó recidiva post-trasplante. Tampoco pudo calcularse la supervivencia media general ya que ningún paciente del grupo con IL-6 <5,80 pg/mL falleció tras el trasplante (tabla 81). Las diferencias entre los grupos de pacientes no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$) según el método de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia pueden observarse en la figura 47.

Tabla 81. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de IL-6 <5,80 pg/mL e IL-6 ≥5,80 pg/mL mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	IL-6 <5,80 pg/mL	IL-6 ≥5,80 pg/mL	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	-	-	2,026 (p=0,155)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	-	-	1,152 (p=0,283)

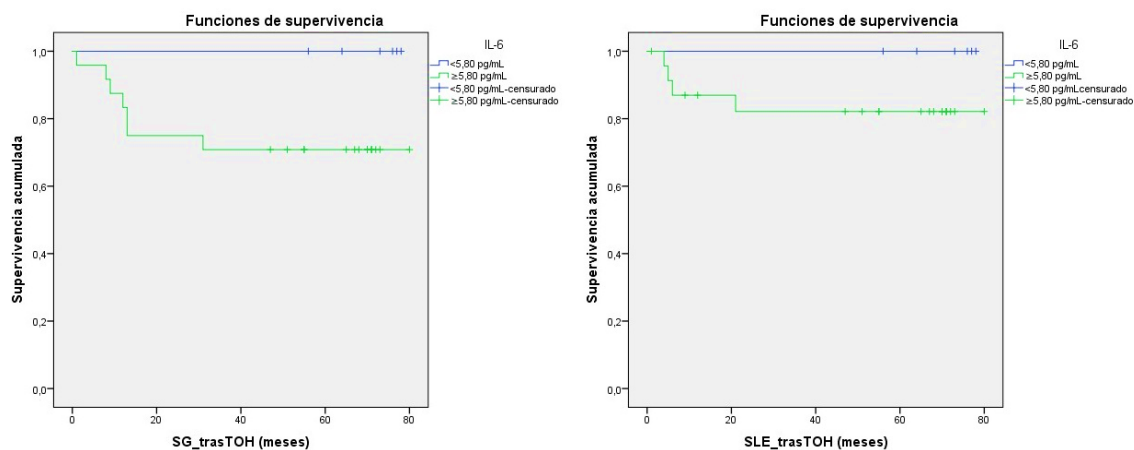


Figura 47. Curvas de SG y de SLE en función del valor pre-trasplante de IL-6 según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.3 IL-8

En la tabla 82 se puede observar el número de pacientes con niveles pre-trasplante de IL-8 $<1,14$ pg/mL y $\geq 1,14$ pg/mL y dentro de estos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 82. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con niveles pre-trasplante de IL-8 $<1,14$ pg/mL e IL-8 $\geq 5,80$ pg/mL.

IL-8 pre-trasplante (pg/mL)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
$<1,14$	8	7	1	7	1
$\geq 1,14$	22	19	3	16	6

En la tabla 83 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con valores pre-trasplante de IL-8 $<1,14$ pg/mL e IL-8 $\geq 1,14$ pg/mL. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para ambos casos no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el método de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 48.

Tabla 83. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de IL-8 <1,14 pg/mL e IL-8 ≥1,14 pg/mL mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	IL-8 <1,14 pg/mL	IL-8 ≥1,14 pg/mL	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	69,25 [53,21-85,29]	61,77 [49,18-74,36]	0,572 (p=0,449)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	68,75 [51,79-85,71]	69,77 [59,03-80,50]	0,008 (p=0,931)

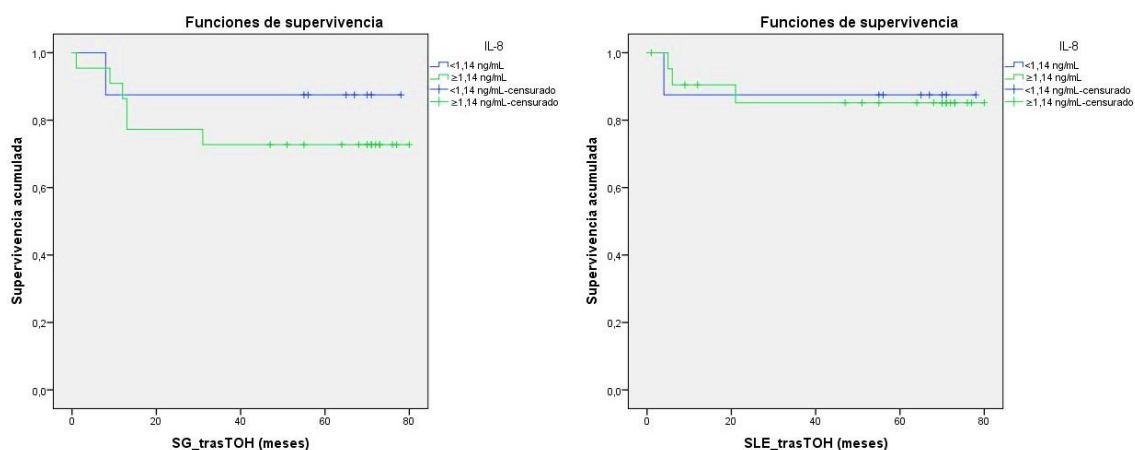


Figura 48. Curvas de SG y de SLE en función del valor pre-trasplante de IL-8 según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.4 OPN

En la tabla 84 se puede observar el número de pacientes con niveles pre-trasplante de OPN <10,30 ng/mL y ≥10,30 ng/mL y dentro de estos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 84. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxitos post-trasplante dentro de los grupos con niveles pre-trasplante de OPN <10,30 ng/mL y OPN ≥10,30 ng/mL.

OPN pre-trasplante (ng/mL)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
<10,30	3	3	0	1	2
≥10,30	27	23	4	22	5

En la tabla 85 se muestra la supervivencia media general en los pacientes con valores pre-trasplante de OPN <10,30 ng/mL y OPN ≥10,30 ng/mL. La supervivencia media sin recidiva de los grupos con OPN <10,30 ng/mL y OPN ≥10,30 ng/mL no pudo calcularse, debido a que ningún paciente del grupo con OPN <10,30 ng/mL presentó recidiva post-trasplante. Las diferencias entre los grupos de pacientes para la supervivencia media general fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), de forma que los pacientes con unos niveles pre-trasplante de OPN ≥10,30 ng/mL presentaron una supervivencia general significativamente mayor que aquellos pacientes con unos niveles pre-trasplante de OPN <10,30 ng/mL. En cambio, las diferencias entre los 2 grupos de pacientes para la supervivencia media sin recidiva no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), según el método de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 49.

Tabla 85. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de OPN <10,30 ng/mL y OPN ≥10,30 ng/mL mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	OPN <10,30 ng/mL	OPN ≥10,30 ng/mL	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	29,67 [0-60,37]	67,63 [57,71-77,55]	4,892 (p=0,027)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	-	-	0,404 (p=0,525)

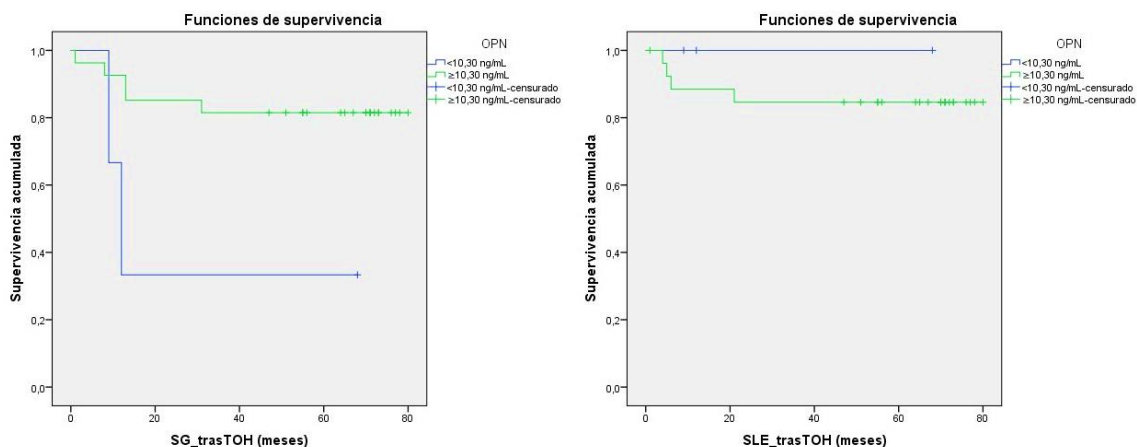


Figura 49. Curvas de SG y de SLE en función del valor pre-trasplante de OPN según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.5 GPC3

En la tabla 86 se puede observar el número de pacientes con niveles pre-trasplante de GPC3 $<4,67 \text{ ng/mL}$ y GPC3 $\geq 4,67 \text{ ng/mL}$ y dentro de estos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 86. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con niveles pre-trasplante de GPC3 $<4,67 \text{ ng/mL}$ y GPC3 $\geq 4,67 \text{ ng/mL}$.

GPC3 pre-trasplante (ng/mL)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
<4,67	7	7	0	6	1
$\geq 4,67$	23	19	4	17	6

En la tabla 87 se muestra la supervivencia media general en los pacientes con valores pre-trasplante de GPC3 $<4,67 \text{ ng/mL}$ y GPC3 $\geq 4,67 \text{ ng/mL}$. La supervivencia media sin recidiva de los grupos con GPC3 $<4,67 \text{ ng/mL}$ y GPC3 $\geq 4,67 \text{ ng/mL}$ no pudo calcularse, debido a que ningún paciente del grupo con GPC3 $<4,67 \text{ ng/mL}$ presentó recidiva post-trasplante. En

ambos casos las diferencias entre los grupos de pacientes no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), según el método de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 50.

Tabla 87. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de GPC3 $< 4,67$ ng/mL y GPC3 $\geq 4,67$ ng/mL mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	GPC3 $< 4,67$ ng/mL	GPC3 $\geq 4,67$ ng/mL	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	69,86 [51,45-88,26]	61,04 [49,23-72,86]	0,347 ($p=0,556$)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	-	-	1,335 ($p=0,248$)

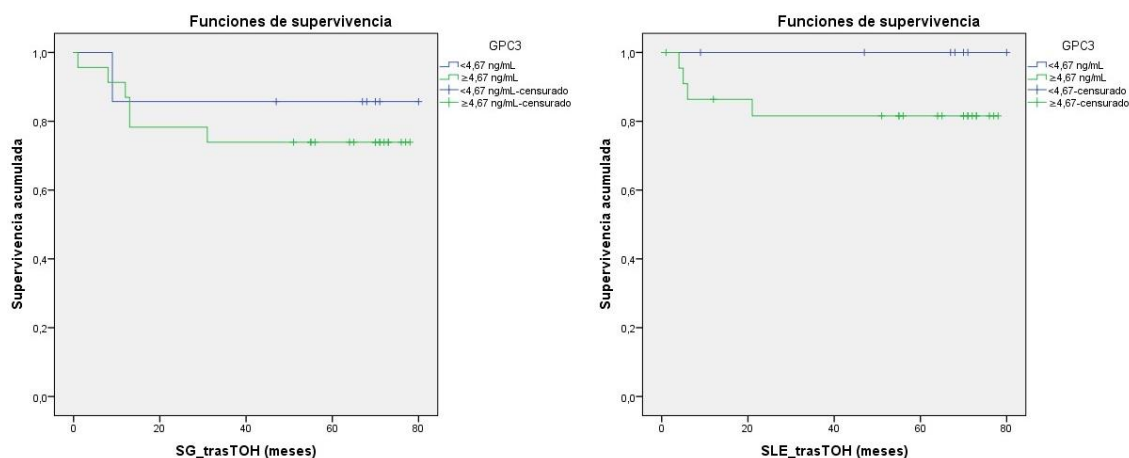


Figura 50. Curvas de SG y de SLE en función del valor pre-trasplante de GPC3 según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.6 MMP-1

En la tabla 88 se puede observar el número de pacientes con niveles pre-trasplante de MMP-1 <1,31 ng/mL y MMP-1 ≥1,31 ng/mL y dentro de estos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 88. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con niveles pre-trasplante de MMP-1 <1,31 ng/mL y MMP-1 ≥1,31 ng/mL.

MMP-1 pre-trasplante (ng/mL)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
<1,31	11	11	0	9	2
≥1,31	19	15	4	14	5

En la tabla 89 se muestra la supervivencia media general en los pacientes con valores pre-trasplante de MMP-1 <1,31 ng/mL y MMP-1 ≥1,31 ng/mL. La supervivencia media sin recidiva de los grupos con MMP-1 <1,31 ng/mL y MMP-1 ≥1,31 ng/mL no pudo calcularse, debido a que ningún paciente del grupo con MMP-1 <1,31 ng/mL presentó recidiva post-trasplante. En ambos casos las diferencias entre los grupos de pacientes no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$), según el método de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 51.

Tabla 89. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de MMP-1 <1,31 ng/mL y MMP-1 ≥1,31 ng/mL mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	MMP-1 <1,31 ng/mL	MMP-1 ≥1,31 ng/mL	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	64,09 [49,16-79,03]	62,42 [49-75,85]	0,207 (p=0,649)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	-	-	2,545 (p=0,111)

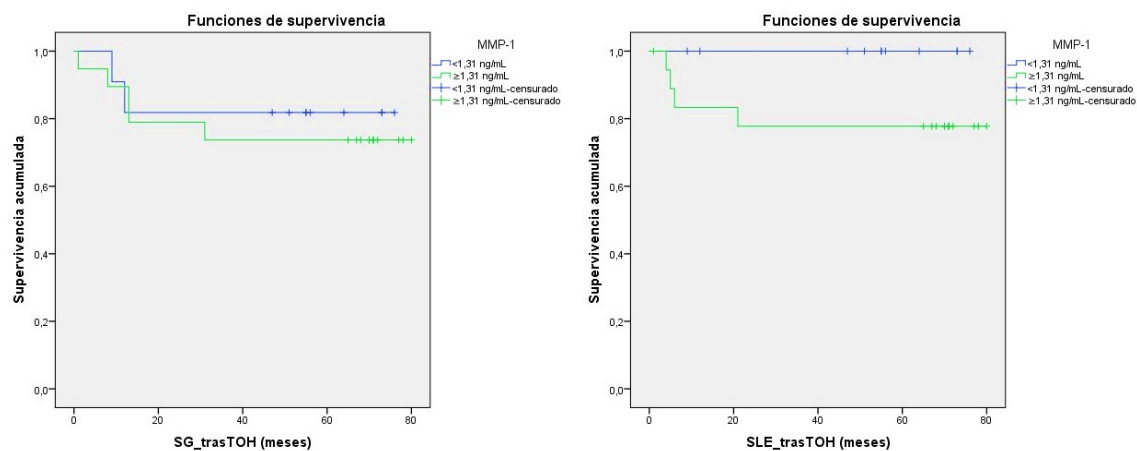


Figura 51. Curvas de SG y de SLE en función del valor pre-trasplante de MMP-1 según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.7 AFP

En la tabla 90 se puede observar el número de pacientes con niveles pre-trasplante de AFP $< 9,65 \text{ ng/mL}$ y AFP $\geq 9,65 \text{ ng/mL}$ y dentro de estos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 90. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con niveles pre-trasplante de AFP $< 9,65 \text{ ng/mL}$ y AFP $\geq 9,65 \text{ ng/mL}$.

AFP pre-trasplante (ng/mL)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
$< 9,65$	25	23	2	21	4
$\geq 9,65$	10	8	2	7	3

En la tabla 91 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con valores pre-trasplante de AFP $< 9,65 \text{ ng/mL}$ y AFP $\geq 9,65 \text{ ng/mL}$. En ambos casos las diferencias entre los grupos de pacientes no fueron estadísticamente

significativas ($p > 0,05$), según el método de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia pueden observarse en la figura 52.

Tabla 91. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de AFP $< 9,65$ ng/mL y AFP $\geq 9,65$ ng/mL mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	AFP $< 9,65$ ng/mL	AFP $\geq 9,65$ ng/mL	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	66,77 [56,70-76,84]	54,23 [30,57-77,89]	1,558 (p=0,212)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	72,13 [64,35-79,90]	58,43 [33,16-83,70]	2,257 (p=0,133)

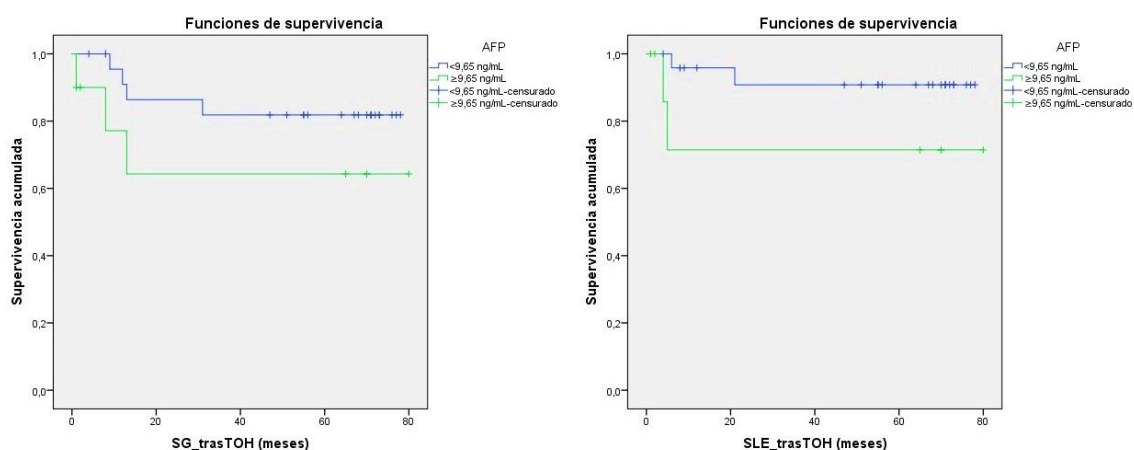


Figura 52. Curvas de SG y de SLE en función del valor pre-trasplante de AFP según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.8 Número de LOES

En la tabla 92 se puede observar el número de pacientes con 1 LOE y con > 1 LOE y dentro de estos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 92. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxitos post-trasplante dentro de los grupos con 1 LOE y con >1 LOE.

Nº de LOES	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
1 LOE	17	16	1	16	1
>1 LOE	18	15	3	12	6

En la tabla 93 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con 1 LOE y con >1 LOE. Según el método de Log Rank (Mantel-Cox), las diferencias entre los grupos de pacientes fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para la supervivencia media general, de forma que los pacientes con una única LOE presentaron una supervivencia media general significativamente mayor que aquellos con más de una LOE. En cambio, las diferencias entre ambos grupos de pacientes para la supervivencia media sin recidiva no fueron significativas ($p > 0,05$). Las curvas de supervivencia pueden observarse en la figura 53.

Tabla 93. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con 1 LOE y >1 LOE mediante el test de Log Rank (LOE: lesión ocupante de espacio).

SUPERVIVENCIA POST-TOH	1 LOE	>1 LOE	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	72,688 [64,50-80,87]	53,89 [37,35-70,43]	4,179 (p=0,041)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	72,44 [63,78-82]	64,95 [49,80-80,11]	1,220 (p=0,269)

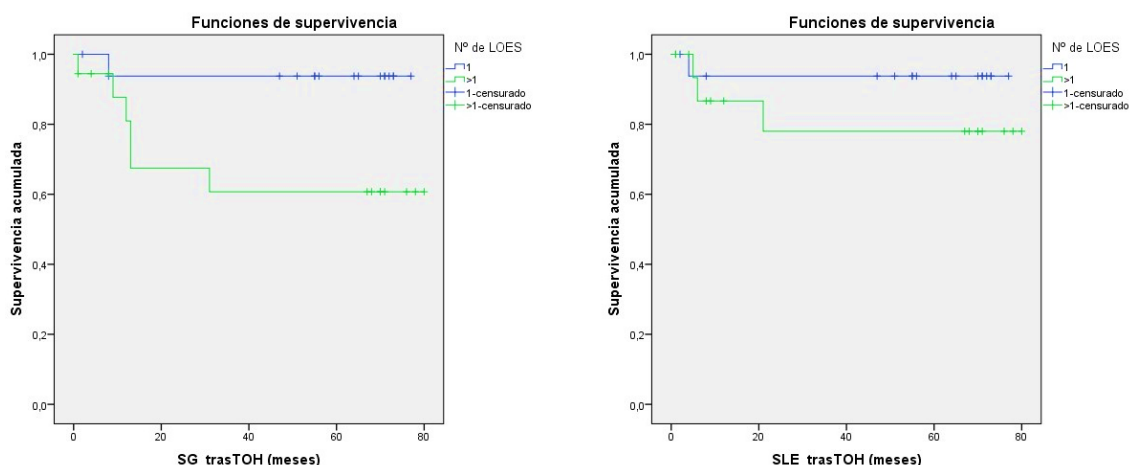


Figura 53. Curvas de SG y de SLE en función del número de LOES según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.9 Tamaño tumoral

En la tabla 94 se puede observar el número de pacientes con tamaño tumoral ≤ 3 cm y >3 cm y dentro de estos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 94. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxitos post-trasplante dentro de los grupos con tamaño tumoral ≤ 3 cm y >3 cm.

Tamaño tumoral	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
≤ 3 cm	29	26	3	24	5
>3 cm	6	5	1	4	2

En la tabla 95 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con tamaño tumoral ≤ 3 cm y >3 cm. Las diferencias entre los grupos de pacientes para ambos casos no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 54.

Tabla 95. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con tamaño tumoral ≤ 3 cm y >3 cm mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	Tamaño tumoral ≤ 3 cm	Tamaño tumoral >3 cm	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	64,23 [53,45-75]	58,67 [33,55-83,78]	0,486 (p=0,486)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	68,20 [47,51-88,89]	66,60 [49,84-83,36]	0,152 (p=0,697)

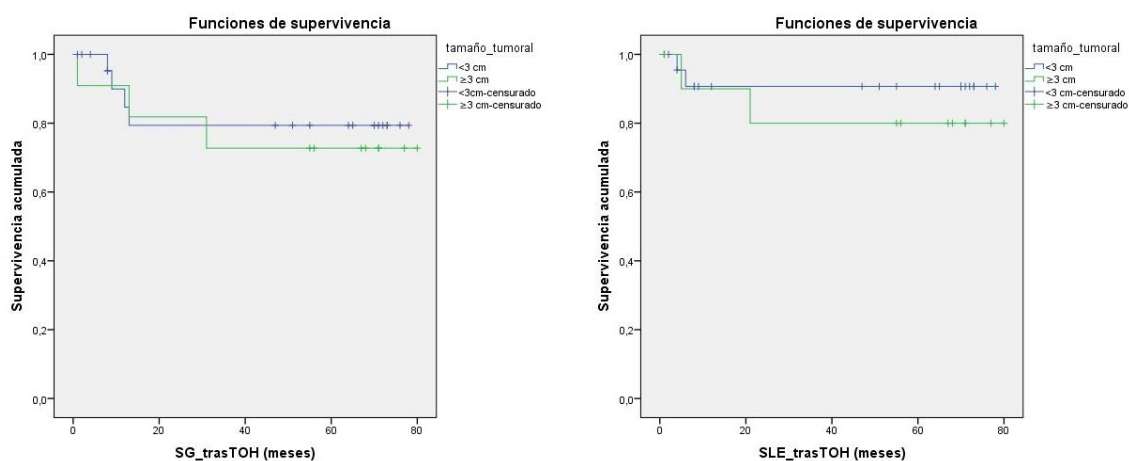


Figura 54. Curvas de SG y de SLE en función del tamaño tumoral según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.10 Invasión vascular

En la tabla 96 se puede observar el número de pacientes con invasión vascular tumoral y sin invasión vascular tumoral, y dentro de ambos grupos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 96. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxitos post-trasplante dentro de los grupos con invasión vascular y sin invasión vascular.

Invasión vascular	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
No	27	24	3	21	6
Sí	3	2	1	2	1

En la tabla 97 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con invasión vascular y sin invasión vascular. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para ambos casos no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia pueden observarse en la figura 55.

Tabla 97. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con invasión vascular y sin invasión vascular mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	Sin Invasión Vascular	Con Invasión Vascular	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	64,48 [53,45-75,51]	51,67 [20,73-82,61]	0,086 (p=0,770)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	71,52 [62,50-80,55]	49 [13,79-84,21]	1,130 (p=0,288)

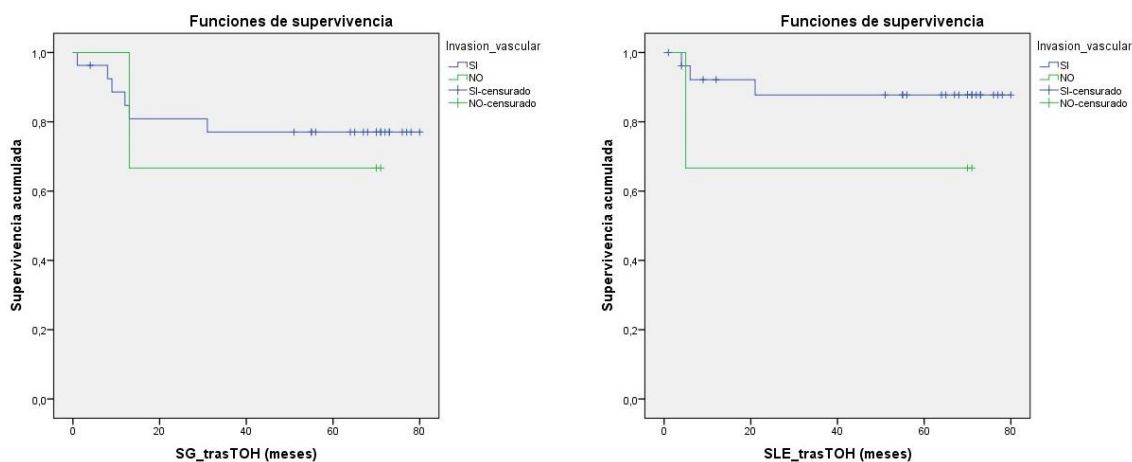


Figura 55. Curvas de SG y de SLE en función de la presencia o no de invasión vascular tumoral según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.11 Necrosis tumoral

En la tabla 98 se puede observar el número de pacientes con necrosis tumoral y sin necrosis tumoral, y dentro de ambos grupos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 98. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con necrosis tumoral y sin necrosis tumoral.

Necrosis Tumoral	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
No	13	12	1	11	2
Sí	22	19	3	17	5

En la tabla 99 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con necrosis tumoral y sin necrosis tumoral. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para ambos casos no fueron estadísticamente significativas

($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 56.

Tabla 99. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con necrosis tumoral y sin necrosis tumoral mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	Sin Necrosis Tumoral	Con Necrosis Tumoral	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	63,44 [45,65-81,24]	64,19 [51,90-76,48]	0,043 (p=0,835)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	70,70 [57,13-84,27]	69,72 [58,93-80,50]	0,090 (p=0,765)

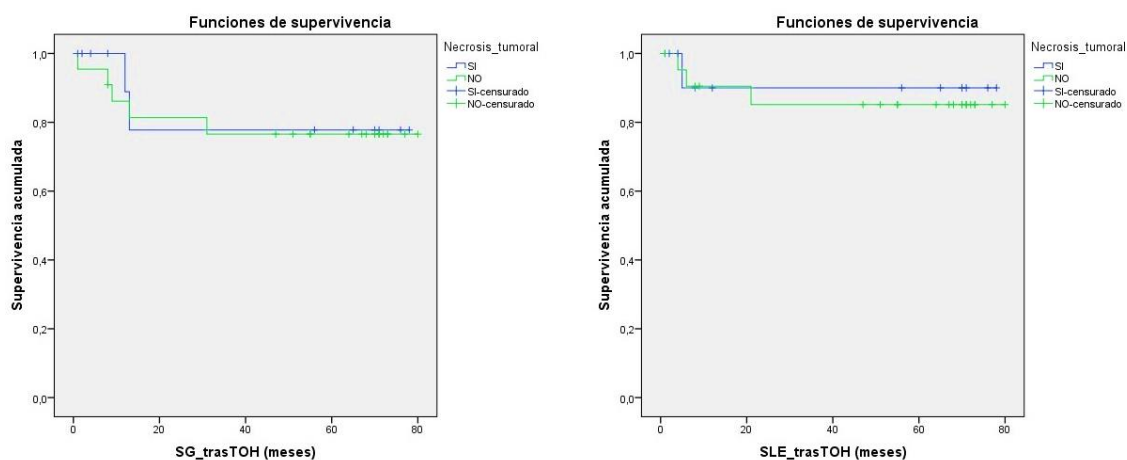


Figura 56. Curvas de SG y de SLE en función de la presencia o no de necrosis tumoral según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.12 TACES pre-trasplante

En la tabla 100 se puede observar el número de pacientes que se sometieron a TACES antes de la extracción de la muestra pre-trasplante y los que no, y dentro de ambos grupos,

el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 100. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos TACES pre-trasplante sí o TACES pre-trasplante no.

TACES pre-trasplante	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
Sí	26	23	3	20	6
No	9	8	1	8	1

En la tabla 101 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes que se sometieron a TACEs pre-trasplante y los que no. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para ambos casos no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 57.

Tabla 101. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes sometidos a TACEs pre-trasplante y aquellos que no mediante el test de Log Rank.

SUPERVIVENCIA POST-TOH	TACES SÍ	TACES NO	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	62,88 [50,95-74,83]	61,14 [45,07-77,22]	0,322 (p=0,570)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	70,79 [61,05-80,52]	61,75 [46,62-76,88]	0,012 (p=0,911)

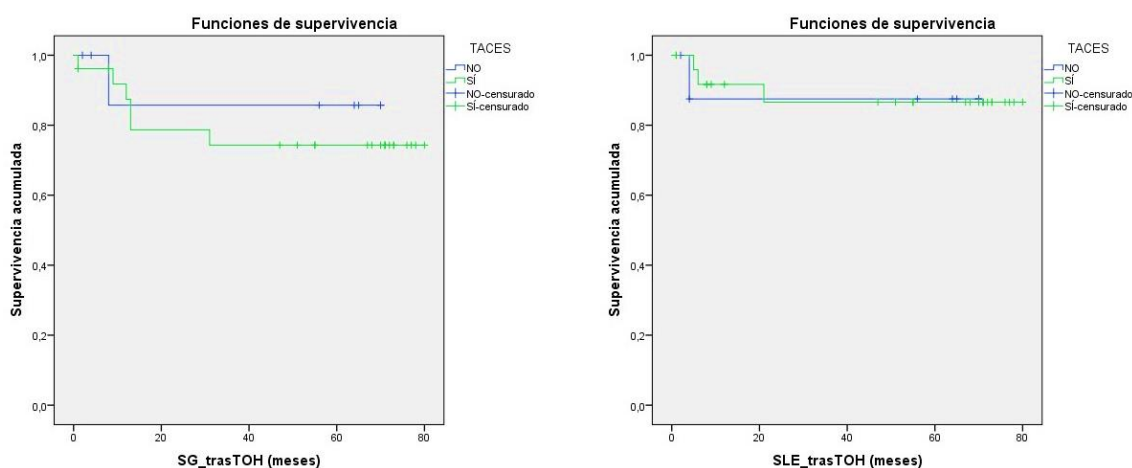


Figura 57. Curvas de SG y de SLE en función del tratamiento pre-trasplante con TACEs según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.13 PCR

En la tabla 102 se puede observar el número de pacientes con niveles de PCR pre-trasplante $\leq 0,50$ mg/dL y $>0,50$ mg/dL, y dentro de ambos grupos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 102. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con PCR $\leq 0,50$ mg/dL y $>0,50$ mg/dL (PCR: proteína C reactiva).

PCR (mg/dL)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
$\leq 0,50$	19	17	2	16	3
$>0,50$	15	13	2	11	4

En la tabla 103 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con niveles de PCR pre-trasplante $\leq 0,50$ mg/dL y $>0,50$ mg/dL. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para ambos casos no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 58.

Tabla 103. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de PCR $\leq 0,50$ mg/dL y $> 0,50$ mg/dL mediante el test de Log Rank (PCR: proteína C reactiva).

SUPERVIVENCIA POST-TOH	PCR $\leq 0,50$ mg/dL	PCR $> 0,50$ mg/dL	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	68,24 [56,02-80,45]	56,92 [40,38-73,46]	0,530 (p=0,467)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	71,80 [61,11-82,49]	66 [51,98-80,02]	0,100 (p=0,752)

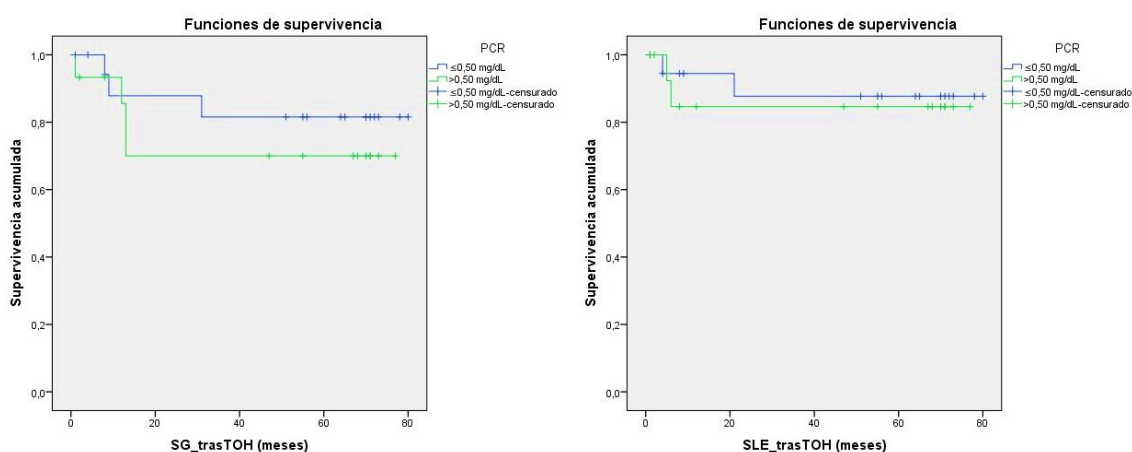


Figura 58. Curvas de SG y de SLE en función de los niveles pre-trasplante de PCR según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.14 NLR

En la tabla 104 se puede observar el número de pacientes con niveles de NLR pre-trasplante $\leq 3,13$ y $> 3,13$ mg/dL, y dentro de ambos grupos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 104. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxitos post-trasplante dentro de los grupos con NLR $\leq 3,13$ y $> 3,13$ (NLR: ratio neutrófilos-linfocitos).

NLR	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
$\leq 3,13$	27	24	3	22	5
$> 3,13$	8	7	1	6	2

En la tabla 105 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con niveles de NLR pre-trasplante $\leq 3,13$ mg/dL y $> 3,13$. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para ambos casos no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 59.

Tabla 105. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de NLR $\leq 3,13$ y $> 3,13$ mediante el test de Log Rank (NLR: ratio neutrófilos-linfocitos).

SUPERVIVENCIA POST-TOH	NLR $\leq 3,13$	NLR $> 3,13$	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	63,87 [52,78-74,95]	62,50 [41,48-83,52]	0,067 (p=0,796)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	68,80 [59,11-78,50]	70,50 [53,08-87,92]	0,001 (p=0,977)

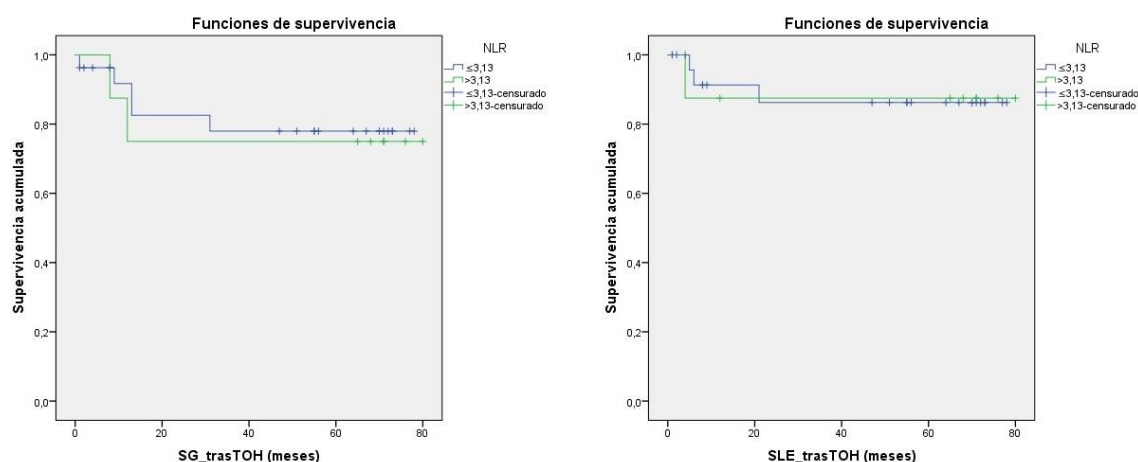


Figura 59. Curvas de SG y de SLE en función de los niveles pre-trasplante de NLR según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.15 LDH

En la tabla 106 se puede observar el número de pacientes con niveles de LDH pre-trasplante ≤ 225 U/L y > 225 U/L, y dentro de ambos grupos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 106. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con LDH ≤ 225 U/L y > 225 U/L (NLR: ratio neutrófilos-linfocitos).

LDH (U/L)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
≤ 225	25	21	4	19	6
> 225	7	7	0	6	1

En la tabla 107 se muestra la supervivencia media general en los pacientes con niveles de LDH pre-trasplante ≤ 225 U/L y > 225 U/L. La supervivencia media sin recidiva de los grupos con LDH pre-trasplante ≤ 225 U/L y > 225 U/L no pudo calcularse, debido a que ningún paciente del grupo con LDH > 225 U/L presentó recidiva post-trasplante. En ambos casos las diferencias entre los grupos de pacientes no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$),

según el método de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 60.

Tabla 107. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de LDH ≤ 225 U/L y >225 U/L mediante el test de Log Rank (LDH: lactato deshidrogenasa).

SUPERVIVENCIA POST-TOH	LDH ≤ 225 U/L	LDH >225 U/L	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	59,14 [46,34-71,94]	68,71 [48,24-89,19]	0,416 (p=0,519)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	-	-	1,244 (p=0,265)

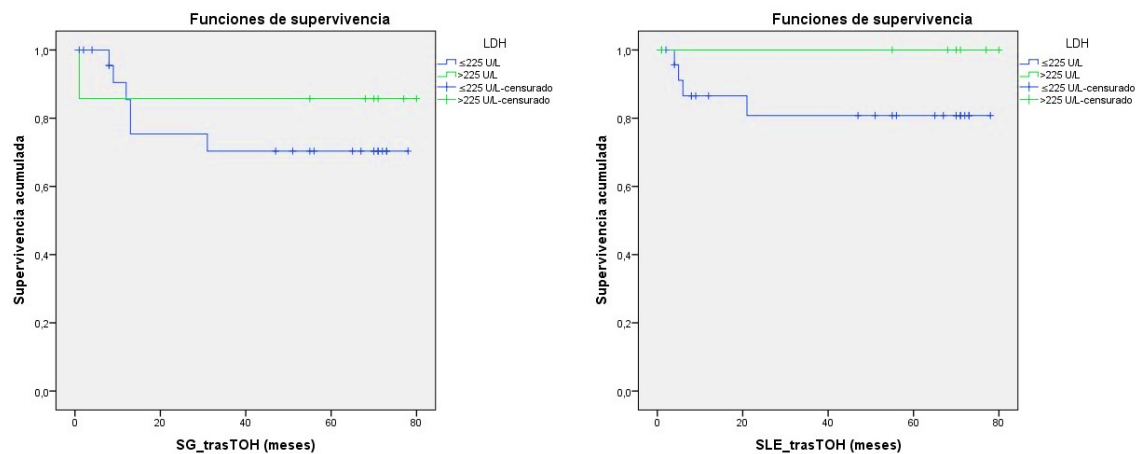


Figura 60. Curvas de SG y de SLE en función de los niveles pre-trasplante de LDH según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.16 GOT

En la tabla 108 se puede observar el número de pacientes con niveles de GOT pre-trasplante ≤ 40 U/L y >40 U/L, y dentro de ambos grupos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 108. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxitos post-trasplante dentro de los grupos con GOT ≤ 40 y >40 (GOT: transaminasa glutámico-oxalacética).

GOT (U/L)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
≤ 40	16	14	2	12	4
>40	18	16	2	15	3

En la tabla 109 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con niveles pre-trasplante de GOT ≤ 40 U/L y >40 U/L. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para ambos casos no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia pueden observarse en la figura 61.

Tabla 109. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de GOT ≤ 40 U/L y >40 U/L mediante el test de Log Rank (GOT: transaminasa glutámico-oxalacética).

SUPERVIVENCIA POST-TOH	GOT ≤ 40 U/L	GOT >40 U/L	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	58,48 [43-73,95]	67,17 [54-80]	0,507 ($p=0,477$)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	67,19 [54,57-79,81]	70,07 [57,25-82,88]	0,004 ($p=0,947$)

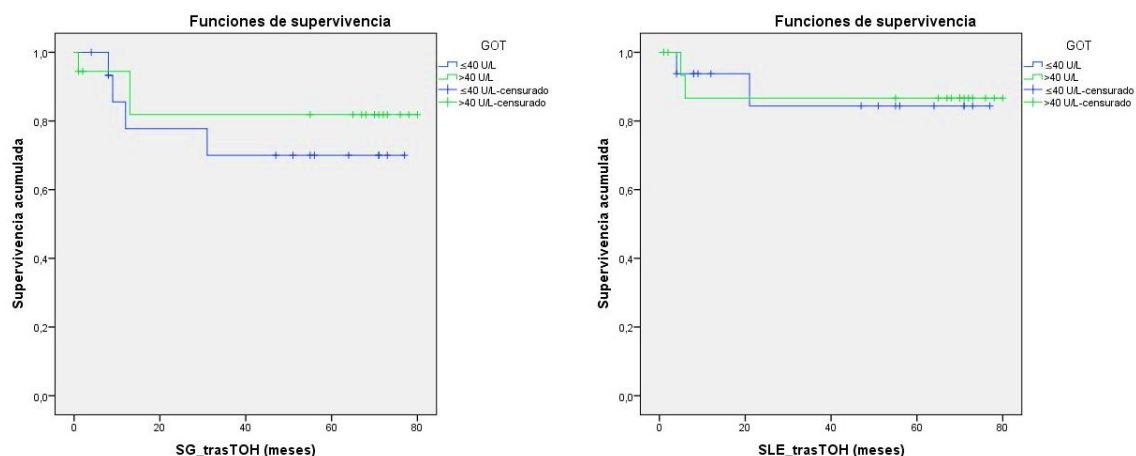


Figura 61. Curvas de SG y de SLE en función de los niveles pre-trasplante de GOT según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.17 GPT

En la tabla 110 se puede observar el número de pacientes con niveles de GPT pre-trasplante ≤ 41 U/L y > 41 U/L, y dentro de ambos grupos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 110. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con GPT ≤ 41 y > 41 (GPT: transaminasa glutámico-pirúvica).

GPT (U/L)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
≤ 41	23	20	3	18	5
> 41	11	10	1	9	2

En la tabla 111 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con niveles pre-trasplante de GPT ≤ 41 mg/dL y > 41 U/L. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para ambos casos no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 62.

Tabla 111. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de GPT ≤ 41 U/L y >41 U/L mediante el test de Log Rank (GPT: transaminasa glutámico-pirúvica).

SUPERVIVENCIA POST-TOH	GPT ≤ 41 U/L	GPT >41 U/L	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	59,97 [47,07-72,87]	66,73 [50,02-83,44]	0,226 (p=0,634)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	66,31 [55,16-77,45]	72,60 [58,84-86,36]	0,190 (p=0,663)

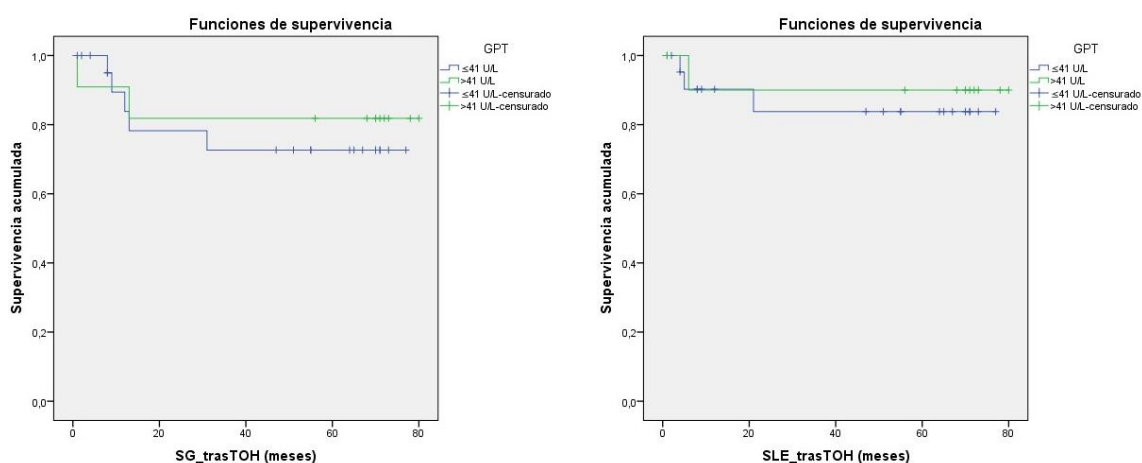


Figura 62. Curvas de SG y de SLE en función de los niveles pre-trasplante de GPT según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.18 GGT

En la tabla 112 se puede observar el número de pacientes con niveles de GGT pre-trasplante ≤ 71 y >71 U/L, y dentro de ambos grupos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 112. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxitos post-trasplante dentro de los grupos con GGT ≤ 71 U/L y >71 U/L (GGT: gamma glutamil transferasa).

GGT (U/L)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
≤ 71	13	11	2	10	3
>71	22	20	2	18	4

En la tabla 113 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con niveles de GGT pre-trasplante ≤ 71 U/L y >71 U/L. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para ambos casos no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 63.

Tabla 113. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de GGT ≤ 71 U/L y >71 U/L mediante el test de Log Rank (GGT: gamma glutamil transferasa).

SUPERVIVENCIA POST-TOH	GGT ≤ 71 U/L	GGT >71 U/L	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	55,58 [41,36-69,80]	65,91 [53,47-78,34]	0,043 ($p=0,837$)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	60 [47,25-72,75]	72,12 [61,82-82,42]	0,171 ($p=0,679$)

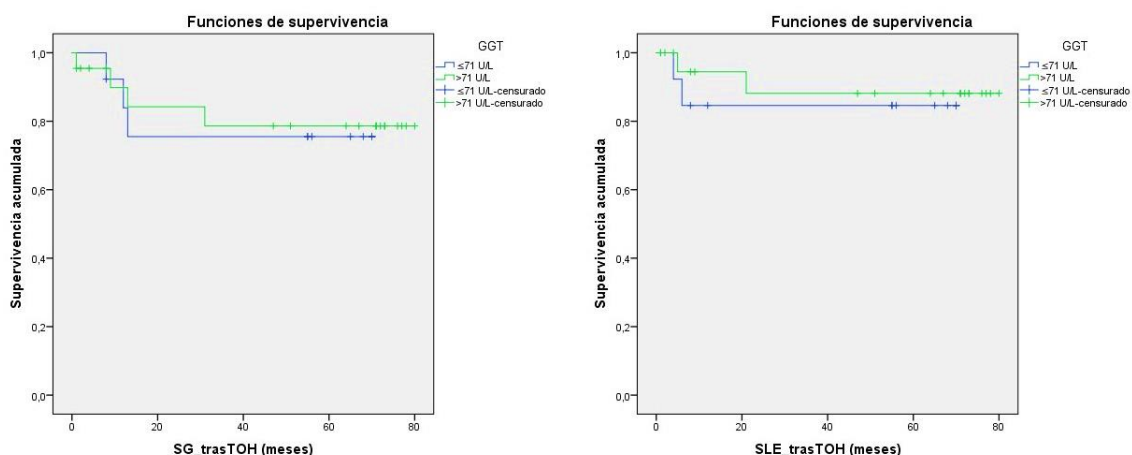


Figura 63. Curvas de SG y de SLE en función de los niveles pre-trasplante de GGT según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.19 Bilirrubina

En la tabla 114 se puede observar el número de pacientes con niveles de bilirrubina pre-trasplante $<1,20$ mg/dL y $\geq 1,20$ mg/dL, y dentro de ambos grupos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 114. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxito post-trasplante dentro de los grupos con bilirrubina $<1,20$ mg/dL y $\geq 1,20$ mg/dL (BT: bilirrubina total).

BT (mg/dL)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
$<1,20$	23	20	3	18	5
$\geq 1,20$	12	11	1	10	2

En la tabla 115 se muestra la supervivencia media general y la supervivencia media sin recidiva en los pacientes con niveles pre-trasplante de bilirrubina $<1,20$ mg/dL y $\geq 1,20$ mg/dL. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para ambos casos no fueron

estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 64.

Tabla 115. Comparación de la SG y de la SLE entre pacientes con niveles pre-trasplante de bilirrubina $< 1,20$ mg/dL y $\geq 1,20$ mg/dL mediante el test de Log Rank (BT: bilirrubina total).

SUPERVIVENCIA POST-TOH	BT $< 1,20$ mg/dL	BT $\geq 1,20$ mg/dL	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	61,60 [49,07-74,13]	67,28 [51,21-83,35]	0,181 (p=0,671)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	67,71 [56,93-78,48]	72,60 [58,84-86,36]	0,149 (p=0,699)

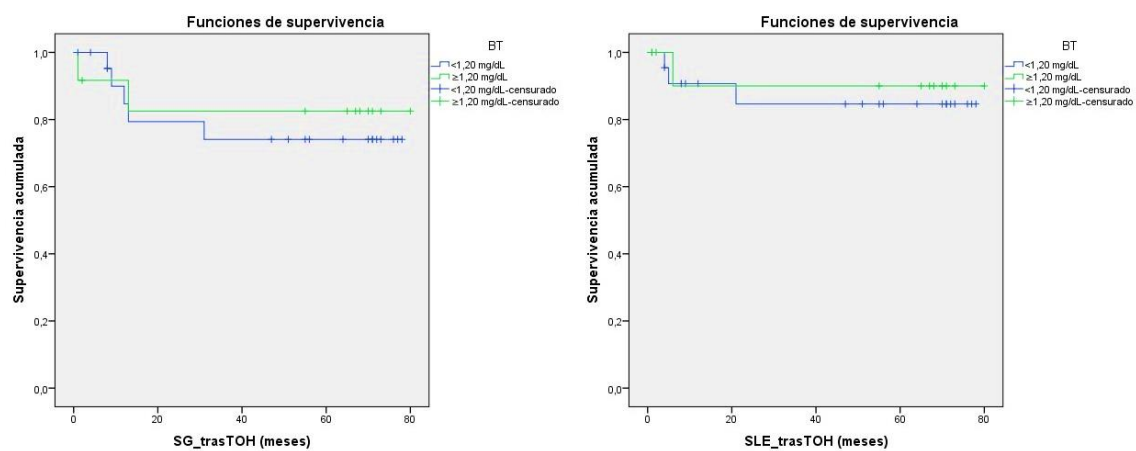


Figura 64. Curvas de SG y de SLE en función de los niveles pre-trasplante de bilirrubina total según el método de Kaplan-Meier.

4.9.1.20 Fosfatasa alcalina

En la tabla 116 se puede observar el número de pacientes con niveles de fosfatasa alcalina pre-trasplante ≤ 130 UI/L y >130 UI/L, y dentro de ambos grupos, el número de pacientes que presentaron recidiva o no tras el trasplante y aquellos que fallecieron o no tras el trasplante.

Tabla 116. Número de pacientes con y sin recidiva y con y sin éxitos post-trasplante dentro de los grupos con bilirrubina $<1,20$ mg/dL y $\geq 1,20$ mg/dL (BT: bilirrubina total).

ALP (UI/L)	Nº de pacientes	Recidiva post-trasplante		Exitus post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
≤ 130	7	7	-	6	1
>130	13	13	-	12	1

En la tabla 117 se muestra la supervivencia media general en los pacientes con niveles pre-trasplante de fosfatasa alcalina ≤ 130 UI/L y >130 UI/L. Las diferencias entre los distintos grupos de pacientes para la supervivencia general no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), según el test de Log Rank (Mantel-Cox). La supervivencia media sin recidiva no pudo calcularse ya que de los pacientes en los que pudo llevarse a cabo la determinación de fosfatasa alcalina, ninguno presentó recidiva post-trasplante. Las curvas de supervivencia se pueden observar en la figura 65.

Tabla 117. Comparación de la SG entre pacientes con niveles pre-trasplante de bilirrubina ≤ 130 UI/L y >130 UI/L mediante el test de Log Rank (ALP: fosfatasa alcalina).

SUPERVIVENCIA POST-TOH	ALP ≤ 130 UI/L	ALP >130 UI/L	Log Rank (p)
Supervivencia media general (meses) [IC95%]	58,60 [36,86-80,34]	73,92 [62,48-85,37]	0,188 ($p=0,665$)
Supervivencia media sin recidiva (meses) [IC95%]	-	-	-

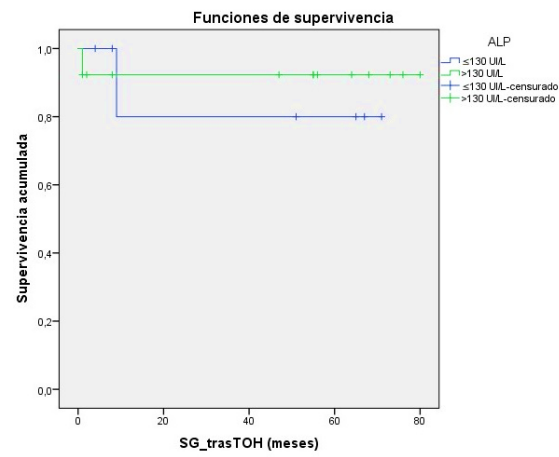


Figura 65. Curva de SG en función de los niveles pre-trasplante de fosfatasa alcalina según el método de Kaplan-Meier.

5. DISCUSIÓN

El TOH para el CHC es una estrategia de tratamiento ideal no sólo para eliminar las lesiones tumorales, sino para sustituir un hígado dañado que podría originar nuevamente un CHC en el futuro (236). Los pacientes con CHC candidatos a TOH deben cumplir los estrictos criterios de Milán para ser trasplantados y, además, debe haber disponibilidad de un órgano compatible; por ello, el número de pacientes del presente estudio es limitado. No obstante, nuestro tramaño muestral es similar al de otros estudios con pacientes trasplantados por CHC, como el de Shindoh y cols., con 44 pacientes CHC en cumplimiento con los criterios anteriormente mencionados (237). Algunos autores consideran que son criterios demasiado restrictivos ya que excluyen a pacientes que podrían beneficiarse del trasplante (238). A pesar de ser restrictivos, los criterios de Milán siguen siendo la referencia para el TOH en el CHC. Sin embargo, se ha demostrado que, con una selección cuidadosa, se pueden conseguir resultados comparables en pacientes que no cumplen los criterios de Milán. Uno de estos enfoques consiste en aumentar la fiabilidad de los biomarcadores, como AFP y PIVKA-II, para seleccionar candidatos óptimos para el trasplante (239).

En cuanto al sexo de los pacientes, el predominio masculino observado en los pacientes de nuestro estudio también fue revelado por otros autores como Sharba y cols. (240), Salem y cols. (241) y Lehman y cols. (242). Todavía no se ha demostrado una explicación biológica satisfactoria, aunque la mayoría de los factores de riesgo de cáncer de hígado son más frecuentes en los hombres que en las mujeres. También se ha planteado la hipótesis de que las diferencias en las hormonas esteroides sexuales, las respuestas inmunitarias y la epigenética podrían estar relacionadas con las tasas más altas de CHC entre los hombres (243). En nuestro trabajo, la edad media de los pacientes en el momento de inclusión en lista de espera es concordante con los hallazgos de otros autores, como Johnson y cols., quienes encontraron que la edad promedio de los pacientes oscilaba entre la quinta y sexta décadas de vida (241).

En referencia a las distintas etiologías subyacentes de la enfermedad hepática, el VHC fue la etiología predominante en los pacientes de nuestro estudio, seguida por el alcoholismo y la combinación de VHC y alcoholismo. En conjunto, teniendo en cuenta también las etiologías combinadas, más de la mitad de los pacientes reclutados presentaban VHC, mientras que el VHB representa menos del 7% de los casos, teniendo en cuenta las etiologías combinadas. Nuestros resultados se asemejan a los de otros estudios con pacientes CHC en los que la etiología predominante también era el VHC (237,244,245), lo que puede explicarse por la menor tasa de CHC atribuible al VHB en el mundo occidental,

donde sólo el 20% de los casos puede atribuirse a esta infección, mientras que la hepatitis C crónica ha sido tradicionalmente el principal factor de riesgo (6). A diferencia de la infección por hepatitis B, no existe una vacuna para el VHC (246); sin embargo, la prevalencia de ambos factores está disminuyendo drásticamente debido a la vacunación de los recién nacidos contra el VHB y a la existencia de tratamientos eficaces para los portadores del VHB y del VHC (4).

De los 32 pacientes con clasificación Child-Pugh conocida, más de la mitad pertenecían a la clase A, de forma similar a otros estudios de la literatura en el que la mayoría de los pacientes con CHC reclutados para trasplante también eran de la clase Child A (173,247,248). En cuanto al sistema de puntuación MELD, nuestros resultados son concordantes a los obtenidos en el estudio de Payancé y cols., donde la puntuación mediana de este sistema de priorización en pacientes CHC candidatos a distintos tipos de tratamiento como resección, TACE y TOH, entre otros, también fue de 9 meses (RI 7-11) (249). Aunque los pacientes con CHC tienen una puntuación MELD fisiológica más baja debido a que el trasplante es una opción de tratamiento en estadios iniciales de la clasificación BCLC, estos pacientes tienen un mayor riesgo de muerte relacionada con la progresión del tumor, así como de ser retirados de la lista de espera debido a metástasis o descompensación clínica (250).

A diferencia del estudio de Giard y cols., donde la mayoría de pacientes trasplantados por CHC presentaban una única lesión tumoral (251), sólo la mitad de los pacientes de nuestro estudio presentaba una única LOE hepática. En relación al tamaño tumoral, más de la mitad de nuestros pacientes presentaban un diámetro de la mayor lesión tumoral ≤ 3 cm. El Gawad y cols., por el contrario, mostraron que el tamaño tumoral en la mayoría de sus pacientes con diagnóstico de CHC era superior a 3 cm, aunque estos pacientes no fueron seleccionados para TOH (252).

En cuanto a los tratamientos pre-trasplante, alrededor del 70% de los pacientes de nuestro estudio recibieron al menos una TACE antes de la cirugía, proporción similar a la de otros estudios previos (74,253). El tiempo de seguimiento de los pacientes tras el TOH en la presente tesis doctoral, fue superior al observado en otros estudios, como por ejemplo, el de Notarpaolo y cols., con una mediana de 40,9 meses (RI 18,4-73,6) (254) y el de Kim y cols., con una mediana de 55 meses (RI 1-108) (188).

La necrosis tumoral es una característica patológica común de los tumores sólidos, que según se ha documentado se correlaciona con una lesión isquémica crónica debido al rápido

crecimiento del tumor, de forma que el grado de necrosis tumoral refleja el nivel de hipoxia intratumoral (255). En torno al 61% de nuestros pacientes trasplantados presentaban necrosis tumoral, si bien no se encontraron estudios en la bibliografía que incluyeran esta característica patológica del tumor en pacientes trasplantados por CHC. Ling y cols., en cuyo estudio los pacientes con CHC fueron sometidos a resección quirúrgica, observaron necrosis tumoral en el 46% de los enfermos con CHC (255).

Nuestra proporción de pacientes con invasión microvascular fue superior al observado por Hameed y cols. (7%) (248), y ligeramente inferior al observado por Park y cols. (14%), cuyo estudio se llevó a cabo en pacientes sometidos a trasplante hepático de donante vivo por CHC (253). En este mismo estudio, el porcentaje de pacientes con recidiva post-trasplante (22,5%) fue superior al observado en nuestro trabajo. Choi y cols. también observaron un porcentaje superior de recidivas post-trasplante respecto al nuestro, ya que alrededor del 16% de los pacientes con CHC que recibieron trasplante hepático de donante vivo experimentaron recurrencia del tumor durante el período de seguimiento (256). En su estudio, cerca del 22% de los pacientes fallecieron en el seguimiento post-trasplante, representando la recidiva tumoral el 62% de estos fallecimientos. Ambos porcentajes son semejantes a los encontrados en nuestro trabajo.

En cuanto a la supervivencia, la SG de los pacientes de nuestro estudio fue superior a la revelada por Taketomi y cols., cuya mediana fue de 21,9 meses (RI 4,2-45,7) y cuyo tiempo medio de seguimiento de 2,3 años (174). Asimismo, la SLE en nuestro estudio fue mayor que la observada por Liang y cols. [33,5 meses (RI 26,9-40,1)], siendo su tiempo medio de seguimiento $47,8 \pm 27,3$ meses (257).

El paradigma para la selección de pacientes para TOH parece estar cambiando de criterios morfológicos a una combinación de criterios biológicos, histológicos y morfológicos, y al establecimiento de un modelo para predecir la recurrencia y los resultados posteriores al trasplante. De esta forma, para perfeccionar los criterios de selección morfológica del TOH, en países asiáticos como Japón y Corea del Sur se han incluido características biológicas expresadas por marcadores tumorales (236).

Los marcadores tumorales son sustancias biológicas producidas directamente por el tumor o por células no tumorales como respuesta a la presencia de un tumor. Suelen detectarse en un tumor sólido, en las células tumorales circulantes en la sangre periférica, en los ganglios linfáticos, en la médula ósea o en otros fluidos corporales como orina, heces

o líquido ascítico (258), y son útiles para detectar el carcinoma maligno de forma rápida y sencilla mediante métodos bioquímicos. Los biomarcadores séricos como AFP y PIVKA-II permiten una evaluación mínimamente invasiva y rápida de los pacientes con CHC, pudiendo así disminuir la mortalidad y reduciendo los costes médicos (259).

En nuestro estudio, tras evaluar la asociación entre PIVKA-II y diferentes parámetros clinicopatológicos antes del trasplante, se encontró que los pacientes con mayor tamaño tumoral presentaban mayores niveles de PIVKA-II, lo que sugiere que la concentración sérica de este biomarcador puede desempeñar un importante papel en la predicción de la gravedad de la enfermedad, de forma que una mayor concentración de PIVKA-II antes del trasplante puede indicar un mayor volumen tumoral y un peor estadio clínico (260). Esta correlación también se ha observado en otros estudios en pacientes con diagnóstico de CHC, pero no en lista de espera de TOH (252,260–262). En cuanto a los niveles de AFP, también se asociaron significativamente con un mayor tamaño tumoral, de forma que aquellos pacientes con un tamaño tumoral >3 cm presentaban niveles mayores de AFP que aquellos pacientes con un tamaño tumoral \leq 3 cm. Nuestros hallazgos se relacionan con los de Si y cols., quienes encontraron que los niveles séricos de AFP y PIVKA-II en pacientes diagnosticados de CHC por VHB, pero no seleccionados para TOH, se asociaban significativamente con el tamaño del tumor (263).

La mayoría de los pacientes reclutados en el estudio fueron sometidos al menos a una TACE antes del trasplante hepático. La TACE es un tratamiento eficaz en los pacientes con CHC irreseccable, sin embargo la mayoría de los pacientes tratados con TACE necesitarán repetir la terapia debido a una respuesta parcial o a la recurrencia del tumor. Los resultados del tratamiento después de la TACE dependen tanto de la gravedad de la disfunción hepática subyacente como de la carga tumoral (264). En nuestro estudio, los niveles pre-trasplante de PIVKA-II correlacionaron con el número de TACEs previas al TOH. Este resultado sugiere que aquellos pacientes que recibieron varios tratamientos con la intención de reducir el tumor para llevar a cabo el trasplante, presentaban un CHC más avanzado y un peor estadio clínico. Hoy día no está muy claro los beneficios de repetir dicho tratamiento, puesto que por un lado reducen el tumor, pero al mismo tiempo podría favorecer la dispersión tumoral y la inflamación local. Algunos estudios, como el de Li y cols., han demostrado que las células cancerosas del hígado residual y el tejido hepático normal sufren cambios en la expresión génica tras la TACE, de forma que la posibilidad de recurrencia y metástasis de las células

residuales del CHC aumenta después de este tratamiento (265). Asimismo, los restos de tejido hepático normal pueden provocar la reaparición del CHC, debido a la cirrosis y al aumento de la hiperplasia compensatoria y la actividad proliferativa después de la TACE. Además, diversos estudios previos han demostrado que el establecimiento de una circulación colateral después de la TACE es un factor importante para la recidiva y la metástasis del CHC, que puede conducir a un crecimiento de células tumorales con alto potencial metastásico (266). Los niveles séricos de AFP, en cambio, no correlacionaron con el número de TACEs pre-trasplante, si bien no se hallaron en la literatura estudios que hubieran analizado la asociación entre estos biomarcadores (PIVKA-II y AFP) con el número de TACEs previas al TOH.

Por otra parte, no se encontró ninguna relación entre los niveles pre-trasplante de PIVKA-II y el resto de variables clinicopatológicas. A diferencia de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, Yamamoto y cols. sí encontraron asociación significativa entre los niveles de PIVKA-II y la invasión vascular, en pacientes con diagnóstico de CHC a los que se les realizó una resección hepática (267). Asimismo, Si y cols., en su estudio con pacientes CHC por VHB previamente citado, concluyeron que la expresión elevada de PIVKA-II se asociaba significativamente con la presencia de invasión vascular (263), de forma que la producción de PIVKA-II por parte de las células del CHC podría inducir la angiogénesis en el tejido hepático circundante y promover así la invasión vascular (268). Sin embargo, ninguno de los estudios mencionados se llevó a cabo en pacientes en lista de espera de TOH.

A excepción de la asociación significativa con el tamaño tumoral ya mencionada anteriormente, no se encontraron otras relaciones entre las variables clinicopatológicas y AFP, en consonancia con otros estudios como el de Lapinski y cols., quienes tampoco encontraron asociación significativa entre los niveles séricos de AFP y el número de nódulos tumorales (269) o Liu y cols., cuyo trabajo no evidenció diferencias significativas entre los pacientes con uno o varios tumores (270).

A pesar de que algunos estudios han sugerido que los niveles de PIVKA-II y AFP están asociados a la etiología de la enfermedad hepática (271,272), en el presente trabajo no se ha encontrado ninguna relación entre estos dos biomarcadores y las distintas etiologías del CHC, en concordancia con los resultados de Sharman y cols. (240). Por lo tanto, nuestros datos evidencian que tanto PIVKA-II como AFP son biomarcadores independientes de la etiología de la enfermedad hepática subyacente al CHC. Por otra parte, los niveles de PIVKA-II en los pacientes de nuestro estudio no se asociaron con la clasificación Child-Pugh, en

consonancia con Saito y cols., quienes tampoco encontraron una asociación significativa entre el nivel sérico de PIVKA-II y esta clasificación antes del tratamiento con TACE (187). Sin embargo, la AFP sí correlacionó con la clasificación Child-Pugh en nuestro estudio, de forma que los pacientes de la clase C presentaban niveles de AFP mayores que los de las clases A y B, corroborando así la validez de este biomarcador para diferenciar aquellos pacientes con una disfunción hepática más grave.

En relación a los parámetros hematológicos, coagulométricos y bioquímicos indicadores de progresión tumoral, se encontraron mayores niveles pre-trasplante de PIVKA-II en los pacientes con mayor concentración sérica de PCR, LDH y fofatasa alcalina.

El mecanismo de la PCR en el CHC y en el cáncer en general no está muy claro. Queda por dilucidar si el comportamiento agresivo del tumor provoca una reacción inflamatoria perjudicial para el pronóstico o si la inflamación *per se* impulsa la progresión del tumor. En particular, existen pruebas de que el efecto de la inflamación, reflejado por la elevación de la PCR, puede estar directamente implicado en la progresión tumoral (75).

En cuanto a la LDH, ésta es una enzima glicolítica que existe en distintas isoformas en los tejidos humanos y en las neoplasias, siendo esta enzima clave en la conversión de piruvato en lactato en condiciones anaeróbicas (71). La LDH, que suele ser liberada por las células necróticas, se ha utilizado como marcador de lesión hepática desde hace mucho tiempo, pero su papel en el CHC ha sido menos estudiado. De hecho, se ha observado un nivel elevado de LDH (especialmente de la isoforma LDH 5) en pacientes con CHC agresivo, pudiendo un nivel sérico elevado de LDH indicar un crecimiento rápido y un comportamiento altamente maligno del CHC. Wang y cols. demostraron que el alto nivel de LDH sérico preoperatorio se asoció con la recurrencia temprana después de la resección curativa de CHC (273). Una posible explicación del papel de la LDH en la recidiva temprana es que la LDH es un marcador indirecto de la hipoxia tumoral y la angiogénesis. En un entorno hipóxico, las células cancerosas producen un alto nivel de lactato y piruvato a través de la glucólisis, de forma que el aumento de la LDH asegura el metabolismo glicolítico bajo condiciones de hipoxia en el CHC. También se ha demostrado la relación entre la hipoxia, la LDH y la angiogénesis a través del factor 1 inducible por hipoxia. Estas evidencias demuestran que la LDH no sólo puede reflejar la lesión hepática como enzima intracelular, sino que también participa en el comportamiento agresivo del tumor a través de la adaptación del metabolismo energético y la angiogénesis (273), lo que explicaría la correlación significativa con los niveles de PIVKA-II antes del trasplante en nuestro estudio.

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima que se expresa en la membrana apical de los hepatocitos y, por lo tanto, cabe esperar que la necrosis hepatocelular provoque la liberación de esta enzima en la circulación sistémica y/o en los canales biliares, de forma que los niveles séricos de ALP aumentan en proporción a la gravedad de la lesión hepatocelular (274). Un metaanálisis llevado a cabo por Sun y cols. demostró que un nivel elevado de ALP en pacientes con CHC antes de varios tipos de tratamientos como la TACE, ablación, resección y trasplante, entre otros, se asoció significativamente con una mala SG. Varios mecanismos pueden explicar la asociación entre el nivel de ALP sérico y el pronóstico en los pacientes con CHC. En primer lugar, se descubrió que las células cancerosas presentan una mayor actividad de ALP en el nucleolo y muestran un cambio dinámico en la localización durante los ciclos celulares, lo que indica que la ALP puede facilitar la formación de tumores al modificar la regulación del ciclo celular y la proliferación celular. En segundo lugar, se ha observado un aumento del nivel de ALP en varios trastornos no malignos asociados con la inflamación, como la hepatitis, la coledocolitiasis, la colangitis y la pancreatitis. La inflamación, como sello distintivo del cáncer, puede contribuir a la iniciación y la progresión del mismo. Por lo tanto, un aumento del nivel de ALP en suero puede estar relacionado con un mal pronóstico al reflejar una inflamación más grave en los pacientes con CHC. En tercer lugar, la fosfatasa alcalina se considera un biomarcador de la metástasis tumoral, especialmente de la ósea; es posible que este proceso subyacente contribuya al mal resultado de los pacientes con CHC (275). Todos estos hallazgos podrían ayudar a explicar que se hayan observado niveles altos de PIVKA-II y ALP en los pacientes de nuestro estudio antes del TOH.

Puesto que PIVKA-II tiene una vida media corta (pocos días), puede proporcionar información clínicamente útil tanto sobre las respuestas tempranas bajo tratamiento como sobre el pronóstico (249). La AFP sérica se ha utilizado de forma rutinaria como biomarcador tumoral del CHC, principalmente para el seguimiento de la evolución de la enfermedad (276). En cuanto a su asociación con PIVKA-II, la mayoría de los resultados previos han mostrado que no había correlación entre ellas. Tras analizar la asociación entre los niveles de PIVKA-II y AFP en los pacientes incluidos en nuestro estudio, tanto antes del trasplante, como al mes, 6 meses, 1 año, 2 años y 3 años post-trasplante, no se encontró ninguna correlación significativa, en concordancia con otros estudios en los que, aun tratándose de pacientes CHC, no eran candidatos para TOH (267,277,278). Todos estos hallazgos reflejan que son dos biomarcadores independientes entre sí, lo que puede

explicarse por las diferentes vías de síntesis de los dos marcadores en las células del hepatoma (279). Parece que tanto AFP como PIVKA-II reflejan la carga tumoral de los pacientes con CHC (167) y, de esta forma, son marcadores complementarios en cuanto a su utilidad clínica (280). Por consiguiente, la determinación conjunta de estos dos marcadores tumorales puede ser útil para la monitorización del paciente con CHC, tanto antes como después del trasplante.

Además, según nuestros resultados, PIVKA-II únicamente correlaciona con MMP-1 a los 2 años post-trasplante, mientras que AFP correlaciona con IL-6, IL-8 y MMP-1, tanto antes como después del trasplante. Este hallazgo refuerza la idea de que PIVKA-II, al ser un biomarcador independiente, sería útil complementando a la AFP en la monitorización del paciente trasplantado por CHC.

En cuanto al resto de biomarcadores analizados (IL-6, IL-8, OPN, GPC3 y MMP-1), estos han sido descritos en relación con el CHC; sin embargo, pocos autores se han centrado en el estudio de los niveles sanguíneos de estos marcadores en el trasplante hepático por CHC (281,282).

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica y multifuncional producida por una gran variedad de células que desempeña un papel central en el mecanismo de defensa del huésped y en la modulación de la respuesta inmunitaria. Esta citoquina actúa como un importante mediador de la regeneración y reparación del hígado (283), de forma que se ha demostrado que su sobreexpresión está asociada con la progresión del cáncer de hígado y la formación de metástasis (75). En nuestro estudio, los niveles pre-trasplante de IL-6 se asociaron con la clasificación Child-Pugh, observándose una mayor concentración sérica de IL-6 en los pacientes con clasificación Child C que en aquellos que pertenecían a las clases A y B, como también se observó en el caso de la AFP. Estos hallazgos guardan relación con los de El-Folly y cols. (284) y Kim y cols. (283), y sugieren que los niveles persistentemente elevados de IL-6 pueden causar daños en el hígado que conducen a la cirrosis y al CHC (285), por lo que la sobreexpresión de esta citoquina puede desempeñar un papel en la progresión del CHC, contribuyendo al empeoramiento de la función hepática del paciente en lista de espera de TOH. Sin embargo, en nuestro estudio, los niveles pre-trasplante de esta citoquina no se relacionaron con características del tumor, de forma similar a otros estudios con pacientes CHC, como el de Cho y cols., quienes no encontraron asociación entre los niveles de IL-6 y el número de tumores (286), y el de Sheng y cols., que tampoco encontraron correlación entre la IL-6 y el tamaño tumoral (196), aunque estos estudios no se llevaron a cabo en

pacientes trasplantados. Sin embargo, en nuestro estudio sí se encontró una correlación positiva entre IL-6 y la escala MELD, lo que podría explicarse por el importante estado inflamatorio del paciente con mayor puntuación MELD, en el cual es mayor el riesgo de muerte y por tanto, mayor la prioridad para recibir un hígado de donante. Es importante recordar que la inflamación está íntimamente implicada en la progresión tanto de la cirrosis hepática como de la carcinogénesis (231).

Asimismo, los niveles de IL-6 correlacionaron con AFP, tanto antes del trasplante como al año post-trasplante. Los resultados obtenidos concuerdan con otros estudios (193,201,284), los cuales informaron de una asociación entre los niveles séricos de IL-6 y AFP en pacientes con CHC, si bien ninguno de estos estudios se llevó a cabo en pacientes en lista de espera de trasplante. Todos estos hallazgos ponen de manifiesto que la IL-6 puede desempeñar un papel importante en la determinación de la progresión de la enfermedad hepática en pacientes en lista de espera de TOH.

La IL-8 suele ser secretada por células tumorales y células inflamatorias. En el CHC, los niveles de esta quimiocina están significativamente aumentados en comparación con el tejido hepático normal, lo que conduce a la progresión y la metástasis mediante la activación de la vía de señalización AKT/mTOR/STAT3 (230). Además, la IL-8 aumenta la infiltración inmunitaria de las Tregs en el microambiente tumoral (230). Un metanálisis llevado a cabo por Shakiba y cols., puso de manifiesto que el nivel de IL-8 en suero en pacientes con CHC era significativamente mayor que en otros grupos de pacientes, como controles sanos y pacientes con cirrosis hepática y hepatitis crónica (287). Esta quimiocina contribuye a las neoplasias humanas, como el CHC y desempeña su papel a través de la participación en la invasión vascular y la angiogénesis o la proliferación tumoral. De esta forma, la monitorización de la IL-8 puede controlar la angiogénesis y la invasión del CHC, ya que esta citoquina actúa a favor de la inflamación, el daño celular permanente y la infección por virus como el VHC (287).

En nuestro estudio, al analizar la posible asociación de los niveles de IL-8 pre-trasplante y las características clínicopatológicas de los pacientes, se encontró que los pacientes con tamaño tumoral >3 cm presentaban una mayor concentración plasmática de IL-8 que aquellos pacientes con tamaño tumoral \leq 3 cm. Estos resultados son concordantes con el estudio de Ren y cols. (204), en el que la concentración elevada de IL-8 se relacionó con la presencia de tumores de mayor tamaño en pacientes con CHC antes de la resección hepática. Asimismo, Yu y cols. observaron que los niveles elevados de IL-8 se asociaban a

tumores de mayor tamaño, a la enfermedad avanzada y a la progresión del tumor en pacientes con CHC sometidos a resección (288). Los niveles elevados de IL-8 en sangre de pacientes con CHC pueden deberse a una producción excesiva en las células tumorales y a su posterior liberación en la circulación. Estos datos sugieren que la IL-8 sérica o plasmática podría ser útil en el ámbito clínico para predecir el estadio avanzado del tumor (204). Sin embargo, en nuestro trabajo no se observó asociación con el sexo ni la edad, y tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-8 entre los pacientes con un único nódulo tumoral o múltiples nódulos tumorales, de forma similar a lo observado por Ren y cols., quienes analizaron los sueros preoperatorios de pacientes con resección de CHC (204). Estos autores, sin embargo, sí encontraron asociación entre los niveles de esta quimiocina y la presencia de invasión vascular.

En referencia al análisis de asociación de IL-8 con los marcadores PIVKA-II y AFP, no se encontró ninguna correlación significativa antes del trasplante, guardando relación directa con el estudio de El-Tayeh y cols., quienes tampoco encontraron asociación significativa entre los niveles de IL-8 y AFP en los pacientes con diagnóstico de CHC, no candidatos para TOH (289). Sin embargo, en nuestro estudio, se encontró una asociación negativa entre los niveles de estos marcadores al mes post-trasplante. Ambos marcadores deberían aumentar o disminuir en la misma dirección, puesto que en el presente estudio se ha observado que existe una relación entre el tamaño del tumor y los niveles de estos biomarcadores, de forma que a mayor tamaño tumoral se produce una mayor liberación de ambos marcadores. A pesar de que tanto AFP como IL-8 disminuyen significativamente al mes post-trasplante respecto a los valores previos al TOH, en 5 de los 35 pacientes trasplantados los niveles de IL-8 aumentan al mes tras el trasplante, concretamente en los pacientes 9, 11, 13, 22 y 30. De todos ellos únicamente el paciente 13 presentó recidiva post-trasplante a los 6 meses tras la cirugía. Destaca el paciente 22, cuyo valor de IL-8 al mes post-trasplante casi triplica el valor pre-trasplante, pasando de 2,91 a 5,66 pg/mL. En este paciente también aumentan al mes post-trasplante otros marcadores de inflamación como la IL-6, de 39,26 a 57,83 pg/mL y la PCR, de 0,36 a 10,89 mg/dL, cuya explicación podría ser la presencia de ascitis de la cual fue diagnosticado, probablemente refractaria al trasplante hepático, descartándose previamente cualquier otro foco inflamatorio o infeccioso. Es importante destacar que los niveles séricos o plasmáticos de interleuquinas como IL-6 e IL-8 en la monitorización del paciente trasplantado por CHC, deberían interpretarse con cautela, descartando

previamente otros procesos infecciosos o inflamatorios y siempre complementando a la AFP y a las pruebas de imagen.

En los últimos años, algunos estudios han demostrado el valor clínico potencial de la OPN para servir como biomarcador de pronóstico y como posible objetivo terapéutico en pacientes con CHC (214). Tras analizar la posible asociación de los niveles de OPN con las variables clinicopatológicas antes del trasplante, no se encontró ninguna correlación significativa. A diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, Cabiati y cols. sí encontraron asociación entre los niveles plasmáticos de OPN y la escala MELD, en pacientes con CHC en espera de trasplante, mostrando una tendencia a aumentar de este marcador en función de la gravedad clínica. Este hallazgo podría sugerir un hipotético papel de la OPN en la progresión del CHC (281).

Sun y cols. desarrollaron un metaanálisis en el cual revisaron tanto estudios en los que la OPN se determinó por inmunohistoquímica del tejido tumoral, como otros en los que se midieron muestras séricas por ELISA. En él la sobreexpresión de OPN no se encontró asociada a la edad, el sexo, grado de Child-Pugh, los niveles de AFP, ni a la presencia de invasión vascular, guardando relación con los resultados de nuestro trabajo, en el que no se encontró ninguna asociación entre los niveles plasmáticos de OPN y las variables clinicopatológicas. Sin embargo, estos autores sí informaron de la asociación significativa del tamaño del tumor con los niveles de OPN (214). De forma similar, Zhou y cols. también descubrieron que el nivel de OPN antes de la resección estaba estrechamente relacionado con el tamaño del tumor, así como con la invasión microvascular y la clase Child-Pugh (290).

En referencia a la asociación entre los distintos biomarcadores determinados en nuestro estudio, los niveles de OPN no correlacionaron con PIVKA-II ni con AFP, ni antes ni después del trasplante, en concordancia con otros autores como Zhou y cols. (290) y con Malov y cols. (291), quienes no encontraron asociación significativa entre los niveles de OPN y AFP previos al tratamiento quirúrgico distinto al TOH, en pacientes con CHC.

En cuanto al GPC3, se ha descrito que la expresión de esta glicoproteína contribuye a la patogénesis del CHC mediante la proliferación, la invasión y la progresión del cáncer. Sin embargo, hay contradicciones en los resultados de varios estudios y la importancia pronóstica de la GPC3 en pacientes con CHC aún no está clara (292). Nuestros resultados no evidencian ninguna asociación entre los niveles séricos pre-trasplante de GPC3 y las variables clinicopatológicas, y son coherentes a lo observado por Ozkan y cols., quienes evaluaron la validez diagnóstica y pronóstica de este nuevo marcador sérico en pacientes

con diagnóstico de CHC (293). En un metaanálisis llevado a cabo por Liu y cols., en el que todos los estudios examinados detectaron la expresión de GPC3 por inmunohistoquímica, tampoco se encontró relación entre este marcador y el tamaño del tumor o el número de tumores. Sin embargo, estos autores sí encontraron que la alta expresión de GPC3 se asociaba a la presencia de invasión vascular, sugiriendo que GPC3 podría desempeñar un papel en la invasión y la progresión del cáncer en el CHC (222).

Jeon y cols. concluyeron que el nivel de GPC3 en plasma no era un biomarcador diagnóstico útil para el CHC en comparación con la AFP, tras medir los niveles de GPC3 en su cohorte de pacientes con 2 kits ELISA distintos y observar una incongruencia persistente en sus valores, lo que cuestiona la utilidad de este biomarcador (294). Asimismo, Xu y cols. demostraron en su metaanálisis que el GPC3 no era eficazmente válido como biomarcador sérico del CHC, ya que no hubo diferencias significativas en el nivel sérico de GPC3 entre los pacientes con CHC y aquellos con cirrosis hepática (221). La naturaleza del GPC3 sérico puede influir en la utilidad del ELISA, ya que este marcador puede producirse cuando una lipasa extracelular (Notum) escinde el anclaje GPI del GPC3 unido a la membrana o cuando se segrega, posiblemente por Notum endógeno o GPI-fosfolipasa D, por la célula. También pueden encontrarse varias formas moleculares de GPC3, ya que Hippo y cols. pudieron detectar un fragmento de 50-kDa producido por un sitio de escisión en el extremo carboxilo terminal, además del GPC3 glicanado detectado habitualmente (295). Además, el GPC3 se une de forma competitiva con varios factores de crecimiento, lo que podría interferir con la unión de los anticuerpos (296). Por último, algunos autores han sugerido que la heterogeneidad en la composición del CHC, el origen étnico, la etiología y la manifestación clínica podrían explicar la variabilidad (294), si bien en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en los niveles de GPC3 entre las distintas etiologías de la enfermedad hepática subyacente al CHC.

En cuanto a la asociación de los niveles séricos de GPC3 con AFP y PIVKA-II en los pacientes incluidos en el estudio, no se encontró ninguna correlación significativa, ni antes ni después del trasplante. De forma similar, tampoco en otros estudios previos en pacientes con diagnóstico de CHC se detectó asociación entre GPC3 y AFP (291,293,297).

La MMP-1 es la MMP más abundante en la MEC (224) y promueve la movilidad celular, favoreciendo el proceso metastásico (227). Tras analizar la asociación entre los niveles séricos de MMP-1 y las variables clinicopatológicas de los pacientes incluidos en el estudio, se encontró que estos niveles eran mayores en los pacientes que no recibieron TACES antes

del trasplante. Si bien no hemos hallado en la literatura ningún otro estudio que haya realizado este análisis, esta asociación podría explicarse debido a que la TACE disminuye el tamaño del tumor mientras el paciente permanece en lista de espera de trasplante y, por tanto, aquellos pacientes que no fueron sometidos a este tratamiento preoperatorio presentaban una concentración sérica mayor de MMP-1 que aquellos que sí recibieron el tratamiento. No encontramos, en cambio, ninguna otra asociación con el resto de variables clinicopatológicas. En cuanto al origen de la MMP-1 sérica, existen dos posibilidades según exponen Tahara y cols., ya que las células cancerosas y las células estromales del huésped secretan MMP-1 en el lugar del cáncer primario (298). Durante la progresión y la invasión del tumor, la MMP-1 podría pasar a la circulación. Otra posibilidad es que la MMP-1 se segregue como respuesta a la invasión de las células cancerosas, no sólo en el lugar del cáncer primario, sino también en la médula ósea o en la sangre periférica. Por lo tanto, el nivel sérico de MMP-1 probablemente representa la cantidad total de MMP-1 secretada por los tejidos del huésped. Por otra parte, Trivedi y cols. sugirieron que la MMP-1 podría derivarse de las plaquetas de la sangre periférica (299).

Como se ha comentado, en la presente tesis doctoral no se encontró una asociación significativa entre los niveles sanguíneos de MMP-1 previos al TOH y el tamaño tumoral. Sin embargo, Altadill y cols., tras realizar un estudio inmunohistoquímico mediante microarrays tisulares utilizando muestras de tejido tumoral de CHC, encontraron una correlación positiva entre la expresión de MMP-1 y los tumores de mayor tamaño, e informaron de que la MMP-1 es expresada principalmente por las células del estroma de los tejidos del CHC (226). Además, también descubrieron que todos los pacientes con CHC que mostraban una elevada expresión de MMP-1 en las células del estroma presentaban un mal pronóstico.

En cuanto a la asociación de MMP-1 con AFP y PIVKA-II, se observó que los niveles de MMP-1 correlacionaron con AFP, tanto antes como después del trasplante, concretamente al mes, a los 6 meses y al año post-trasplante, en concordancia con un estudio anterior de nuestro grupo en el que también encontramos una fuerte asociación entre los niveles pre-trasplante de AFP y MMP-1 (227), si bien se llevó a cabo con un menor número de pacientes. Los niveles de MMP-1, como se destacó anteriormente, también correlacionaron significativamente con PIVKA-II a los 2 años post-trasplante. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la MMP-1 podría tener un papel en el paciente con CHC en lista de espera de trasplante, en combinación con AFP y PIVKA-II, indicando un estado más avanzado de la enfermedad.

El rápido aumento de los niveles de marcadores en sangre refleja el comportamiento agresivo de los tumores remanentes después de tratamientos del CHC como la resección curativa, la TACE, la quimioterapia infusional en la arteria hepática, la quimiorradioterapia concurrente y el Sorafenib (167). Es más, la respuesta de los biomarcadores tras el tratamiento es una variable clave que refleja el grado de eliminación del tumor y que se asocia con los resultados de la recidiva a largo plazo y la SG tras la cirugía del CHC, considerándose una herramienta potencialmente eficaz y fácilmente disponible para evaluar la eficacia terapéutica, predecir el pronóstico oncológico y controlar la recidiva postoperatoria (257). Así, el valor predictivo de la respuesta de la AFP tras el tratamiento se ha demostrado en el trasplante hepático y en varios tratamientos no curativos para el CHC, como el TACE, la quimiorradioterapia, las terapias sistémicas, incluida la quimioterapia, la terapia dirigida y la inmunoterapia (300).

Lo ideal es que los niveles sanguíneos de los marcadores tumorales desciendan y se sitúen dentro de un intervalo de referencia después de un tratamiento eficaz y que estos aumenten antes de que se detecte la recaída del tumor mediante estudios de imagen (267). Los programas de vigilancia de la recidiva tumoral del CHC tras la cirugía se basan generalmente en la ecografía abdominal, la radiografía de tórax y los niveles séricos de AFP cada 1 a 6 meses después de la operación. En este caso, la AFP podría proporcionar información complementaria y útil para vigilar la recidiva tumoral en pacientes con CHC con AFP positiva. Sin embargo, la elevación de la AFP sérica sólo se observa en alrededor del 70 % de los pacientes con CHC, y en menor medida (33-65%) en los pacientes con CHC de menor tamaño (diámetro <2 cm). Por lo tanto, es necesario identificar nuevos biomarcadores serológicos para monitorizar la recurrencia después del trasplante en pacientes con CHC, especialmente en los casos de CHC negativos para la AFP y/o de menor tamaño (290).

En los pacientes de nuestro estudio, tras comparar los niveles de PIVKA-II antes y después del trasplante, se observó que estos niveles disminuían de forma significativa al mes, a los 6 meses y al año post-trasplante. En cambio, a los 2 años y a los 3 años post-trasplante no se encontró un descenso significativo en los niveles de este marcador, respecto a los niveles pre-trasplante. Este hecho podría explicarse por los aumentos en los niveles de PIVKA-II que experimentan varios pacientes tanto a los 2 años como a los 3 años tras el trasplante. Concretamente, 14 pacientes presentan elevaciones leves, en los niveles de PIVKA-II entre el año y los 2 años post-trasplante, los cuales a fecha de cierre de la base de datos no habían presentado recidiva. De igual forma ocurre en los niveles de este

marcador a los 3 años post-trasplante, respecto a los valores al año post-trasplante, con ligeros aumentos en los niveles de PIVKA-II en 11 pacientes que tampoco presentaron recidiva post-trasplante a fecha de cierre de la base de datos. No obstante, a pesar de no alcanzar la significancia estadística, los niveles medianos de este marcador tumoral a los 2 años y a los 3 años post-trasplante reflejan una tendencia descendente y, según lo descrito en la literatura (256,301,302), la mayoría de recidivas se producen antes de los 2 años post-trasplante, como se aprecia en los pacientes de nuestro estudio, siendo la probabilidad de desarrollar recidiva tumoral bastante menor a partir de los 2 años tras el TOH.

Es importante subrayar que los niveles de PIVKA-II pueden estar elevados en determinadas situaciones distintas al CHC, como por ejemplo en casos de obstrucción biliar (253). También el nivel de PIVKA-II puede verse fuertemente influenciado por medicamentos como la rifampicina, la escasez de vitamina K (por ejemplo, debido a la desnutrición en pacientes cirróticos) y los medicamentos antivitaminas K (por ejemplo, anticoagulantes como el acenocumarol y la warfarina) (190). Sin embargo, las elevaciones de PIVKA-II en los pacientes de nuestro estudio que no presentaron recidiva tumoral post-trasplante no se asociaron a ninguna causa específica, ya que se comprobó que ninguno de estos pacientes estuviera en tratamiento con los fármacos mencionados previamente ni presentase deficiencia de vitamina K o ictericia obstructiva. Respecto a los niveles de AFP, éstos fueron significativamente más bajos al mes, al año y a los dos años post-trasplante, verificando una vez más la gran utilidad del uso conjunto de estos dos biomarcadores. Nuestros resultados se relacionan de forma estrecha con los obtenidos en estudios previos, como el de Feng y cols., en el que los niveles séricos de PIVKA-II y AFP disminuyeron significativamente después de la resección hepática (260).

Al estudiar por separado el comportamiento de PIVKA-II tras el trasplante en los pacientes incluidos en el presente trabajo que no presentaron recidiva tras el TOH y aquellos que sí la presentaron, se observó una disminución significativa de los niveles de PIVKA-II en los pacientes sin recidiva, tanto al mes como al año post-trasplante, mientras que en los pacientes con recidiva se pudo apreciar un claro aumento de los niveles al año post-trasplante. Esta diferencia en la evolución de los niveles séricos tras el TOH entre los pacientes sin recidiva y con recidiva también se observa en el caso de la AFP.

Al paciente 13 se le detectó recidiva a los 6 meses tras el trasplante. Los niveles de PIVKA-II en este paciente aumentaron al mes tras el TOH, respecto a los niveles pre-trasplante, y descendieron a los 6 meses post-trasplante, coincidiendo aproximadamente

con el momento en el que fue detectada la recidiva. Probablemente este paciente desarrolló la recidiva tumoral en torno al mes tras el TOH, de forma que PIVKA-II estaría indicando la recurrencia post-trasplante antes que las pruebas de imagen, como TC o RMN. Sin embargo, estos niveles vuelven a descender a los 6 meses post-trasplante, cuando se le detecta por imagen la recidiva del CHC y metástasis extrahepáticas, por lo que no podemos afirmar que la elevación de PIVKA-II al mes post-trasplante se produjera por la recidiva tumoral, a pesar de que fueron descartadas otras causas de elevación de PIVKA, ya mencionadas anteriormente, como por ejemplo el consumo de fármacos anticoagulantes antivitaminas K.

En los pacientes 7 y 19 la evolución de los niveles de PIVKA-II tras el TOH sigue un patrón ideal, en el que dichos niveles disminuyeron al mes post-trasplante respecto a los valores pre-trasplante, reflejando que el hígado enfermo de los pacientes con CHC es la fuente de producción de esta molécula de protrombina anormal, y aumentaron de forma considerable a los 6 meses post-trasplante, coincidiendo aproximadamente con la detección de recidiva tumoral por imagen en ambos pacientes.

En el caso del paciente 23 de nuestro estudio, los niveles de PIVKA-II también descendieron al mes tras el TOH respecto a los valores pre-trasplante, y aumentaron de forma abrupta al año post-trasplante, incluso antes de la detección de recidiva tumoral por imagen, mientras que los niveles de AFP permanecieron dentro del rango de referencia. Este hecho se relaciona con el estudio de Nanashima y cols., quienes mostraron que los cambios en los niveles de PIVKA-II, después de tratamientos como la hepatectomía y la terapia de ablación, tendían a reflejar mejor la recurrencia del tumor, en comparación con los cambios en el nivel de AFP (183). Por tanto, nuestros hallazgos en los pacientes con recidiva tumoral tras el TOH confirman que PIVKA-II podría ser un buen marcador en el estudio de evolución del CHC tras el trasplante hepático, reflejando la recidiva tumoral y complementando a AFP y a las pruebas radiológicas.

Las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento tumorales inflamatorios dentro del microambiente del tumor pueden facilitar o interrumpir el desarrollo y la progresión del CHC; por lo tanto, se ha sugerido que la concentración sérica de estas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento podría indicar el pronóstico de los pacientes con CHC (286). La evidencia acumulada indica un papel clave de la IL-6 en el proceso de daño hepático y carcinogénesis y su poder predictivo en el CHC (199).

Tras comparar los niveles de IL-6 entre las muestras pre- y post-trasplante de los pacientes incluidos en nuestro estudio, se observó que estos eran significativamente más

altos al mes y a los 2 años tras el trasplante. De igual forma, al separar a los pacientes en 2 grupos según presentasen recidiva tras el trasplante o no, con el fin de comprobar si esos aumentos significativos podían deberse a incrementos en los pacientes con recidiva, se constató que los niveles de IL-6 en los pacientes sin recidiva aumentaban de forma significativa al mes post-trasplante y que estos disminuían de forma significativa al año post-trasplante. También se observó que los niveles medianos de esta interleucina aumentaban de forma considerable en los pacientes con recidiva al año post-trasplante, aunque no significativamente por el bajo número de pacientes que presentaron recidiva. De forma individual, los pacientes 7 y 13 presentan un comportamiento similar en la evolución de IL-6, en el que los niveles de esta interleucina se elevan al mes post-trasplante y se mantienen más o menos estables al año tras el TOH. En el paciente 19, sin embargo, estos niveles disminuyen al mes post-trasplante y comienzan un ascenso a los 6 meses, elevándose de forma abrupta al año post-trasplante. Por último, en el paciente 23, la concentración sérica de IL-6 aumenta al mes, desciende a los 6 meses y vuelve a elevarse a los 2 años tras el trasplante, cuando ya había sido diagnosticado de recidiva y metástasis extrahepática.

A pesar de que este marcador refleja la recurrencia del CHC en los 4 pacientes del estudio que presentaron recidiva post-trasplante, también se observaron aumentos significativos en los pacientes sin recidiva tumoral tras el trasplante. Puesto que muchos trastornos clínicos están asociados a niveles séricos elevados de IL-6 (303), y según los resultados derivados del presente trabajo, la contribución de este marcador al manejo de la recidiva por CHC tras el trasplante sería limitada y requiere una mayor investigación.

Respecto a la evolución de los niveles de IL-8 en los pacientes incluidos en el estudio tras el trasplante, estos fueron significativamente más bajos al mes, al año, a los 2 años y a los 3 años post-trasplante. A los 6 meses, en cambio, el descenso no fue significativo, lo que probablemente se deba al aumento de dichos niveles en 6 pacientes. De ellos, únicamente 2 pacientes presentaron recidiva post-trasplante, que podría explicar ese aumento. Sin embargo, al resto de pacientes no se le detectó recidiva. Se sabe que esta citoquina, al igual que la IL-6, está implicada en el proceso inflamatorio, y puede elevarse en diversas situaciones clínicas como inflamación, infección u otros tipos de cáncer, por lo que se requiere una interpretación cuidadosa del nivel de IL-8 para hacer una correlación con el diagnóstico o pronóstico de la condición clínica deseada (304).

Por otra parte, en los pacientes sin recidiva post-trasplante también se observó una disminución significativa de los niveles de IL-8, tanto al mes como al año post-trasplante, a

diferencia de aquellos pacientes que presentaron recidiva tras el TOH, en los cuales aumentaron al año post-trasplante. Estudiando cada paciente con recidiva post-trasplante por separado, se aprecia que a excepción del paciente 7, en el que los niveles plasmáticos de IL-8 no aumentaron con la recidiva tumoral, en el resto de pacientes sí lo hicieron de forma clara, sobre todo en los pacientes 19 y 23, en los que tras un descenso en los meses posteriores al trasplante, se elevan de forma perceptible coincidiendo con la recurrencia del CHC.

A pesar de que no se encontraron en la literatura estudios que hayan llevado a cabo el análisis comparativo entre los niveles de IL-8 antes y después del TOH, nuestros resultados sugieren que esta quimiocina puede desempeñar un papel importante en la progresión y diseminación tumoral del CHC y proporcionar un valor predictivo adicional sobre la recurrencia del tumor y el pronóstico (204).

El aumento de la expresión de OPN se asocia con la invasión, la progresión y la metástasis del tumor en el CHC. Algunos estudios han demostrado que el aumento de los niveles de OPN en el plasma preoperatorio y en los tejidos tumorales se asocia con los malos resultados clínicos de los pacientes con CHC (305,306). Varios autores, como Cui y cols., han resaltado la importancia clínica de la OPN, tanto en la monitorización de la respuesta al tratamiento y la recurrencia del tumor después de la cirugía como antes de la misma, para predecir la metástasis y la recidiva del CHC (307), sin embargo estos autores no especificaron el tipo de tratamiento al que fueron sometidos los pacientes con esta patología.

Tras comparar los niveles de OPN antes y después del trasplante en los pacientes incluidos en el estudio, se encontró que estos eran significativamente más altos al mes y a los 6 meses post-trasplante, mientras que eran significativamente más bajos a los 2 años y a los 3 años post-trasplante. Cabiati y cols. observaron una reducción de la concentración plasmática de OPN a los 6 meses después del TOH y sugirieron un papel importante de esta proteína en la evaluación de pacientes tras el trasplante; sin embargo, esta reducción no fue significativa (281). En otro estudio, el nivel sérico de OPN de los pacientes fue significativamente más bajo tras la resección curativa del CHC y aumentó de nuevo cuando se produjo la recaída del tumor (290).

Asimismo, los niveles de OPN también aumentaron de forma significativa al mes tras el TOH en los pacientes sin recidiva. Con relación a los resultados obtenidos en el presente estudio, se ha descrito que los niveles de este marcador en sangre se pueden encontrar

elevados en situaciones clínicas diversas, como por ejemplo en la demencia asociada al VIH (308), en el lupus eritematoso sistémico (LES) (309), en la tuberculosis (310) o en la enfermedad de Alzheimer (311), así como en varios tipos de cáncer, como el de mama (312), de pulmón (313) o de cabeza y cuello (314).

Por otra parte, en los pacientes con recidiva se observó que los niveles de este marcador seguían una tendencia ascendente tras el trasplante. Individualmente, tanto los pacientes 7 como 19 muestran una clara tendencia ascendente; por el contrario, en el paciente 13 los niveles de OPN ascienden al mes pero descienden a los 6 meses, cuando se le detecta la recidiva por imagen. Por último, la concentración plasmática de OPN en el paciente 23 sigue un patrón similar al de la IL-6 en este mismo paciente, en el que estos niveles aumentan al mes, disminuyen a los 6 meses y comienza una leve tendencia ascendente al año post-trasplante. Teniendo en cuenta nuestros resultados en conjunto, la utilidad de la OPN en la monitorización del CHC tras el TOH sería cuestionable y serían necesarios más estudios para verificar el papel de este marcador.

El GPC3 ha despertado un considerable interés, ya que esta molécula está marcadamente sobreexpresada en el CHC y promueve su crecimiento (315). Algunos estudios informaron tanto de la sobreexpresión de GPC3 en tejidos de CHC, como de la elevación de esta proteína en el suero de una gran proporción de pacientes con esta enfermedad (316,317). En cuanto a la evolución de los niveles séricos de GPC3 tras el trasplante en los pacientes del presente trabajo, se observó que estos eran significativamente más bajos a los 2 años y a los 3 años post-trasplante respecto a los niveles pre-trasplante. En cambio al mes, a los 6 meses y al año post-trasplante los niveles de GPC3 no descienden significativamente ni presentan una tendencia descendente respecto a los niveles pre-trasplante. Concretamente, al mes post-trasplante, los niveles séricos de GPC3 se elevan en 16 pacientes, de los cuales sólo uno de ellos (paciente 19) presentó posteriormente recidiva tumoral. También a los 6 meses y al año post-trasplante se producen aumentos de los niveles séricos de GPC3, respecto a los niveles pre-trasplante, en 12 y en 9 pacientes, respectivamente. Estas elevaciones individuales de los niveles de GPC3 explican que los niveles de este marcador no desciendan de forma significativa al mes, a los 6 meses y al año post-trasplante. Adicionalmente, al separar a los pacientes en dos grupos, según presentasen recidiva post-trasplante o no, y comparar los niveles de este marcador antes y después del trasplante, tampoco se obtuvo ningún descenso significativo al mes ni al año post-trasplante en los pacientes sin recidiva, ni se aprecia ninguna tendencia

ascendente en los pacientes con recidiva. Particularmente en estos pacientes, de forma individual, este biomarcador no experimenta aumentos claros en el momento de la recidiva, a excepción de una ligera elevación en el paciente 7.

El GPC3 está implicado en la inhibición de la proliferación celular y la modulación de la supervivencia celular durante el proceso de desarrollo del órgano. Esta glicoproteína puede tener valor como biomarcador, además de en CHC, en otros tipos de cáncer como carcinoma de pulmón, neumonía grave y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) (318). A pesar de que los niveles de este biomarcador descienden significativamente a los 2 años y a los 3 años post-trasplante en los pacientes de nuestro estudio, el papel del GPC3 requiere más investigación para dilucidar su asociación con el CHC en pacientes trasplantados.

Respecto al comportamiento de MMP-1 tras el trasplante, los niveles de este marcador en los pacientes de nuestro estudio experimentaron un descenso significativo al mes post-trasplante respecto a los valores preoperatorios; por el contrario, estos niveles fueron significativamente más altos a los 3 años tras el TOH. Estos resultados guardan cierta similitud con el estudio preliminar de nuestro grupo en el que, de igual forma, se detectó un descenso significativo en los niveles de MMP-1 tras el TOH, pero en este caso tanto al mes como al año post-trasplante. Por otra parte, en el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de MMP-1 a los 6 meses después del trasplante, coincidiendo con los hallazgos de nuestro estudio preliminar. Esto se debe a la detección de 5 incrementos en la concentración sérica de MMP-1 respecto a los niveles al mes post-trasplante, 3 de ellos en pacientes que presentaron recidiva de CHC verificadas por PET-TC a los 6 meses tras el TOH, concretamente los pacientes 7, 13 y 19. Mientras que los pacientes 5 y 33 no presentaron recidiva post-trasplante. De éstos destaca el paciente 33, en el que el valor de MMP-1 asciende de 0,79 ng/mL al mes post-trasplante a 10,72 ng/mL a los 6 meses post-trasplante. Como se ha comentado previamente, los niveles de MMP-1 no experimentaron un descenso significativo al año post-trasplante en nuestro estudio actual. Este hecho se explica por los altos niveles séricos de este marcador en el paciente 33 al año post-trasplante, los cuales se mantuvieron elevados también a los 2 años y a los 3 años tras el TOH (11,90; 10,62 y 11,72 ng/mL, respectivamente), sin presentar recidiva tumoral constatada por imagen a fecha de cierre de la base de datos. Según la bibliografía, los niveles de MMP-1 pueden aumentar en pacientes con otras situaciones clínicas, como osteoartritis (319), cáncer de próstata (320) o en pacientes con rotura de las placas ateroscleróticas (321).

Al agrupar a los pacientes del estudio según presentasen recidiva post-trasplante o no y comparar los niveles de MMP-1 antes y después del trasplante, estos tampoco descendieron significativamente al año post-trasplante en los pacientes sin recidiva, cuya justificación podría ser la elevación de la MMP-1 en otras situaciones clínicas, como ya se ha mencionado. Por otra parte, en los pacientes con recidiva se puede observar una tendencia ascendente en la concentración de este marcador tumoral tras el trasplante. En ellos, tras estudiar el comportamiento de este marcador de forma individual y salvo en el paciente 13, se aprecia un incremento en la concentración sérica de MMP-1, coincidiendo con la detección de recidiva tumoral post-trasplante por pruebas de imagen. Por último, se puede apreciar que en el paciente 19, el patrón de la evolución de los niveles de MMP-1 tras el trasplante es bastante similar al de IL-8.

Se sabe que la invasión vascular microscópica en el explante es un factor de riesgo de recurrencia del CHC después del trasplante (173,322) y que una vez que se ha desarrollado la invasión vascular, el pronóstico es malo en estos pacientes (173,323). Sin embargo, en el presente trabajo, de los pacientes con invasión microvascular únicamente el paciente 19 presentó también recidiva tumoral post-trasplante, con metástasis ósea y hepática, la cual fue la causa del éxitus. Asimismo, se ha demostrado que la presencia de ADN tumoral circulante es predictiva de la invasión de la vena porta y metástasis extrahepáticas en pacientes sometidos a hepatectomía o trasplante de hígado (324).

Tras agrupar a los pacientes incluidos en el estudio en dos grupos diferentes, según presentasen invasión vascular o no, y estudiar la evolución de los marcadores analizados en estos dos grupos por separado, se observó que tanto los niveles de PIVKA-II como de AFP descendían significativamente al mes y al año en los pacientes sin invasión vascular. Asaoka y cols., en consonancia con estudios previos, descubrieron que PIVKA-II estaba fuertemente relacionada con el desarrollo de la invasión vascular. Un mecanismo sugerido detrás de la relación entre la invasión vascular y niveles elevados de PIVKA-II era que la hipoxia en el tumor, que es un desencadenante clave de transición epitelial-mesenquimal, se correlaciona con las elevaciones de este biomarcador (323).

Respecto al resto de biomarcadores estudiados, IL-6, OPN y MMP-1 experimentaron un descenso significativo, en los pacientes sin invasión, al mes post-trasplante. De forma similar, se encontró que los niveles de IL-8 descendían significativamente al año en los pacientes sin invasión. No obstante, en los pacientes con invasión vascular los niveles de los biomarcadores estudiados no presentaron incrementos claros ni comportamientos

concluyentes en comparación con los pacientes sin invasión vascular en los que, en su gran mayoría, sí disminuyeron de forma notable.

Desde el punto de vista clínico, es de gran importancia identificar biomarcadores útiles para la predicción del pronóstico en el CHC, lo que puede ayudar a adoptar estrategias preventivas para los pacientes de alto riesgo y mejorar aún más la evolución clínica de los pacientes con esta enfermedad (223). En cuanto a la recurrencia post-tratamiento, concretamente tras la ablación por radiofrecuencia, PIVKA-II es el marcador tumoral que tiene mayor potencial predictivo, pero aún no está validado en el mundo occidental ni tiene un valor de corte objetivo (325). Park y cols., en su metaanálisis, pusieron de manifiesto que los pacientes con niveles elevados de AFP y PIVKA-II antes de la resección hepática experimentaban una incidencia significativamente mayor de recidiva tumoral tras el tratamiento curativo (167). Asimismo, los niveles preoperatorios elevados de AFP y PIVKA-II se asociaron con una recidiva temprana (dentro de los 6 meses) después de la resección curativa (326). Estos pacientes tenían valores preoperatorios de AFP y PIVKA-II más altos que los que desarrollaron recidivas >6 meses después de la cirugía.

Un estudio previo demostró que un valor máximo de AFP antes del trasplante con un valor de corte de 253 ng/mL tenía un buen rendimiento en la predicción de la recidiva del CHC después del trasplante hepático de donante vivo, con un AUC de 0,878, una sensibilidad del 73% y una especificidad del 91% (237). Además, se descubrió que un nivel de AFP antes del trasplante > 200 ng/mL se correlacionaba significativamente con una mayor incidencia de invasión microvascular en el hígado explante (327). Todos estos hallazgos sugieren que la AFP en el punto de corte de 250 ng/mL podría ser potencialmente un buen predictor preoperatorio de la recurrencia del CHC después del trasplante (176). En nuestro estudio, tras evaluar la capacidad de predicción de recidiva post-trasplante de los niveles pre-trasplante de AFP y PIVKA-II, se encontró que PIVKA-II fue mejor predictor de recidiva que AFP, con un AUC de PIVKA-II de 0,613 frente al AUC de AFP de 0,544. Nuestros resultados concuerdan con los de Chaiteerakij y cols., quienes demostraron que PIVKA-II fue el mejor predictor de recurrencia de la enfermedad entre los 4 biomarcadores evaluados antes del trasplante (AFP, AFP-L3, AFP-L3 % y PIVKA-II), y también un mejor predictor que los criterios de Milán (176). Esto es biológicamente viable porque PIVKA-II se comporta como un factor de crecimiento endotelial vascular que posee potentes actividades mitogénicas y migratorias, promoviendo la proliferación y la migración de las células endoteliales (328).

Sin embargo, la AFP es un producto de las células tumorales en lugar de tener algún efecto biológico para promover el crecimiento del tumor (176).

De todos los marcadores estudiados, sólomente PIVKA-II, AFP y MMP-1 presentaron AUCs por encima del 50%, si bien estos resultados no fueron significativos ($p>0,05$). Además, los análisis de la curva ROC mostraron un AUC $<0,7$ en todos los biomarcadores estudiados, y un intervalo de confianza (IC95%) amplio, lo que sugiere un escaso poder discriminatorio de los marcadores antes del trasplante para predecir recaída.

La combinación de los niveles pre-trasplante de PIVKA-II y AFP para la predicción de recidiva post-trasplante aumentó el AUC a 0,742 con un aumento de la sensibilidad (100%) pero con una disminución de la especificidad (45,2%). Nuestros resultados guardan cierta similitud a los obtenidos en otros trabajos, como el de Chon y cols., en el que la sensibilidad, pero también la especificidad, mejoraron simultáneamente cuando se midieron tanto los niveles de AFP como los de PIVKA-II antes de la resección hepática (sensibilidad, 66,7%; especificidad, 47,9%) en comparación con las obtenidas cuando sólo se midieron los niveles de AFP (sensibilidad 60,1% y especificidad 45,2%) o los niveles de PIVKA-II (sensibilidad 62,9% y especificidad 47,9%) (329). También Lee y cols. demostraron que la combinación de AFP y PIVKA-II era un mejor predictor de la recidiva tras el trasplante en el CHC avanzado que cualquiera de los dos marcadores por separado (191). En el estudio anteriormente citado de Chaiteerakij y cols., el riesgo de recurrencia aumentó de forma adicional cuando se consideraron conjuntamente AFP y PIVKA-II, lo que apoya el concepto de que no existe un biomarcador único perfecto porque el CHC es un tumor muy heterogéneo (176); por tanto, el uso combinado de biomarcadores puede aportar más información para el manejo clínico de los pacientes en el trasplante por CHC que cualquier marcador por separado.

En nuestro estudio, PIVKA-II con MMP-1 también elevaron el AUC hasta 0,710, con una sensibilidad de 100% y una especificidad de 41,9%. Sin embargo, la combinación formada por AFP y MMP-1 no supuso un aumento del AUC, ya que éste fue menor que el de ambos marcadores por separado. Por último, la combinación de estos tres marcadores (PIVKA-II + AFP + MMP-1) no aumentó el AUC respecto al obtenido en la combinación de PIVKA-II y AFP. Así, la determinación combinada de estos biomarcadores podría mejorar la capacidad de cada uno de ellos en solitario para identificar a los pacientes con mayor probabilidad de presentar recidiva post-trasplante, si bien los resultados obtenidos tras el uso conjunto de los marcadores tampoco fueron estadísticamente significativos ($p>0,05$).

Los CHC grandes o múltiples no siempre se asocian a un mal pronóstico, ya que el tamaño y el número del tumor no son completamente capaces de predecir la invasión vascular y el comportamiento biológico del cáncer. Aunque algunos estudios han añadido las características histopatológicas del tumor a la hora de evaluar el riesgo de recidiva tumoral, los resultados histopatológicos suelen ser difíciles de obtener antes de la TC. Por lo tanto, los marcadores tumorales pueden desempeñar un importante papel para tomar decisiones previas al trasplante en relación con la biología del tumor (330). Como ya se ha comentado, la AFP y el PIVKA-II son los marcadores tumorales más importantes y comunes utilizados en pacientes con CHC. Varios estudios han demostrado que los niveles preoperatorios de estos dos marcadores tumorales eran factores pronósticos para el CHC (329). Carr y cols. llegaron a la conclusión de que existía una asociación significativa entre el nivel de AFP preoperatorio y la invasión de la vena porta y, en consecuencia, la supervivencia de los pacientes (157). Cucchetti y cols. afirmaron que el nivel de AFP preoperatorio podría ser un factor pronóstico de recurrencia temprana y tardía en pacientes con cirrosis hepática (331). También Park y cols. concluyeron en su revisión que los niveles séricos elevados de AFP y/o PIVKA-II tanto antes como después de la hepatectomía predijeron de forma independiente la SG y la SLE, al igual que el tamaño del tumor, el número de tumores y la existencia de invasión vascular (167).

Respecto a la IL-6, los niveles elevados antes del tratamiento se asociaron con un mal pronóstico de los pacientes con CHC avanzado (283). Sheng y cols. encontraron que tanto la SG como la SLE eran significativamente más bajas si los niveles séricos de IL-6 previos a la resección hepática superaban los 3,1 pg/mL (196). En los pacientes con CHC temprano relacionado con el VHB que fueron sometidos a resección hepática o ablación por radiofrecuencia con intención curativa, se demostró que un nivel bajo de IL-6 en suero es un factor pronóstico independiente de la SLE (286). Además, la concentración sérica elevada de IL-6 se asoció con un mayor riesgo de recurrencia del CHC asociado al VHB, lo que sugiere que la IL-6 es un potencial biomarcador para la predicción temprana de la recurrencia del CHC asociado al VHB (196).

La expresión de OPN es elevada en los tejidos de CHC y se correlaciona con un mal pronóstico en estos pacientes, ya que puede inducir la neovascularización local e inhibir la apoptosis de las células tumorales inducida por la modificación del microambiente extracelular, desempeñando así un papel crítico en la invasión tumoral y la metástasis (216). Múltiples estudios muestran una asociación entre la OPN sérica y una mala SG y SLE en

pacientes tras la resección quirúrgica, así como un mayor estadio del CHC y tamaño del tumor y la invasión vascular (332). Kim y cols. concluyeron que un nivel elevado de IL-8 antes del tratamiento fue un factor predictivo significativo de una menor SLE. En particular, la IL-8 mostró un mejor poder predictivo que la AFP con respecto a la SLE en su población de estudio (333). Liao y cols. demostraron que los niveles de expresión de MMP-1 eran factores pronósticos independientes de la SG y la SLE en pacientes con CHC (229). Estos resultados pusieron de manifiesto que la expresión elevada de MMP-1 está asociada a la progresión de la enfermedad del CHC, y los pacientes con alta expresión de este biomarcador tenían un resultado clínico desfavorable. Por otra parte, en un metanálisis llevado a cabo por Xiao y cols., se demostró que la expresión elevada de GPC3 predijo significativamente una mala SG y SLE para los pacientes con CHC (223). Liu y cols. demostraron un valor pronóstico prometedor de la GPC3 detectada en muestras tumorales tanto para la SG como para la SLE del CHC (222). Los pacientes con una expresión elevada de GPC3 tenían un riesgo 1,38 veces mayor de mala SG y 1,98 veces mayor de mala SLE, en comparación con los que tenían una expresión baja de GPC3. Asimismo, Li y cols. demostraron que la expresión elevada de GPC3 estaba estrechamente relacionada con una mala SG y SLE en pacientes con CHC (334).

Además de los marcadores tumorales, recientemente se ha informado de una posible correlación entre el estado inflamatorio preoperatorio y el pronóstico de los pacientes, tanto en estudios de resección quirúrgica como de trasplante. Estudios recientes informaron de que el NLR puede ser un marcador para el riesgo de recidiva tumoral que refleja el microambiente tumoral inflamatorio. Una elevación del NLR podría estar relacionada con un aumento relativo de los neutrófilos (como consecuencia de algún tipo de respuesta inflamatoria), con una disminución del recuento de linfocitos (reflejando un menor control inmunológico del crecimiento del tumor), o con ambos fenómenos, y varios estudios apoyan cada una de estas hipótesis (335), aunque la relevancia clínica y el valor pronóstico del NLR siguen siendo controvertidos (237). También se ha sugerido que la concentración sérica de PCR antes de la resección hepática es un factor predictivo útil para la recidiva del CHC después de la terapia curativa (336). Asimismo, la presencia de niveles elevados de otros parámetros de laboratorio como fosfatasa alcalina (275), bilirrubina y GOT (333), han sido asociados a una menor SG y SLE tras el trasplante hepático. Las variables clinicopatológicas también pueden predecir la supervivencia tras la cirugía en pacientes con CHC, como el número de tumores y la invasión vascular (333), la cual es uno de los predictores más importantes de la mala supervivencia de los pacientes con CHC (323).

En nuestro estudio, de los 35 pacientes que fueron trasplantados, 7 pacientes (20%) fallecieron tras el trasplante, 4 de los cuales fallecieron debido a recidiva/metástasis post-trasplante. Las tasas de SG y de SLE al año y a los 3 años fueron de 87%, 77% y de 90%, 87%, respectivamente. Estas tasas de supervivencia son similares a las observadas en trabajos previos, sin embargo el tratamiento del CHC llevado a cabo en esos estudios fue trasplante hepático de donante vivo (174,188).

Tras analizar las curvas de supervivencia de pacientes trasplantados con diferentes características clínico-analíticas, se observaron diferencias significativas en la SG y SLE entre los grupos de pacientes con niveles de PIVKA-II <592 mAU/mL y ≥ 592 mAU/mL, de forma que aquellos pacientes con niveles de PIVKA-II ≥ 592 mAU/mL presentaron una SG y una SLE significativamente menor que aquellos pacientes con niveles de PIVKA-II <592 mAU/mL. En consecuencia, los niveles pre-trasplante de PIVKA-II serían buenos predictores de SG y de SLE en pacientes con CHC candidatos a TOH. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la SG ni SLE entre los pacientes con niveles de AFP $<9,65$ ng/mL y $\geq 9,65$ ng/mL. La AFP como indicador pronóstico carece de consistencia, ya que varios autores informaron de una correlación limitada de los niveles de AFP con factores de la enfermedad como el tamaño del tumor, el estadio o la progresión de la enfermedad. Es importante destacar que alrededor del 30-40% de los CHC no son secretores de AFP (257). Nuestros resultados se relacionan con los de Nanashima y cols., quienes mostraron que los pacientes con niveles de AFP previos a la resección quirúrgica entre 20-200 y >200 ng/mL tenían tasas similares de SG y SLE, mientras que las tasas de SG y SLE de los pacientes con niveles de PIVKA-II entre 40-400 mAU/mL fueron mejores que en aquellos con niveles >400 mAU/mL, indicando que un nivel de PIVKA-II >400 mAU/mL es un predictor de mal pronóstico y que este biomarcador es más sensible que la AFP para predecir la recurrencia del tumor o el pronóstico (183). Es importante destacar que estos autores engloban en el grupo de pacientes sometidos a resección quirúrgica ($n=331$), tanto pacientes sometidos a resección hepática parcial ($n=322$), como a pacientes sometidos a trasplante hepático completo ($n=9$). En cualquier caso, el papel pronóstico del PIVKA-II parece estar vinculado a su asociación con una elevada proliferación celular y crecimiento tumoral, así como con elevados valores de crecimiento infiltrativo y de invasión vascular (337).

Los estudios realizados en Japón tienden a aplicar tres marcadores tumorales: AFP, PIVKA-II y AFP-L3, para el cribado, la evaluación de los efectos terapéuticos y el seguimiento. Sin embargo, algunos investigadores de Japón y Taiwán cuestionaron la contribución de

AFP-L3 en el valor diagnóstico y pronóstico. Por lo tanto, se considera que el uso de una combinación de AFP y PIVKA-II es eficaz para predecir el pronóstico y controlar a los pacientes con CHC (185). Asimismo, los criterios de Kioto incluyen a PIVKA-II, como marcador de agresividad tumoral que refleja la malignidad biológica. Kamo y cols. mostraron que estos criterios pueden excluir eficazmente a los pacientes con alto riesgo de recurrencia antes de someterse al TOH (338).

En el caso de la OPN y el nº de LOES, se encontraron diferencias significativas en la SG pero no en la SLE, de forma que los pacientes con niveles pre-trasplante de OPN $\geq 10,30$ ng/mL presentaban una mayor SG que aquellos con niveles $< 10,30$ ng/mL. Este resultado es incongruente a lo descrito en otros estudios, en los que se demostró que una alta expresión de OPN en tejido de CHC predecía una menor SG y SLE (214,216), por lo que según nuestros resultados el papel de la OPN como factor predictivo de la SG sería cuestionable. Por tanto, es necesario seguir explorando el papel de este biomarcador en el pronóstico del CHC en estudios con un mayor número de pacientes. Asimismo, los pacientes de nuestro estudio con más de un nódulo tumoral presentaban una SG significativamente menor que aquellos con un único nódulo tumoral, relacionándose este hallazgo con el estudio de Lee y cols., en el que el número de tumores fue un predictor independiente de la SG para los pacientes con CHC después del tratamiento con TACE (184).

Por último no se encontraron diferencias en la SG ni en la SLE entre pacientes con niveles elevados y disminuidos de IL-6, IL-8, GPC3, MMP-1, ni entre pacientes con ausencia o presencia de invasión microvascular, presencia o ausencia de necrosis tumoral, así como entre pacientes con niveles dentro del rango de referencia o elevados de PCR, NLR, LDH, GOT, GPT, GGT, bilirrubina y fosfatasa alcalina. Por tanto, todas estas variables tanto clínicas como de laboratorio, no serían buenos predictores de la SG ni de la SLE en los pacientes con CHC tras el trasplante hepático, según los resultados obtenidos en el presente trabajo. No obstante, el desarrollo y la validación de un modelo que pueda predecir con seguridad el resultado post-trasplante basándose en las variables previas al trasplante son una tarea extremadamente compleja, ya que los acontecimientos independientes que se producen en el período perioperatorio, como el rechazo del injerto, las complicaciones biliares, las complicaciones vasculares y la propia capacidad del equipo quirúrgico, pueden interferir en el resultado primario del estudio (250).

El número de pacientes de nuestro estudio fue una limitación propia de estos trabajos debido a dos factores, por un lado, los pacientes deben cumplir una serie de requisitos estrictos para formar parte de la lista de espera y ser candidatos a trasplante, y además, debe existir un donante con un órgano compatible con el receptor. La otra limitación es el nivel de recurrencia en el post-trasplante, del 6-18%. Ambos factores actúan limitando bastante los casos a estudio. En este contexto, los resultados de este estudio pueden ser útiles para el desarrollo de nuevas líneas de investigación que aporten nueva evidencia para que PIVKA-II se incorpore como un biomarcador útil en el manejo del CHC en el laboratorio clínico, como ocurre en países como Japón, donde junto con la ecografía y la AFP-L3, se utiliza en el cribado de pacientes de riesgo cada 6 meses (259).

6. CONCLUSIONES

Primera: ninguno de los biomarcadores estudiados (PIVKA-II, IL-6, IL-8, OPN, MMP-1 y AFP) se asocia con la etiología de la cirrosis previa al CHC, por lo que los niveles de estos marcadores son independientes de la enfermedad subyacente al cáncer hepático.

Segunda: los niveles pre-trasplante de PIVKA-II se asocian con factores clínicopatológicos, tales como un mayor tamaño tumoral y al nº de TACES pre-trasplante, a factores bioquímicos de mal pronóstico como la LDH y la fosfatasa alcalina y a un mayor estado de inflamación hepática (PCR), de forma que una mayor concentración sérica de PIVKA-II puede indicar un mayor volumen tumoral y un peor estadio clínico antes del trasplante en pacientes con CHC.

Tercera: la monitorización de los niveles de PIVKA-II en los pacientes trasplantados por CHC refleja la aparición de recidiva tumoral tras el trasplante y podría utilizarse, complementando a la AFP y a las pruebas de imagen, como un biomarcador novedoso reflejando la recurrencia temprana de esta patología.

Cuarta: IL-6, IL-8 y MMP-1 se asocian significativamente con parámetros clínicos del CHC y con AFP, por lo que podrían tener un papel en el paciente con CHC candidato a TOH, como biomarcadores de enfermedad avanzada. Además, los niveles post-trasplante de IL-8 y MMP-1 evidencian la aparición recidiva tumoral, por lo que, también podrían ser útiles en la seguimiento del paciente trasplantado por CHC.

Quinta: la utilidad de OPN y GPC3 en el trasplante hepático por CHC, según los resultados derivados del presente estudio, sería discutible. Por tanto, se requieren estudios más amplios donde se verifique el papel de estos nuevos biomarcadores.

Sexta: los niveles pre-trasplante de PIVKA-II son mejores predictores de recidiva post-trasplante que los de AFP, aumentando esta capacidad predictiva el uso conjunto de los dos biomarcadores. No obstante, ningún biomarcador de los analizados alcanza la significancia para la predicción de recidiva post-trasplante.

Séptima: los niveles pre-trasplante de PIVKA-II son predictores adecuados de SG y de SLE en los pacientes sometidos a trasplante hepático por CHC. Asimismo, la presencia de un nódulo

tumoral o más de un nódulo tumoral también puede ser un factor predictor de la SG tras el trasplante.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249.
2. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380(15):1450-1462.
3. Ogunwobi OO, Harricharran T, Huaman J, Galuza A, Odumuwagon O, Tan Y, et al. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World J Gastroenterol*. 2019 May 21;25(19):2279-2293.
4. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2021 Jan;73 Suppl 1(Suppl 1):4-13.
5. Fact Sheets by Population-Globocan-IARC n.d. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx (accessed December 18, 2017).
6. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2018 Jul;69(1):182-236.
7. Petrick JL, Florio AA, Znaor A, Ruggieri D, Laversanne M, Alvarez CS, et al. International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978-2012. *Int J Cancer*. 2020 Jul 15;147(2):317-330.
8. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012;142:1264–1273, e1.
9. White DL, Thrift AP, Kanwal F, Davila J, El-Serag HB. Incidence of Hepatocellular Carcinoma in All 50 United States, From 2000 Through 2012. *Gastroenterology*. 2017 Mar;152(4):812-820.e5.
10. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del cáncer en España 2022. https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.pdf.
11. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2002 Aug;31(4):339-46.
12. Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2019 Jan;156(2):477-491.e1.
13. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Oct;16(10):589-604.
14. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2002 Jul 18;347(3):168-74.
15. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65–73.

16. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Feb 16;97(4):265-72.
17. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Risk Evaluation of Viral Load Elevation and Associated Liver Disease/Cancer-In HBV (the REVEAL-HBV) Study Group. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology.* 2006 Mar;130(3):678-86.
18. Tarocchi M, Polvani S, Marroncini G, Galli A. Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014 Sep 7;20(33):11630-40.
19. Ortega-Prieto AM, Dorner M. Immune Evasion Strategies during Chronic Hepatitis B and C Virus Infection. *Vaccines (Basel).* 2017 Sep 1;5(3):24.
20. Dhanasekaran R, Bando S, Roberts LR. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Res.* 2016 May 12;5:F1000 Faculty Rev-879.
21. Ramakrishna G, Rastogi A, Trehanpati N, Sen B, Khosla R, Sarin SK. From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence. *Liver Cancer.* 2013 Aug;2(3-4):367-83.
22. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, Di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology.* 2009 Jan;136(1):138-48.
23. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol.* 2009 Jun;50(6):1142-54.
24. Kanwal F, Kramer JR, Ilyas J, Duan Z, El-Serag HB. HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. *Hepatology.* 2014 Jul;60(1):98-105.
25. Fujiwara N, Friedman SL, Goossens N, Hoshida Y. Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine. *J Hepatol.* 2018 Mar;68(3):526-549.
26. Montoya-Guzmán M, DuqueJaramillo A, Gaviria-Calle M, Hoyos S, Restrepo JC, Navas MC. Mutación R249S TP53 en pacientes con cirrosis y carcinoma hepatocelular en un hospital de Medellín. *Rev CES Med* 2019; 33(2): 100-110.
27. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature.* 1991 Apr 4;350(6317):427-8.
28. Ramadori P, Cubero FJ, Liedtke C, Trautwein C, Nevzorova YA. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: Adding Fuel to the Flame. *Cancers (Basel).* 2017 Sep 25;9(10):130.
29. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014 Dec;46(12):1267-73.

30. Ahmed A, Wong RJ, Harrison SA. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015 Nov;13(12):2062-70.
31. Kanwal F, Kramer JR, Mapakshi S, Natarajan Y, Chayanupatkul M, Richardson PA, et al. Risk of Hepatocellular Cancer in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2018 Dec;155(6):1828-1837.e2.
32. Jinjuvadia R, Patel S, Liangpunsakul S. The association between metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: systemic review and meta-analysis. *J Clin Gastroenterol*. 2014 Feb;48(2):172-7.
33. Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Aug;7(8):448-58.
34. Kuper H, Tzonou A, Kaklamani E, Hsieh CC, Lagiou P, Adami HO, et al. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2000 Feb 15;85(4):498-502.
35. Bravi F, Tavani A, Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C. Coffee and the risk of hepatocellular carcinoma and chronic liver disease: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer Prev*. 2017 Sep;26(5):368-377.
36. Singh S, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W. Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2013 Feb;144(2):323-32.
37. Zhou YY, Zhu GQ, Liu T, Zheng JN, Cheng Z, Zou TT, et al. Systematic Review with Network Meta-Analysis: Antidiabetic Medication and Risk of Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep*. 2016 Sep 19;6:33743.
38. Sahasrabudhe VV, Gunja MZ, Graubard BI, Trabert B, Schwartz LM, Park Y, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use, chronic liver disease, and hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Dec 5;104(23):1808-14.
39. Dimitroulis D, Damaskos C, Valsami S, Davakis S, Garmpis N, Spartalis E, et al. From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world. *World J Gastroenterol*. 2017 Aug 7;23(29):5282-5294.
40. Miaskowski C, Dodd M, Lee K. Symptom clusters: the new frontier in symptom management research. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2004;(32):17-21.
41. Rakoski MO, Volk ML. Palliative care for patients with end-stage liver disease: An overview. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2015 Jul 28;6(1):19-21.
42. Valla DC. The diagnosis and management of the Budd-Chiari syndrome: consensus and controversies. *Hepatology*. 2003 Oct;38(4):793-803.
43. Hiraoka A, Hirooka M, Koizumi Y, Izumoto H, Ueki H, Kaneto M, et al. Muscle volume loss as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib. *Hepatol Res*. 2017 May;47(6):558-565.

44. Pinato DJ, North BV, Sharma R. A novel, externally validated inflammation-based prognostic algorithm in hepatocellular carcinoma: the prognostic nutritional index (PNI). *Br J Cancer*. 2012 Apr 10;106(8):1439-45.
45. Zabora J, BrintzenhofeSzoc K, Curbow B, Hooker C, Piantadosi S. The prevalence of psychological distress by cancer site. *Psychooncology*. 2001 Jan-Feb;10(1):19-28.
46. 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. *Hepatology*. 2006 Jun;43(6):1303-10.
47. Forner A, Reig M, Varela M, Burrel M, Feliu J, Briceño J, et al. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH [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.
48. Singal A, Volk ML, Waljee A, Salgia R, Higgins P, Rogers MA, 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.
49. Bruix J, Sherman M; American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011 Mar;53(3):1020-2.
50. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, Massironi S, Colucci A, Conte D, et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2006 Mar;101(3):513-23.
51. Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography--an increasing source of radiation exposure. *N Engl J Med*. 2007 Nov 29;357(22):2277-84.
52. Cho KJ, Choi NK, Shin MH, Chong AR. Clinical usefulness of FDG-PET in patients with hepatocellular carcinoma undergoing surgical resection. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2017 Nov;21(4):194-198.
53. Lin CY, Liao CW, Chu LY, Yen KY, Jeng LB, Hsu CN, 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-e187.
54. Thie JA. Understanding the standardized uptake value, its methods, and implications for usage. *J Nucl Med*. 2004 Sep;45(9):1431-4.
55. Murakami K. FDG-PET for hepatobiliary and pancreatic cancer: Advances and current limitations. *World J Clin Oncol*. 2011 May 10;2(5):229-36.
56. Stigliano R, Marelli L, Yu D, Davies N, Patch D, Burroughs AK. Seeding following percutaneous diagnostic and therapeutic approaches for hepatocellular carcinoma. What is the risk and the outcome? Seeding risk for percutaneous approach of HCC. *Cancer Treat Rev*. 2007 Aug;33(5):437-47.
57. Abbasi A, Bhutto AR, Butt N, Munir SM. Correlation of serum alpha fetoprotein and tumor size in hepatocellular carcinoma. *J Pak Med Assoc*. 2012 Jan;62(1):33-6.

58. 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. *Hepatology*. 2008 Jan;47(1):97-104.
59. Lok AS, Lai CL. Alpha-Fetoprotein monitoring in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection: role in the early detection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1989 Jan;9(1):110-5.
60. Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, Everhart JE, Dienstag JL, Bonkovsky HL, et al. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol*. 2005 Sep;43(3):434-41.
61. Mueller SB, Micke O, Herbst H, Schaefer U, Willich N. Alpha-fetoprotein-positive carcinoma of the pancreas: a case report. *Anticancer Res*. 2005 May-Jun;25(3A):1671-4.
62. Ishikawa K, Sasaki A, Haraguchi N, Yoshikawa Y, Mori M. A case of an alpha-fetoprotein-producing intrahepatic cholangiocarcinoma suggests probable cancer stem cell origin. *Oncologist*. 2007 Mar;12(3):320-4.
63. Saffroy R, Pham P, Reffas M, Takka M, Lemoine A, Debuire B. New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(9):1169-79.
64. Park SJ, Jang JY, Jeong SW, Cho YK, Lee SH, Kim SG, et al. Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Mar;96(11):e5811.
65. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*. 2001 Sep;35(3):421-30.
66. Bruix J, Sherman M. Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005 Nov;42(5):1208-36.
67. Forner A, Ayuso C, Isabel Real M, Sastre J, Robles R, Sangro B, et al. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular [Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma]. *Med Clin (Barc)*. 2009 Feb 28;132(7):272-87.
68. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2018 Mar 31;391(10127):1301-1314.
69. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clin Chem*. 2000 Dec;46(12):2050-68.
70. Schöniger-Hekele M, Müller C, Kutilek M, Oesterreicher C, Ferenci P, Gangl A. Hepatocellular carcinoma in Central Europe: prognostic features and survival. *Gut*. 2001 Jan;48(1):103-9.
71. Faloppi L, Bianconi M, Memeo R, Casadei Gardini A, Giampieri R, Bittoni A, et al. Lactate Dehydrogenase in Hepatocellular Carcinoma: Something Old, Something New. *Biomed Res Int*. 2016;2016:7196280.

72. Xia W, Ke Q, Wang Y, Wang W, Zhang M, Shen Y, et al. Predictive value of pre-transplant platelet to lymphocyte ratio for hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *World J Surg Oncol*. 2015 Feb 18;13:60.
73. Xiao WK, Chen D, Li SQ, Fu SJ, Peng BG, Liang LJ. Prognostic significance of neutrophil-lymphocyte ratio in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2014 Feb 21;14:117.
74. Motomura T, Shirabe K, Mano Y, Muto J, Toshima T, Umemoto Y, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio reflects hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation via inflammatory microenvironment. *J Hepatol*. 2013 Jan;58(1):58-64.
75. Sieghart W, Pinter M, Hucke F, Graziadei I, Schöniger-Hekele M, Müller C, et al. Single determination of C-reactive protein at the time of diagnosis predicts long-term outcome of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013 Jun;57(6):2224-34.
76. Nagaoka S, Yoshida T, Akiyoshi J, Akiba J, Torimura T, Adachi H, et al. Serum C-reactive protein levels predict survival in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2007 Oct;27(8):1091-7.
77. Halazun KJ, Hardy MA, Rana AA, Woodland DC 4th, Luyten EJ, Mahadev S, et al. Negative impact of neutrophil-lymphocyte ratio on outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*. 2009 Jul;250(1):141-51.
78. Marrero JA, Kudo M, Bronowicki JP. The challenge of prognosis and staging for hepatocellular carcinoma. *Oncologist*. 2010;15 Suppl 4:23-33.
79. Selçuk H. Prognostic Factors and Staging Systems in Hepatocellular Carcinoma. *Exp Clin Transplant*. 2017 Mar;15(Suppl 2):45-49.
80. Peng Y, Qi X, Dai J, Li H, Guo X. Child-Pugh versus MELD score for predicting the in-hospital mortality of acute upper gastrointestinal bleeding in liver cirrhosis. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Jan 15;8(1):751-7.
81. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*. 1973 Aug;60(8):646-9.
82. Tsoiris A, Marlar CA. Use Of The Child Pugh Score In Liver Disease. [Updated 2020 May 17]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542308/>.
83. 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.
84. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jun;17(6):1471-4.
85. Levy I, Sherman M; Liver Cancer Study Group of the University of Toronto. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda, and Child-Pugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. *Gut*. 2002 Jun;50(6):881-5.
86. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology*. 1998 Sep;28(3):751-5.

87. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer*. 1985 Aug 15;56(4):918-28.
88. Leung TW, Tang AM, Zee B, Lau WY, Lai PB, Leung KL, et al. Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients. *Cancer*. 2002 Mar 15;94(6):1760-9.
89. Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire. *J Hepatol*. 1999 Jul;31(1):133-41.
90. Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C, Satomura S, Teng M, Reeves HL, et al. Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach—the ALBI grade. *J Clin Oncol*. 2015 Feb 20;33(6):550-8.
91. Chan AW, Kumada T, Toyoda H, Tada T, Chong CC, Mo FK, et al. Integration of albumin-bilirubin (ALBI) score into Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) system for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jul;31(7):1300-6.
92. Yau T, Tang VY, Yao TJ, Fan ST, Lo CM, Poon RT. Development of Hong Kong Liver Cancer staging system with treatment stratification for patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2014 Jun;146(7):1691-700.e3.
93. Kitai S, Kudo M, Minami Y, Haji S, Osaki Y, Oka H, et al. Validation of a new prognostic staging system for hepatocellular carcinoma: a comparison of the biomarker-combined Japan Integrated Staging Score, the conventional Japan Integrated Staging Score and the BALAD Score. *Oncology* 2008;75:83–90.
94. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2012 Mar 31;379(9822):1245-55.
95. Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, Massault P, Sauvanet A, Farges O. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg*. 2000 Jul;191(1):38-46.
96. Bismuth H, Majno PE. Hepatobiliary surgery. *J Hepatol*. 2000;32(1 Suppl):208-24.
97. Grazi GL, Cescon M, Ravaioli M, Ercolani G, Gardini A, Del Gaudio M, et al. Liver resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotics and noncirrhotics. Evaluation of clinicopathologic features and comparison of risk factors for long-term survival and tumour recurrence in a single centre. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Jun;17 Suppl 2:119-29.
98. Sapisochin G, Bruix J. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: outcomes and novel surgical approaches. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Apr;14(4):203-217.
99. 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*. 2001 Jun;33(6):1394-403.

100. Kim WR, Biggins SW, Kremers WK, Wiesner RH, Kamath PS, Benson JT, et al. Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list. *N Engl J Med*. 2008 Sep 4;359(10):1018-26.
101. 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*. 2015 May;61(5):1643-50.
102. 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*. 2002 May 18;359(9319):1734-9.
103. Majno P, Lencioni R, Mornex F, Girard N, Poon RT, Cherqui D. Is the treatment of hepatocellular carcinoma on the waiting list necessary? *Liver Transpl*. 2011 Oct;17 Suppl 2:S98-108.
104. Lencioni R, Crocetti L. Local-regional treatment of hepatocellular carcinoma. *Radiology*. 2012 Jan;262(1):43-58.
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. Raoul JL, 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;37(3):212-20.
107. Forner A, Real MI, Varela M, Bruix J. Transarterial chemoembolization for patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2007 Sep;37 Suppl 2:S230-7.
108. Sangro B, Iñarrairaegui M, Bilbao JI. Radioembolization for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012 Feb;56(2):464-73.
109. Hilgard P, Hamami M, Fouly AE, Scherag A, Müller S, Ertle J, et al. Radioembolization with yttrium-90 glass microspheres in hepatocellular carcinoma: European experience on safety and long-term survival. *Hepatology*. 2010 Nov;52(5):1741-9.
110. Bilbao Aguirre I, Lázaro Fernández J, Castells Fuste L, Charco Torras R. Estado actual del hepatocarcinoma y perspectivas futuras. *JANO: Medicina y Humanidades* 2010;1762:49-59.
111. 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.
112. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, Piscaglia F, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2018 Mar 24;391(10126):1163-1173.
113. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng AL, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo BY, et al. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018 Jul 5;379(1):54-63.

114. Au KP, Chok KSH. Multidisciplinary approach for post-liver transplant recurrence of hepatocellular carcinoma: A proposed management algorithm. *World J Gastroenterol*. 2018 Dec 7;24(45):5081-5094.
115. Kim JM. Can hepatocellular carcinoma recurrence be prevented after liver transplantation? *Clin Mol Hepatol*. 2021 Oct;27(4):562-563.
116. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1438-49.
117. Sainz B Jr, Heeschen C. Standing out from the crowd: cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*. 2013 Apr 15;23(4):431-3.
118. Li J, Zhu Y. Recent Advances in Liver Cancer Stem Cells: Non-coding RNAs, Oncogenes and Oncoproteins. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Oct 7;8:548335.
119. Morgan RL, Baack B, Smith BD, Yartel A, Pitasi M, Falck-Ytter Y. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Ann Intern Med*. 2013 Mar 5;158(5 Pt 1):329-37.
120. Yang HI, Yuen MF, Chan HL, Han KH, Chen PJ, Kim DY, et al. Risk estimation for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B (REACH-B): development and validation of a predictive score. *Lancet Oncol*. 2011 Jun;12(6):568-74.
121. Papatheodoridis GV, Lampertico P, Manolakopoulos S, Lok A. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide therapy: a systematic review. *J Hepatol*. 2010 Aug;53(2):348-56.
122. Xing H, Yan C, Cheng L, Wang N, Dai S, Yuan J, et al. Clinical application of protein induced by vitamin K antagonist-II as a biomarker in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2016 Oct 13.
123. HEMKER HC, VELTKAMP JJ, HENSEN A, LOELIGER EA. NATURE OF PROTHROMBIN BIOSYNTHESIS: PREPROTHROMBINAEMIA IN VITAMIN K-DEFICIENCY. *Nature*. 1963 Nov 9;200:589-90.
124. Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Jul;71(7):2730-3.
125. Stenflo J. Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin. II. Structural comparison of normal and dicoumarol-induced bovine prothrombin. *J Biol Chem*. 1972 Dec 25;247(24):8167-75.
126. Stenflo J, Ganrot PO. Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin. I. Identification and purification of a dicoumarol-induced abnormal prothrombin from bovine plasma. *J Biol Chem*. 1972 Dec 25;247(24):8160-6.
127. Fernlund P, Stenflo J, Roepstorff P, Thomsen J. Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin. V. Gamma-carboxyglutamic acids, the vitamin K-dependent structures in prothrombin. *J Biol Chem*. 1975 Aug 10;250(15):6125-33.

128. Morris HR, Dell A. Mass-spectrometric identification and sequence location of the ten residues of the new amino acid (gamma-Carboxyglutamic acid) in the N-terminal region of prothrombin. *Biochem J.* 1976 Mar 1;153(3):663-79.
129. Pozzi N, Chen Z, Gohara DW, Niu W, Heyduk T, Di Cera E. Crystal structure of prothrombin reveals conformational flexibility and mechanism of activation. *J Biol Chem.* 2013 Aug 2;288(31):22734-44.
130. Liebman HA. Isolation and characterization of a hepatoma-associated abnormal (des-gamma-carboxy)prothrombin. *Cancer Res.* 1989 Dec 1;49(23):6493-7.
131. Naraki T, Kohno N, Saito H, Fujimoto Y, Ohhira M, Morita T, et al. Gamma-Carboxyglutamic acid content of hepatocellular carcinoma-associated des-gamma-carboxy prothrombin. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Apr 24;1586(3):287-98.
132. Brown MA, Stenberg LM, Persson U, Stenflo J. Identification and purification of vitamin K-dependent proteins and peptides with monoclonal antibodies specific for gamma - carboxyglutamyl (Gla) residues. *J Biol Chem.* 2000 Jun 30;275(26):19795-802.
133. Ratcliffe JV, Furie B, Furie BC. The importance of specific gamma-carboxyglutamic acid residues in prothrombin. Evaluation by site-specific mutagenesis. *J Biol Chem.* 1993 Nov 15;268(32):24339-45.
134. Soriano-Garcia M, Padmanabhan K, de Vos AM, Tulinsky A. The Ca²⁺ ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1. *Biochemistry.* 1992 Mar 10;31(9):2554-66.
135. Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo KJ, Lee SD, et al. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 1984 May 31;310(22):1427-31.
136. Fujikawa T, Shiraha H, Yamamoto K. Significance of des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. *Acta Med Okayama.* 2009 Dec;63(6):299-304.
137. Gao J, Feng X, Inagaki Y, Song P, Kokudo N, Hasegawa K, et al. Des-γ-carboxy prothrombin and c-Met were concurrently and extensively expressed in hepatocellular carcinoma and associated with tumor recurrence. *Biosci Trends.* 2012 Aug;6(4):153-9.
138. Kudo M, Takamine Y, Nakamura K, Shirane H, Uchida H, Kasakura S, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin (PIVKA-II) and alpha-fetoprotein-producing Ilc-type early gastric cancer. *Am J Gastroenterol.* 1992 Dec;87(12):1859-62.
139. Takahashi Y, Inoue T. Des-gamma carboxy prothrombin (PIVKA-II) and alpha-fetoprotein producing gastric cancer with multiple liver metastases. *Pathol Int.* 2003 Apr;53(4):236-40.
140. Takahashi Y, Endo H, Tange T, Kurabayashi R, Nomura S, Kaminishi M, et al. Des-gamma carboxy prothrombin (PIVKA-II)- and alpha-fetoprotein (AFP)-producing gastric cancer. *J Gastroenterol.* 2005 Apr;40(4):432-3.
141. Kemik AS, Kemik O, Purisa S, Tuzun S. Serum des-gamma-carboxyprothrombin in patients with pancreatic head adenocarcinoma. *Bratisl Lek Listy.* 2011;112(10):552-4.
142. Suttie JW. Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem.* 1985;54:459-77.

143. Tanaka T, Taniguchi T, Sannomiya K, Takenaka H, Tomonari T, Okamoto K, et al. Novel des- γ -carboxy prothrombin in serum for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Aug;28(8):1348-55.
144. Miyakawa T, Kajiwara Y, Shirahata A, Okamoto K, Itoh H, Ohsato K. Vitamin K contents in liver tissue of hepatocellular carcinoma patients. *Jpn J Cancer Res*. 2000 Jan;91(1):68-74.
145. Ishizuka M, Kubota K, Shimoda M, Kita J, Kato M, Park KH, et al. Effect of menatetrenone, a vitamin K2 analog, on recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical resection: a prospective randomized controlled trial. *Anticancer Res*. 2012 Dec;32(12):5415-20.
146. Carr BI, Wang Z, Wang M, Wei G. Differential effects of vitamin K1 on AFP and DCP levels in patients with unresectable HCC and in HCC cell lines. *Dig Dis Sci*. 2011 Jun;56(6):1876-83.
147. Murata K, Suzuki H, Okano H, Oyamada T, Yasuda Y, Sakamoto A. Hypoxia-induced des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2010 Jan;36(1):161-70.
148. Suzuki H, Murata K, Gotoh T, Kusano M, Okano H, Oyamada T, et al. Phenotype-dependent production of des- γ -carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2011 Oct;46(10):1219-29.
149. Ono M, Ohta H, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M. Measurement of immunoreactive prothrombin, des-gamma-carboxy prothrombin, and vitamin K in human liver tissues: overproduction of immunoreactive prothrombin in hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 1990 Sep;85(9):1149-54.
150. Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem*. 2005 Feb 25;280(8):6409-15.
151. Morimoto Y, Nouse K, Wada N, Takeuchi Y, Kinugasa H, Miyahara K, et al. Involvement of platelets in extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2014 Dec;44(14):E353-9.
152. Yue P, Gao ZH, Xue X, et al. Des-gamma-carboxyl prothrombin induces matrix metalloproteinase activity in hepatocellular carcinoma cells by involving the ERK1/2MAPK signalling pathway. *Eur J Cancer*. 2011;47(7):1115-24.
153. Wang SB, Cheng YN, Cui SX, Zhong JL, Ward SG, Sun LR, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin stimulates human vascular endothelial cell growth and migration. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(5):469-77.
154. Matsubara M, Shiraha H, Kataoka J, Iwamuro M, Horiguchi S, Nishina S, et al. Des- γ -carboxyl prothrombin is associated with tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Oct;27(10):1602-8.
155. Xing H, Zheng YJ, Han J, Zhang H, Li ZL, Lau WY, et al. Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II versus alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: A systematic review with meta-analysis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2018 Dec;17(6):487-495.

156. Bertino G, Ardiri AM, Boemi PM, Ierna D, Interlandi D, Caruso L, et al. A study about mechanisms of des-gamma-carboxy prothrombin's production in hepatocellular carcinoma. *Panminerva Med.* 2008 Sep;50(3):221-6.
157. Carr BI, Kanke F, Wise M, Satomura S. Clinical evaluation of lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular carcinoma in the United States. *Dig Dis Sci.* 2007 Mar;52(3):776-82.
158. Zhu R, Yang J, Xu L, Dai W, Wang F, Shen M, et al. Diagnostic Performance of Des- γ -carboxy Prothrombin for Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract.* 2014;2014:529314.
159. Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, Saito K, Uemura Y, Nakatsura T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2015 Oct 7;21(37):10573-83.
160. Hu B, Tian X, Sun J, Meng X. Evaluation of individual and combined applications of serum biomarkers for diagnosis of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Int J Mol Sci.* 2013 Dec 2;14(12):23559-80.
161. Zhang K, Song P, Gao J, Li G, Zhao X, Zhang S. Perspectives on a combined test of multi serum biomarkers in China: towards screening for and diagnosing hepatocellular carcinoma at an earlier stage. *Drug discoveries & therapeutics.* 2014;8(3):102–9.
162. Meguro M, Mizuguchi T, Nishidate T, Okita K, Ishii M, Ota S, et al. Prognostic roles of preoperative α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol.* 2015 Apr 28;21(16):4933-45.
163. Song P, Feng X, Inagaki Y, Song T, Zhang K, Wang Z, et al. Clinical utility of simultaneous measurement of alpha-fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma in China: A multi-center case-controlled study of 1,153 subjects. *Biosci Trends.* 2014 Oct;8(5):266-73.
164. Ertle JM, Heider D, Wichert M, Keller B, Kueper R, Hilgard P, et al. A combination of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma. *Digestion.* 2013;87(2):121-31.
165. Adeniji N, Dhanasekaran R. Current and Emerging Tools for Hepatocellular Carcinoma Surveillance. *Hepatol Commun.* 2021 Dec;5(12):1972-1986.
166. Ji J, Wang H, Li Y, Zheng L, Yin Y, et al. Diagnostic Evaluation of Des-Gamma-Carboxy Prothrombin versus α -Fetoprotein for Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in China: A Large-Scale, Multicentre Study. *PLoS One.* 2016 Apr 12;11(4):e0153227.
167. Park H, Park JY. Clinical significance of AFP and PIVKA-II responses for monitoring treatment outcomes and predicting prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int.* 2013;2013:310427.
168. Shimada M, Yonemura Y, Ijichi H, Harada N, Shiotani S, Ninomiya M, et al. Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a special reference to a preoperative des-gamma-carboxy prothrombin value. *Transplant Proc.* 2005 Mar;37(2):1177-9.

169. Nakao A, Virji A, Iwaki Y, Carr B, Iwatsuki S, Starzl E. Abnormal prothrombin (DES-gamma-carboxy prothrombin) in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 1991 Oct;38(5):450-3.
170. Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006 Feb 28;12(8):1175-81.
171. Malaguarnera G, Giordano M, Paladina I, Berretta M, Cappellani A, Malaguarnera M. Serum markers of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2010 Oct;55(10):2744-55.
172. Park H, Kim SU, Park JY, Kim DY, Ahn SH, Chon CY, et al. Clinical usefulness of double biomarkers AFP and PIVKA-II for subdividing prognostic groups in locally advanced hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2014 Feb;34(2):313-21.
173. Shirabe K, Itoh S, Yoshizumi T, Soejima Y, Taketomi A, Aishima S, et al. The predictors of microvascular invasion in candidates for liver transplantation with hepatocellular carcinoma-with special reference to the serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin. *J Surg Oncol*. 2007 Mar 1;95(3):235-40.
174. Taketomi A, Sanefuji K, Soejima Y, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, et al. Impact of des-gamma-carboxy prothrombin and tumor size on the recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2009 Feb 27;87(4):531-7.
175. Citores MJ, Lucena JL, de la Fuente S, Cuervas-Mons V. Serum biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *World J Hepatol*. 2019 Jan 27;11(1):50-64.
176. Chaiteerakij R, Zhang X, Addissie BD, Mohamed EA, Harmsen WS, Theobald PJ, et al. Combinations of biomarkers and Milan criteria for predicting hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2015 May;21(5):599-606.
177. Iguchi T, Shirabe K, Aishima S, Wang H, Fujita N, Ninomiya M, et al. New Pathologic Stratification of Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma: Predicting Prognosis After Living-donor Liver Transplantation. *Transplantation*. 2015 Jun;99(6):1236-42.
178. Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, et al. Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. *J Gastroenterol*. 2011 Apr;46(4):536-44.
179. Yang M, Zhang X, Liu J. Prognostic value of des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2019 Nov 15;14(11):e0225170.
180. Cerban R, Ester C, Iacob S, Paslaru L, Dumitru R, Grasu M, et al. Evaluation of Tumor Response Using Alpha-fetoprotein and Des-gamma-carboxy Prothrombin in Hepatocellular Carcinoma Patients Who Underwent Transarterial Chemoembolization. *Chirurgia (Bucur)*. 2018 Jul-Aug;113(4):524-533.
181. Iwadou S, Nouse K, Kuwaki K, Kobayashi Y, Nakamura S, Tanaka H, et al. Time-dependent analysis of predisposing factors for the recurrence of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2010 Aug;30(7):1027-32.

182. Song PP, Xia JF, Inagaki Y, Hasegawa K, Sakamoto Y, Kokudo N, et al. Controversies regarding and perspectives on clinical utility of biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 7;22(1):262-74.
183. Nanashima A, Taura N, Abo T, Ichikawa T, Sakamoto I, Nagayasu T, et al. Tumor marker levels before and after curative treatment of hepatocellular carcinoma as predictors of patient survival. *Dig Dis Sci*. 2011 Oct;56(10):3086-100.
184. Lee YK, Kim SU, Kim DY, Ahn SH, Lee KH, Lee DY, et al. Prognostic value of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin responses in patients with hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemoembolization. *BMC Cancer*. 2013 Jan 3;13:5.
185. Pan YX, Sun XQ, Hu ZL, Xie W, Nie KX, Fang AP, et al. Prognostic Values of Alpha-Fetoprotein and Des-Gamma-Carboxyprothrombin in Hepatocellular Carcinoma in China: An Analysis of 4792 Patients. *J Hepatocell Carcinoma*. 2021 Jun 25;8:657-670.
186. Wang BL, Tan QW, Gao XH, Wu J and Guo W: Elevated PIVKA-II is associated with early recurrence and poor prognosis in BCLC 0-A hepatocellular carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 6673-6678, 2014.
187. Saito M, Seo Y, Yano Y, Miki A, Yoshida M, Azuma T. A high value of serum des- γ -carboxy prothrombin before hepatocellular carcinoma treatment can be associated with long-term liver dysfunction after treatment. *J Gastroenterol*. 2012 Oct;47(10):1134-42.
188. Kim SH, Moon DB, Kim WJ, Kang WH, Kwon JH, Jwa EK, et al. Preoperative prognostic values of α -fetoprotein (AFP) and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) in patients with hepatocellular carcinoma for living donor liver transplantation. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2016 Dec;5(6):461-469.
189. Uchiyama H, Itoh S, Yoshizumi T, Ikegami T, Harimoto N, Soejima Y, et al. Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: results of prospective patient selection by Kyushu University Criteria in 7 years. *HPB (Oxford)*. 2017 Dec;19(12):1082-1090.
190. Lai Q, Iesari S, Levi Sandri GB, Lerut J. Des-gamma-carboxy prothrombin in hepatocellular cancer patients waiting for liver transplant: a systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers*. 2017 Oct 31;32(4):e370-e374.
191. Lee HW, Song GW, Lee SG, Kim JM, Joh JW, Han DH, et al. Patient Selection by Tumor Markers in Liver Transplantation for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Liver Transpl*. 2018 Sep;24(9):1243-1251.
192. Shakiba E, Ramezani M, Sadeghi M. Evaluation of serum interleukin-6 levels in hepatocellular carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Hepatol*. 2018 Sep;4(3):182-190.
193. Metwaly HA, Al-Gayyar MM, Eletreby S, Ebrahim MA, El-Shishtawy MM. Relevance of serum levels of interleukin-6 and syndecan-1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Sci Pharm*. 2012 Jan-Mar;80(1):179-88.
194. Sun F, Wang J, Sun Q, Li F, Gao H, Xu L, et al. Interleukin-8 promotes integrin β 3 upregulation and cell invasion through PI3K/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Nov 4;38(1):449.

195. Loosen SH, Schulze-Hagen M, Leyh C, Benz F, Vucur M, Kuhl C, et al. IL-6 and IL-8 Serum Levels Predict Tumor Response and Overall Survival after TACE for Primary and Secondary Hepatic Malignancies. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 14;19(6):1766.
196. Sheng T, Wang B, Wang SY, Deng B, Qu L, Qi XS, et al. The Relationship Between Serum Interleukin-6 and the Recurrence of Hepatitis B Virus Related Hepatocellular Carcinoma after Curative Resection. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Jun;94(24):e941.
197. Jang JW, Oh BS, Kwon JH, You CR, Chung KW, Kay CS, et al. Jung HS. Serum interleukin-6 and C-reactive protein as a prognostic indicator in hepatocellular carcinoma. *Cytokine*. 2012 Dec;60(3):686-93.
198. Soresi M, Giannitrapani L, D'Antona F, Florena AM, La Spada E, Terranova A, et al. Interleukin-6 and its soluble receptor in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006 Apr 28;12(16):2563-8.
199. Wu Y, Fan W, Xue M, Zhong B, Zhang S, Wang Y, et al. Postintervention Interleukin-6 (IL-6) Level, Rather than the Pretreatment or Dynamic Changes of IL-6, as an Early Practical Marker of Tumor Response in Hepatocellular Carcinoma Treated with Transarterial Chemoembolization. *Oncologist*. 2019 Dec;24(12):e1489-e1495.
200. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 Feb 1;10(2):a028415.
201. Othman MS, Aref AM, Mohamed AA, Ibrahim WA. Serum Levels of Interleukin-6 and Interleukin-10 as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients. *ISRN Hepatol*. 2013 Sep 15;2013:412317.
202. Zhang M, Zhang S, Yang Z, Hu J, Hu W, Sun P, et al. Association between the expression levels of IL-6 and IL-6R in the hepatocellular carcinoma microenvironment and postoperative recurrence. *Oncol Lett*. 2018 Dec;16(6):7158-7165.
203. Yang X, Liang L, Zhang XF, Jia HL, Qin Y, Zhu XC, et al. MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway. *Hepatology*. 2013 Jul;58(1):158-70.
204. Ren Y, Poon RT, Tsui HT, Chen WH, Li Z, Lau C, et al. Interleukin-8 serum levels in patients with hepatocellular carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2003 Dec 1;9(16 Pt 1):5996-6001.
205. Zhu B, Lin N, Zhang M, Zhu Y, Cheng H, Chen S, et al. Activated hepatic stellate cells promote angiogenesis via interleukin-8 in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*. 2015 Nov 22;13:365.
206. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov 1;14(21):6735-41.
207. Bi H, Zhang Y, Wang S, Fang W, He W, Yin L, et al. Interleukin-8 promotes cell migration via CXCR1 and CXCR2 in liver cancer. *Oncol Lett*. 2019 Oct;18(4):4176-4184.
208. Li XP, Yang XY, Biskup E, Zhou J, Li HL, Wu YF, et al. Co-expression of CXCL8 and HIF-1 α is associated with metastasis and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Sep 8;6(26):22880-9.

209. Wang Y, Wang W, Wang L, Wang X, Xia J. Regulatory mechanisms of interleukin-8 production induced by tumour necrosis factor- α in human hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Mol Med*. 2012 Mar;16(3):496-506.
210. Kubo F, Ueno S, Hiwatashi K, Sakoda M, Kawaida K, Nuruki K, et al. Interleukin 8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis. *Ann Surg Oncol*. 2005 Oct;12(10):800-7.
211. Akiba J, Yano H, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M. Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2001 Feb;18(2):257-64.
212. Sun T, Tang Y, Sun D, Bu Q, Li P. Osteopontin versus alpha-fetoprotein as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2018 Dec 10;11:8925-8935.
213. Duarte-Salles T, Misra S, Stepien M, Plymoth A, Muller D, Overvad K, et al. Circulating Osteopontin and Prediction of Hepatocellular Carcinoma Development in a Large European Population. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016 Sep;9(9):758-65.
214. Sun T, Li P, Sun D, Bu Q, Li G. Prognostic value of osteopontin in patients with hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Oct;97(43):e12954.
215. Shang S, Plymoth A, Ge S, Feng Z, Rosen HR, Sangrajang S, et al. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012 Feb;55(2):483-90.
216. Wang H, Guo D, Li J, Wei B, Zheng H. Increased expression of osteopontin indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018 Dec 1;11(12):5916-5922.
217. Tunissiolli NM, Castanhole-Nunes MMU, Biselli-Chicote PM, Pavarino EC, da Silva RF, da Silva RC, et al. Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Apr 1;18(4):863-872.
218. Cheng J, Wang W, Sun C, Li M, Wang B, Lv Y. Meta-analysis of the prognostic and diagnostic significance of serum/plasma osteopontin in hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol*. 2014 Oct;48(9):806-14.
219. Zhou F, Shang W, Yu X, Tian J. Glypican-3: A promising biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment. *Med Res Rev*. 2018 Mar;38(2):741-767.
220. Pan Y, Chen H, Yu J. Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Current Status and Future Perspectives. *Biomedicines*. 2020 Dec 7;8(12):576.
221. Xu D, Su C, Sun L, Gao Y, Li Y. Performance of Serum Glypican 3 in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A meta-analysis. *Ann Hepatol*. 2019 Jan-Feb;18(1):58-67.
222. Liu H, Yang C, Lu W, Zeng Y. Prognostic significance of glypican-3 expression in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Jan;97(4):e9702.
223. Xiao WK, Qi CY, Chen D, Li SQ, Fu SJ, Peng BG, et al. Prognostic significance of glypican-3 in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2014 Feb 18;14:104.

224. Lai YL, Gong CL, Fu CK, Yueh TC, Tsai CW, Chang WS, et al. The Contribution of Matrix Metalloproteinase-1 Genotypes to Hepatocellular Carcinoma Susceptibility in Taiwan. *Cancer Genomics Proteomics*. 2017 Mar-Apr;14(2):119-125.
225. Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC, et al. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019 Nov 26;2019:9423907.
226. Altadill A, Rodríguez M, González LO, Junquera S, Corte MD, González-Dieguez ML, et al. Liver expression of matrix metalloproteases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2009 Oct;41(10):740-8.
227. Sánchez-Lorencio MI, Saenz L, Ramirez P, Villalba-López F, de la Orden V, Mediero-Valeros B, et al. Matrix Metalloproteinase 1 as a Novel Biomarker for Monitoring Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Patients. *Transplant Proc*. 2018 Mar;50(2):623-627.
228. Chen YK, Tung CW, Lee JY, Hung YC, Lee CH, Chou SH, et al. Plasma matrix metalloproteinase 1 improves the detection and survival prediction of esophageal squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2016 Jul 20;6:30057.
229. Liao M, Tong P, Zhao J, Zhang Y, Li Z, Wang J, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinase-1/ proteinase-activated receptor-1 signaling axis in hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2012 Apr;18(2):397-403.
230. Xue D, Zheng Y, Wen J, Han J, Tuo H, Liu Y, et al. Role of chemokines in hepatocellular carcinoma (Review). *Oncol Rep*. 2021 Mar;45(3):809-823.
231. Duda DG, Dima SO, Cucu D, Sorop A, Klein S, Ancukiewicz M, et al. Potential Circulating Biomarkers of Recurrence after Hepatic Resection or Liver Transplantation in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Cancers (Basel)*. 2020 May 18;12(5):1275.
232. Piñero F, Dirchwolf M, Pessôa MG. Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Assessment. *Cells*. 2020 Jun 1;9(6):1370.
233. Piñero F, Rubinstein F, Marciano S, Fernández N, Silva J, Zambelo Y, et al. Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: Does the Place Where Ultrasound Is Performed Impact Its Effectiveness? *Dig Dis Sci*. 2019 Mar;64(3):718-728.
234. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018 Jan;67(1):358-380.
235. Lau T, Ahmad J. Clinical applications of the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) in hepatic medicine. *Hepat Med*. 2013 Feb 11;5:1-10.
236. Shimamura T, Goto R, Watanabe M, Kawamura N, Takada Y. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: How Should We Improve the Thresholds? *Cancers (Basel)*. 2022 Jan 14;14(2):419.
237. Shindoh J, Sugawara Y, Nagata R, Kaneko J, Tamura S, Aoki T, et al. Evaluation methods for pretransplant oncologic markers and their prognostic impacts in patient undergoing living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Transpl Int*. 2014 Apr;27(4):391-8.

238. Reig M, Forner A, Ávila MA, Ayuso C, Mínguez B, Varela M, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update of the consensus document of the AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI, and SETH. *Med Clin (Barc)*. 2021 May 7;156(9):463.e1-463.e30.
239. Bhatti ABHH, Naz K, Abbas G, Khan NY, Zia HH, Ahmed IN. Clinical Utility of Protein Induced by Vitamin K Absence-II in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021 Jun 1;22(6):1731-1736.
240. Sharma B, Srinivasan R, Chawla YK, Kapil S, Saini N, Singla B, et al. Clinical utility of prothrombin induced by vitamin K absence in the detection of hepatocellular carcinoma in Indian population. *Hepatol Int*. 2010 Jul 13;4(3):569-76.
241. Salem M, Atti SA, Raziky ME, Darweesh SK, Sharkawy ME. Clinical Significance of Plasma Osteopontin Level as a Biomarker of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology Res*. 2013 Oct;6(5):191-199.
242. Lehman EM, Soliman AS, Ismail K, Hablas A, Seifeldin IA, Ramadan M, et al. Patterns of hepatocellular carcinoma incidence in Egypt from a population-based cancer registry. *Hepatol Res*. 2008 May;38(5):465-73.
243. McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis*. 2015 May;19(2):223-38.
244. Takada Y, Uemoto S. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: the Kyoto experience. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010 Sep;17(5):527-32.
245. Shirabe K, Aishima S, Taketomi A, Soejima Y, Uchiyama H, Kayashima H, et al. Prognostic importance of the gross classification of hepatocellular carcinoma in living donor-related liver transplantation. *Br J Surg*. 2011 Feb;98(2):261-7.
246. Caines A, Selim R, Salgia R. The Changing Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Clin Liver Dis*. 2020 Nov;24(4):535-547.
247. Mazzaferro V, Citterio D, Bhoori S, Bongini M, Miceli R, De Carlis L, et al. Liver transplantation in hepatocellular carcinoma after tumour downstaging (XXL): a randomised, controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Jul;21(7):947-956.
248. Hameed B, Mehta N, Sapisochin G, Roberts JP, Yao FY. Alpha-fetoprotein level > 1000 ng/mL as an exclusion criterion for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma meeting the Milan criteria. *Liver Transpl*. 2014 Aug;20(8):945-51.
249. Payancé A, Dioguardi Burgio M, Peoc'h K, Achahboun M, Albuquerque M, Devictor J, et al. Biological response under treatment and prognostic value of protein induced by vitamin K absence or antagonist-II in a French cohort of patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Oct;32(10):1364-1372.
250. Vasconcellos M, Zamith LM. Impact of the MELD score on the survival of hepatocellular carcinoma transplantation patients in Brazil: a systematic review. *Rev Col Bras Cir*. 2020 Jan 31;46(6):e20192392.
251. Giard JM, Mehta N, Dodge JL, Roberts JP, Yao FY. Alpha-Fetoprotein Slope >7.5 ng/mL per Month Predicts Microvascular Invasion and Tumor Recurrence After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Transplantation*. 2018 May;102(5):816-822.

252. Abd El Gawad IA, Mossallam GI, Radwan NH, Elzawahry HM, Elhifnawy NM. Comparing prothrombin induced by vitamin K absence-II (PIVKA-II) with the oncofetal proteins glypican-3, Alpha feto protein and carcinoembryonic antigen in diagnosing hepatocellular carcinoma among Egyptian patients. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2014 Jun;26(2):79-85.
253. Park MS, Lee KW, Kim H, Choi YR, Hong G, Yi NJ, et al. Usefulness of PIVKA-II After Living-donor Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Transplant Proc.* 2017 Jun;49(5):1109-1113.
254. Notarpaolo A, Layese R, Magistri P, Gambato M, Colledan M, Magini G, et al. Validation of the AFP model as a predictor of HCC recurrence in patients with viral hepatitis-related cirrhosis who had received a liver transplant for HCC. *J Hepatol.* 2017 Mar;66(3):552-559.
255. Ling YH, Chen JW, Wen SH, Huang CY, Li P, Lu LH, et al. Tumor necrosis as a poor prognostic predictor on postoperative survival of patients with solitary small hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2020 Jun 29;20(1):607.
256. Choi HJ, Kim DG, Na GH, Han JH, Hong TH, You YK. Clinical outcome in patients with hepatocellular carcinoma after living-donor liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2013 Aug 7;19(29):4737-44.
257. Liang L, Wang MD, Zhang YM, Zhang WG, Zhang CW, Lau WY, et al. Association of Postoperative Biomarker Response with Recurrence and Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma and High Alpha-Fetoprotein Expressions (>400 ng/ml). *J Hepatocell Carcinoma.* 2021 Mar 12;8:103-118.
258. Viggiani V, Palombi S, Gennarini G, D'Ettoire G, De Vito C, Angeloni A, et al. Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) specifically increased in Italian hepatocellular carcinoma patients. *Scand J Gastroenterol.* 2016 Oct;51(10):1257-62.
259. Singh G, Yoshida EM, Rathi S, Marquez V, Kim P, Erb SR, et al. Biomarkers for hepatocellular cancer. *World J Hepatol.* 2020 Sep 27;12(9):558-573.
260. Feng H, Li B, Li Z, Wei Q, Ren L. PIVKA-II serves as a potential biomarker that complements AFP for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2021 Apr 13;21(1):401.
261. Durazo FA, Blatt LM, Corey WG, Lin JH, Han S, Saab S, et al. Des-gamma-carboxyprothrombin, alpha-fetoprotein and AFP-L3 in patients with chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Oct;23(10):1541-8.
262. Wang Q, Chen Q, Zhang X, Lu XL, Du Q, Zhu T, et al. Diagnostic value of gamma-glutamyltransferase/aspartate aminotransferase ratio, protein induced by vitamin K absence or antagonist II, and alpha-fetoprotein in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2019 Sep 28;25(36):5515-5529.
263. Si YQ, Wang XQ, Fan G, Wang CY, Zheng YW, Song X, et al. Value of AFP and PIVKA-II in diagnosis of HBV-related hepatocellular carcinoma and prediction of vascular invasion and tumor differentiation. *Infect Agent Cancer.* 2020 Nov 23;15(1):70.
264. Mishra G, Dev A, Paul E, Cheung W, Koukounaras J, Jhamb A, et al. Prognostic role of alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma treated with repeat transarterial chemoembolisation. *BMC Cancer.* 2020 May 29;20(1):483.

265. Li HL, Ji WB, Zhao R, Duan WD, Chen YW, Wang XQ, et al. Poor prognosis for hepatocellular carcinoma with transarterial chemoembolization pre-transplantation: retrospective analysis. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 28;21(12):3599-606.
266. Li Z, Hu DY, Chu Q, Wu JH, Gao C, Zhang YQ, et al. Cell apoptosis and regeneration of hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization. *World J Gastroenterol*. 2004 Jul 1;10(13):1876-80.
267. Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, Kume Y, Ikeda H, Norman GL, et al. AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC. *J Gastroenterol* 2010;45:1272–1282.
268. Poté N, Cauchy F, Albuquerque M, Voitot H, Belghiti J, Castera L, et al. Performance of PIVKA-II for early hepatocellular carcinoma diagnosis and prediction of microvascular invasion. *J Hepatol*. 2015 Apr;62(4):848-54.
269. Łapiński TW, Tarasik A, Januszkiewicz M, Flisiak R. Clinical aspects and treatment of hepatocellular carcinoma in north-eastern Poland. *Clin Exp Hepatol*. 2021 Mar;7(1):79-84.
270. Liu C, Xiao GQ, Yan LN, Li B, Jiang L, Wen TF, et al. Wang WT, Xu MQ, Yang JY. Value of α -fetoprotein in association with clinicopathological features of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2013 Mar 21;19(11):1811-9.
271. Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology*. 2003 May;37(5):1114-21.
272. Nakamura S, Nouse K, Sakaguchi K, Ito YM, Ohashi Y, Kobayashi Y, et al. Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size. *Am J Gastroenterol*. 2006 Sep;101(9):2038-43.
273. Wang ZX, Jiang CP, Cao Y, Zhang G, Chen WB, Ding YT. Preoperative serum liver enzyme markers for predicting early recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2015 Apr;14(2):178-85.
274. Iluz-Freundlich D, Zhang M, Uhanova J, Minuk GY. The relative expression of hepatocellular and cholestatic liver enzymes in adult patients with liver disease. *Ann Hepatol*. 2020 Mar-Apr;19(2):204-208.
275. Sun P, Chen S, Li Y. The association between pretreatment serum alkaline phosphatase and prognosis in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Mar;99(11):e19438.
276. Svobodova S, Karlikova M, Topolcan O, Pecen L, Pestova M, Kott O, et al. PIVKA-II as a Potential New Biomarker for Hepatocellular Carcinoma - A Pilot Study. *In Vivo*. 2018 Nov-Dec;32(6):1551-1554.
277. Choi JY, Jung SW, Kim HY, Kim M, Kim Y, Kim DG, et al. Diagnostic value of AFP-L3 and PIVKA-II in hepatocellular carcinoma according to total-AFP. *World J Gastroenterol*. 2013 Jan 21;19(3):339-46.

278. Gentile I, Buonomo AR, Scotto R, Zappulo E, Carriero C, Piccirillo M, et al. Diagnostic Accuracy of PIVKA-II, Alpha-Fetoprotein and a Combination of both in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma in Patients Affected by Chronic HCV Infection. *In Vivo*. 2017 Jul-Aug;31(4):695-700.
279. Loglio A, Iavarone M, Facchetti F, Di Paolo D, Perbellini R, Lunghi G, et al. The combination of PIVKA-II and AFP improves the detection accuracy for HCC in HBV caucasian cirrhotics on long-term oral therapy. *Liver Int*. 2020 Aug;40(8):1987-1996.
280. Suh SW, Choi YS. Predictors of Micrometastases in Patients with Barcelona Clinic Liver Cancer Classification B Hepatocellular Carcinoma. *Yonsei Med J*. 2017 Jul;58(4):737-742.
281. Cabiati M, Gaggini M, Cesare MM, Caselli C, De Simone P, Filipponi F, et al. Osteopontin in hepatocellular carcinoma: A possible biomarker for diagnosis and follow-up. *Cytokine*. 2017 Nov;99:59-65.
282. Kaleta B. Osteopontin and Transplantation: Where Are We Now? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2021 May 21;69(1):15.
283. Kim MJ, Jang JW, Oh BS, Kwon JH, Chung KW, Jung HS, et al. Change in inflammatory cytokine profiles after transarterial chemotherapy in patients with hepatocellular carcinoma. *Cytokine*. 2013 Nov;64(2):516-22.
284. El-Folly RF, El-Kabarity RH, Arafa NA. Assessment of the role of interleukin-6 in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Egypt J Immunol*. 2010;17(2):11-22.
285. Prieto J. Inflammation, HCC and sex: IL-6 in the centre of the triangle. *J Hepatol*. 2008 Feb;48(2):380-1.
286. Cho HJ, Kim SS, Ahn SJ, Park SY, Park JH, Kim JK, et al. Low serum interleukin-6 levels as a predictive marker of recurrence in patients with hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma who underwent curative treatment. *Cytokine*. 2015 Jun;73(2):245-52.
287. Shakiba E, Sadeghi M, Shakiba M. A systematic review and meta-analysis of evaluation of serum interleukin 8 levels in hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Hepatol*. 2019 May;5(2):123-128.
288. Yu J, Ren X, Chen Y, Liu P, Wei X, Li H, et al. Dysfunctional activation of neurotensin/IL-8 pathway in hepatocellular carcinoma is associated with increased inflammatory response in microenvironment, more epithelial mesenchymal transition in cancer and worse prognosis in patients. *PLoS One*. 2013;8(2):e56069.
289. El-Tayeh SF, Hussein TD, El-Houseini ME, Amer MA, El-Sherbini M, Elshemey WM. Serological biomarkers of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Dis Markers*. 2012;32(4):255-63.
290. Zhou C, Zhou HJ, Zhang XF, Lou LL, Ye QH, Zheng Y, et al. Postoperative serum osteopontin level is a novel monitor for treatment response and tumor recurrence after resection of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2013 Mar;20(3):929-37.
291. Malov SI, Malov IV, Kuvshinov AG, Marche PN, Decaens T, Macek-Jilkova Z, et al. Search for Effective Serum Tumor Markers for Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma Associated with Hepatitis C. *Sovrem Tekhnologii Med*. 2021;13(1):27-33.

292. Moudi B, Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H. Meta-analysis and systematic review of prognostic significance of Glypican-3 in patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Virusdisease*. 2019 Jun;30(2):193-200.
293. Ozkan H, Erdal H, Koçak E, Tutkak H, Karaeren Z, Yakut M, et al. Diagnostic and prognostic role of serum glypican 3 in patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Lab Anal*. 2011;25(5):350-3.
294. Jeon Y, Jang ES, Choi YS, Kim JW, Jeong SH. Glypican-3 level assessed by the enzyme-linked immunosorbent assay is inferior to alpha-fetoprotein level for hepatocellular carcinoma diagnosis. *Clin Mol Hepatol*. 2016 Sep;22(3):359-365.
295. Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, et al. Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2004 Apr 1;64(7):2418-23.
296. Zittermann SI, Capurro MI, Shi W, Filmus J. Soluble glypican 3 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2010 Mar 15;126(6):1291-301.
297. Li J, Qiyu S, Wang T, Jin B, Li N. Improving the Detection of Hepatocellular Carcinoma Using Serum AFP Expression in Combination with GPC3 and Micro-RNA MiR-122 Expression. *Open Life Sci*. 2019 Mar 20;14:53-61.
298. Tahara K, Mimori K, Iinuma H, Iwatsuki M, Yokobori T, Ishii H, et al. Serum matrix-metalloproteinase-1 is a bona fide prognostic marker for colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010 Dec;17(12):3362-9.
299. Trivedi V, Boire A, Tchernychev B, Kaneider NC, Leger AJ, O'Callaghan K, et al. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell*. 2009 Apr 17;137(2):332-43.
300. He C, Peng W, Liu X, Li C, Li X, Wen TF. Post-treatment alpha-fetoprotein response predicts prognosis of patients with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Aug;98(31):e16557.
301. 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.
302. Fernandez-Sevilla E, Allard MA, Selten J, Golse N, Vibert E, Sa Cunha A, et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: Is there a place for resection? *Liver Transpl*. 2017 Apr;23(4):440-447.
303. Goydos JS, Brumfield AM, Frezza E, Booth A, Lotze MT, Carty SE. Marked elevation of serum interleukin-6 in patients with cholangiocarcinoma: validation of utility as a clinical marker. *Ann Surg*. 1998 Mar;227(3):398-404.
304. Shahzad A, Knapp M, Lang I, Köhler G. Interleukin 8 (IL-8) - a universal biomarker? *Int Arch Med*. 2010 Jun 15;3:11.

305. Zhang H, Ye QH, Ren N, Zhao L, Wang YF, Wu X, et al. The prognostic significance of preoperative plasma levels of osteopontin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006 Nov;132(11):709-17.
306. Huang H, Zhang XF, Zhou HJ, Xue YH, Dong QZ, Ye QH, et al. Expression and prognostic significance of osteopontin and caspase-3 in hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *Cancer Sci*. 2010 May;101(5):1314-9.
307. Cui BK, Zhang CQ, Zhang Y, Yuan YF, Zhang YQ, Shi M, et al. [Osteopontin as a potential biomarker of metastasis and recurrence for hepatocellular carcinoma]. *Ai Zheng*. 2006 Jul;25(7):876-9. Chinese.
308. Burdo TH, Ellis RJ, Fox HS. Osteopontin is increased in HIV-associated dementia. *J Infect Dis*. 2008 Sep 1;198(5):715-22.
309. Rullo OJ, Woo JM, Parsa MF, Hoftman AD, Maranian P, Elashoff DA, et al. Plasma levels of osteopontin identify patients at risk for organ damage in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2013 Jan 23;15(1):R18.
310. Wang D, Tong X, Wang L, Zhang S, Huang J, Zhang L, et al. The association between osteopontin and tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020 Dec 2;15(12):e0242702.
311. Chai YL, Chong JR, Raquib AR, Xu X, Hilal S, Venketasubramanian N, et al. Plasma osteopontin as a biomarker of Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment. *Sci Rep*. 2021 Feb 17;11(1):4010.
312. Bramwell VH, Doig GS, Tuck AB, Wilson SM, Tonkin KS, Tomiak A, et al. Serial plasma osteopontin levels have prognostic value in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3337-43.
313. Han SS, Lee SJ, Kim WJ, Ryu DR, Won JY, Park S, et al. Plasma osteopontin is a useful diagnostic biomarker for advanced non-small cell lung cancer. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2013 Sep;75(3):104-10.
314. Maleš J, Mihalj H, Šestak A, Kralik K, Smolić M. Osteopontin Levels in Patients with Squamous Metastatic Head and Neck Cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Feb 21;57(2):185.
315. Wang Y, Shen Z, Zhu Z, Han R, Huai M. Clinical values of AFP, GPC3 mRNA in peripheral blood for prediction of hepatocellular carcinoma recurrence following OLT: AFP, GPC3 mRNA for prediction of HCC. *Hepat Mon*. 2011 Mar;11(3):195-9.
316. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, et al. A novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2003 Jul;125(1):89-97.
317. Yasuda E, Kumada T, Toyoda H, Kaneoka Y, Maeda A, Okuda S, et al. Evaluation for clinical utility of GPC3, measured by a commercially available ELISA kit with Glypican-3 (GPC3) antibody, as a serological and histological marker for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2010 May;40(5):477-85.
318. Chen C, Huang X, Ying Z, Wu D, Yu Y, Wang X, et al. Can glypican-3 be a disease-specific biomarker? *Clin Transl Med*. 2017 Dec;6(1):18.

319. Zeng GQ, Chen AB, Li W, Song JH, Gao CY. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Genet Mol Res*. 2015 Nov 23;14(4):14811-22.
320. El-Chaer WK, Tonet-Furioso AC, Morais Junior GS, Souza VC, Avelar GG, Henriques AD, et al. Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-1 in Brazilian Patients with Benign Prostatic Hyperplasia or Prostate Cancer. *Curr Gerontol Geriatr Res*. 2020 May 5;2020:6012102.
321. Sánchez Elvira G, Coma-Canella I, Artaiz M, Páramo JA, Barba J, Calabuig J. Los pacientes con placas coronarias vulnerables presentan mayores niveles séricos de metaloproteinasa-1 [Patients with vulnerable coronary plaques have higher serum metalloproteinase-1 levels]. *An Sist Sanit Navar*. 2017 Apr 30;40(1):35-42.
322. Wang YL, Zhu ZJ, Teng DH, Yao Z, Gao W, Shen ZY. Glypican-3 expression and its relationship with recurrence of HCC after liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2012 May 21;18(19):2408-14.
323. Asaoka Y, Tateishi R, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Minami T, et al. Frequency of and predictive factors for vascular invasion after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2014 Nov 14;9(11):e111662.
324. Ono A, Fujimoto A, Yamamoto Y, Akamatsu S, Hiraga N, Imamura M, et al. Circulating Tumor DNA Analysis for Liver Cancers and Its Usefulness as a Liquid Biopsy. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jun 17;1(5):516-534.
325. Canale M, Ulivi P, Foschi FG, Scarpi E, De Matteis S, Donati G, et al. Clinical and circulating biomarkers of survival and recurrence after radiofrequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 Sep;129:44-53.
326. Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, Hasegawa K, Beck Y, Sugawara Y, et al. Significance of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *Ann Surg Oncol*. 2009 Oct;16(10):2795-804.
327. Fujiki M, Takada Y, Ogura Y, Oike F, Kaido T, Teramukai S, et al. Significance of des-gamma-carboxy prothrombin in selection criteria for living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Am J Transplant*. 2009 Oct;9(10):2362-71.
328. Fujikawa T, Shiraha H, Ueda N, Takaoka N, Nakanishi Y, Matsuo N, et al. Des-gamma-carboxyl prothrombin-promoted vascular endothelial cell proliferation and migration. *J Biol Chem*. 2007 Mar 23;282(12):8741-8.
329. Chon YE, Choi GH, Lee MH, Kim SU, Kim DY, Ahn SH, et al. Combined measurement of preoperative α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin predicts recurrence after curative resection in patients with hepatitis-B-related hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2012 Nov 15;131(10):2332-41.
330. Gunsar F. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma Beyond the Milan Criteria. *Exp Clin Transplant*. 2017 Mar;15(Suppl 2):59-64.
331. Cucchetti A, Piscaglia F, Caturelli E, Benvegnù L, Vivarelli M, Ercolani G, et al. Comparison of recurrence of hepatocellular carcinoma after resection in patients with cirrhosis to its occurrence in a surveilled cirrhotic population. *Ann Surg Oncol*. 2009 Feb;16(2):413-22.

332. Song Z, Chen W, Athavale D, Ge X, Desert R, Das S, et al. Osteopontin Takes Center Stage in Chronic Liver Disease. *Hepatology*. 2021 Apr;73(4):1594-1608.
333. Kim SS, Cho HJ, Won JH, Bae JI, Kang DR, Lee JD, et al. Interleukin-8 level as a prognostic marker in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemoembolization. *Cytokine*. 2015 Dec;76(2):449-457.
334. Li J, Gao JZ, Du JL, Wei LX. Prognostic and clinicopathological significance of glypican-3 overexpression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2014 May 28;20(20):6336-44.
335. Cescon M, Bertuzzo VR, Ercolani G, Ravaioli M, Odaldi F, Pinna AD. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: role of inflammatory and immunological state on recurrence and prognosis. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec 28;19(48):9174-82.
336. Nishikawa H, Arimoto A, Wakasa T, Kita R, Kimura T, Osaki Y. Pre-treatment C-reactive protein as a prognostic factor for recurrence after surgical resection of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2013 Mar;33(3):1181-8.
337. Cillo U, Giuliani T, Polacco M, Herrero Manley LM, Crivellari G, Vitale A. Prediction of hepatocellular carcinoma biological behavior in patient selection for liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 7;22(1):232-52.
338. Kamo N, Kaido T, Yagi S, Okajima H, Uemoto S. Liver transplantation for small hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2016 Oct;5(5):391-398.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO I: AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO



Arrixaca
**Hospital Universitario
 "Virgen de la Arrixaca"**
 Ctra. Madrid - Cartagena • Tel. 968 36 95 00
 30120 El Palmar (Murcia)

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
 Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 24/06/2019, acta 06/2019 ha evaluado la propuesta del investigador **Dr. Pablo Ramírez Romero** referida al estudio:

Título: Estudio del PIVKA-II y de otros marcadores angiogénicos y metastásicos en el trasplante hepático por hepatocarcinoma

Código Interno: 2019-4-2-HCUVA

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIm emite un **DICTAMEN FAVORABLE** y acepta que dicho estudio sea realizado por el **Dr. Pablo Ramírez Romero** como investigador principal en el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*.

Lo que firmo en Murcia, a 24 de junio de 2019

Fdo:



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
 Presidente del CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca

8.2 ANEXO II: CONSENTIMIENTO INFORMADO



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE (v.4)

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

En el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Las muestras y datos clínicos obtenidos para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios

Solicitamos su autorización para incorporar al *Biobanc-Mur Nodo 1* del *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*, *Biobanco IMIB*, el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.

Seguindo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, el Real Decreto 1716/2011 por el que se regulan los Biobancos, el Reglamento (UE) 2016/679, General de Protección de Datos, y la Ley Orgánica 3/2018, de Protección de Datos Personales y de Garantía de los Derechos Digitales, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta

¿Qué es un biobanco?: Institución para favorecer la investigación y la salud.

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas.

Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de un comité científico y otro de ética. Las muestras se cederán generalmente sin información personal asociada, aunque a veces podrá ser necesario el acceso a la historia clínica o al resultado de otras pruebas para completar la investigación.

La investigación biomédica es, hoy en día, un fenómeno global por lo que ocasionalmente estas muestras podrán ser cedidas a grupos de investigación fuera de España, siempre que se cumplan los requisitos de la legislación española y lo aprueben los correspondientes comités.

Muestras biológicas e información asociada: En ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el Biobanco *Biobanc-Mur Nodo 1* del *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*, *Biobanco IMIB*, hasta su extinción. Este Biobanco forma parte de la Red Nacional de Biobancos, como nodo de dicha Red del Instituto de Salud Carlos III con la referencia *PT17/0015/0038*, y está registrado en el Registro Nacional de Biobancos con número de referencia **B.0000859**.

Este biobanco acoge colecciones organizadas de muestras biológicas e información asociada en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión 4 11/07/2019



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



por los Comités de Ética. Dichas muestras y su información asociada quedan disponibles para aquellos investigadores que lo soliciten al biobanco.

Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estos datos o muestras deberá disponer siempre de la aprobación del Comité de Ética (CE) competente, que velará para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. Además, el Comité Científico del biobanco garantizará que los proyectos sean de excelencia científica.

A partir de las muestras donadas, en los casos en que la investigación lo requiera, se realizarán estudios genéticos, y a partir de ellos se puede obtener información acerca de su salud y la de sus familiares. Siempre se actuará velando por la protección de esta información (ver apartado de protección de datos y confidencialidad).

Por este consentimiento, los responsables del Biobanco podrán consultar su historial clínico, solamente en el caso de que ello sea imprescindible para la realización del proyecto para el que se soliciten las muestras y previa autorización por parte del Comité de Ética correspondiente.

En caso de ser necesaria alguna muestra adicional, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración. En este caso se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento si fuese necesario.

Protección de datos y confidencialidad: Las muestras se conservarán codificadas.

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Mediante este proceso los investigadores que soliciten muestras al biobanco no podrán conocer ningún dato que revele su identidad. Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizadas, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad.

Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas pasarán a formar parte del Registro de Actividades de Tratamiento de la entidad titular del Biobanco:

- El Responsable del Tratamiento es el Hospital Clínico Universitario "Virgen de la Arrixaca" (Área I de Salud-Murcia/Oeste), cuya Delegada de Protección de Datos (DPD) es Doña Elena García Quiñones.
- Dirección Postal: Servicio Murciano de Salud, C./ Central nº 7, Edificio Habitamia I, 30100, Espinardo-Murcia
- Correo electrónico: dpd-sms@carm.es.

Usted podrá ejercer sus derechos de ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión, oposición, limitación del tratamiento y portabilidad (solicitar remitir a un tercero autorizado copia de los datos), en la medida que sean aplicables, a través de comunicación escrita al Responsable del Tratamiento de la siguiente manera concretando su solicitud, junto con su DNI o documento equivalente: También tiene derecho a obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose a:

Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia
 Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia
 Tel.: 968359757 E-mail: atencionaldonante@ffis.es



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión 4 11/07/2019



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



La Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre, de Protección de datos de carácter Personal y garantía de los derechos digitales y el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD). Por ello, es importante que conozca la siguiente información:

- La base jurídica que legitima el tratamiento es su consentimiento
- Normativa aplicable: Reglamento (UE) n 536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de abril de 2014 , sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano, y por el que se deroga la Directiva 2001/20/CE; Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y Garantía de los Derechos Digitales, Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica; Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios; Ley 44/ Ley 44/2003, de 21 de noviembre, de ordenación de las profesiones sanitarias, así como la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad, la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, de autonomía del paciente, y demás legislación vigente en materia sanitaria.
- Asimismo, le informamos de la posibilidad de presentar una reclamación ante la Agencia Española de Protección de Datos (C/Jorge Juan, 6 Madrid 28001) www.agpd.es

Carácter altruista de la donación. *La cesión de muestras biológicas que usted realiza al Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Biobanco IMIB, es gratuita.*

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

Participación voluntaria. *Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura*

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

Revocación del consentimiento: *si usted decide firmar este consentimiento, podrá también cancelarlo libremente.*

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del biobanco. También podría solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminaría la relación entre sus datos personales (que revelan su identidad) y sus muestras biológicas y datos clínicos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrían extender a la investigación que ya se hubiera llevado a cabo.

Si deseara anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Titular del Biobanco, en la dirección anteriormente indicada.

Información sobre los resultados de la investigación: *se le proporcionará información si usted desea recibirla*

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el Biobanco podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y de los resultados globales de dichas investigaciones, salvo en el caso de cancelación o anonimización.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión 4 11/07/2019



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted. Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así lo estima oportuno. Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de este documento.

Si usted no desea recibir esta información, tenga en cuenta que la ley establece que, cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir si es conveniente informar a los afectados o a sus representantes legales.

Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento. Asimismo, puede comentar sus dudas con su médico, quien le pondrá en contacto con el personal sanitario autorizado.

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión 4 11/07/2019



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO

Nombre y Apellidos (DONANTE)..... Etiqueta Identificativa Paciente Nº Historia Clínica: Fecha de nacimiento: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
---	--

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo 1, Biobanco IMIB*, en los términos antes explicados, por favor, lea, complete y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca** a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el **Biobanco IMIB, Biobanc-Mur Nodo 1** y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

Confirmo que:

- Autoriza al **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca** a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el **Biobanco IMIB, Biobanc-Mur Nodo 1**, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.
 SI NO
- Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto.....
- Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales
 SI NO Teléfono o E-mail de contacto:
- Autoriza a este Biobanco a realizar transferencias nacionales o internacionales de sus muestras y datos, siguiendo siempre la normativa aplicable, los requisitos y la documentación necesaria.
 SI NO
- He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

DONANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a..... de..... de.....





BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO POR REPRESENTACIÓN

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (DONANTE)..... Etiqueta Identificativa Paciente Nº Historia Clínica: Fecha de nacimiento: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
---	--

Nombre y apellidos del REPRESENTANTE que firma..... DNI..... Relación con el donante:.....
--

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo 1, Biobanco IMIB*, en los términos antes explicados, por favor, lea complete y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante confirma que el donante:

1. Autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco IMIB, Biobanc-Mur Nodo 1*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.
 SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales
 SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. Autoriza a este Biobanco a realizar transferencias nacionales o internacionales de sus muestras y datos, siguiendo siempre la normativa aplicable, los requisitos y la documentación necesaria.
 SI NO

5. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

TESTIGO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a..... de..... de.....





BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

POR EL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI anulo el consentimiento prestado en fecha..... de.....de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área I**, que doy por finalizada al día de hoy.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

POR EL TUTOR/REPRESENTANTE LEGAL DEL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI, Como representante legal de D/Dña....., con DNI....., anulo el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo 1**, **Biobanco IMIB**, que doy por finalizada al día de hoy.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO LOS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión 4 11/07/2019

8.3 ANEXO III: PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DERIVADAS

8.3.1 Artículos científicos

“Matrix Metalloproteinase 1 as a Novel Biomarker for Monitoring Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Patients”

Sánchez-Lorencio MI, Saenz L, Ramirez P, **Villalba-López F**, de la Orden V, Mediero-Valeros B, Revilla Nuin B, Gonzalez MR, Cascales-Campos PA, Ferreras-Martínez D, Noguera-Velasco JA, Díaz-Rubio E, Parrilla P. Matrix Metalloproteinase 1 as a Novel Biomarker for Monitoring Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Patients. *Transplant Proc.* 2018 Mar;50(2):623-627. DOI: 10.1016/j.transproceed.2017.11.061.

ABSTRACT

Introduction. Orthotopic liver transplantation (LT) is considered to be one of the few curative treatments available for early stages of hepatocellular carcinoma (HCC). Alfa-fetoprotein (AFP) is the most-used biomarker for HCC despite low sensitivity and specificity. Matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) has been considered to be involved in the process of vascular invasion of the malignant cells. The objective of this study was to assess the use of MMP-1 for the management of HCC patients for LT.

Methods. Levels in serum of MMP-1 (ng/mL) and AFP (ng/mL) were assessed in 20 HCC patients (Milan criteria) before and 1, 6, and 12 months after LT.

Results. There was a strong significant correlation between levels of MMP-1 and levels of AFP ($r = .954$; $P = .05$). There were statistical differences in the levels of MMP-1 and AFP between the pre-transplantation and post-transplantation groups (1 and 12 months). Increments of both markers 6 months after LT compared with the levels 1 month after LT were detected in 4 of the 20 HCC patients. The detection of recurrence by means of imaging was coincident with the increment of both markers 6 months after LT in 3 of those 4 patients.

Conclusions. After 12 months of follow-up, levels of MMP-1 were comparable to AFP levels after LT. Levels of both markers increase 6 months after LT in patients showing recurrence, indicating discriminatory power to predict relapse and thus serving as valuable markers for HCC monitoring. MMP-1 could be useful in the management of HCC after LT.

“Usefulness of PIVKA-II for Monitoring after Liver Transplantation in Patients with Hepatocellular Carcinoma”

Revista: Biomarker research (en revisión).

Francisco Villalba López, Luis Francisco Sáenz, Maria Isabel Sánchez Lorencio et al. Usefulness of PIVKA-II for Monitoring After Liver Transplantation in Patients With Hepatocellular Carcinoma, 19 May 2022, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1672505/v1>].

Background: the high morbidity and mortality of hepatocellular carcinoma (HCC) has encouraged the search for new biomarkers to be used alongside alpha-fetoprotein (AFP) and imaging tests. The aim of this study was to evaluate the clinical contribution of protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) for HCC monitoring after liver transplantation (LT) and compare it with AFP, a routinely used tumour marker.

Methods: a total of 46 HCC patients (Milan criteria) were enrolled in this study. Serum levels of PIVKA-II and AFP were measured before transplantation and at 1, 6 months, 1 year and 2 years after transplantation. Clinical features were determined for all the patients that were included.

Results: significant correlations were found between PIVKA-II expression levels and some clinicopathological features, such as tumour size and number of pre-transplant transarterial chemoembolizations (TACEs). Serum levels of PIVKA-II and AFP decreased significantly after LT and increased in patients with tumour recurrence. Combined determination of pre-transplant PIVKA-II and AFP levels improved the predictive ability of each biomarker separately for post-transplant recurrence.

Conclusions: serum PIVKA-II levels were associated with tumour size and with the number of pre-transplant TACEs suggesting that this biomarker may play an important role in predicting disease severity. Furthermore, monitoring PIVKA-II levels in HCC transplant recipients reflects the tumor early recurrence after transplantation and could be used, complementing AFP and imaging tests, as a novel biomarker of this pathology.

8.3.2 Comunicaciones a congreso

8.3.2.1 Comunicaciones a Congresos Internacionales

1. Role of the PIVKA-II concentration in peripheral blood in hepatocellular carcinoma liver transplant patients.

Sáenz Mateos Luis Francisco, Ramírez Romero Pablo, Sánchez Lorenzo María Isabel, **Villalba López Francisco**, de la Orden García Virginia, González Sánchez María del Rocío, de Miguel del Barrio Andrea, Baroja Mazo Alberto, Revilla Nuin Beatriz, Noguera Velasco José Antonio, Parrilla Paricio Pascual.

Euromedlab Athens 2017 Congress.

2. Comparison of PIVKA-II levels between different etiologies of hepatocellular carcinoma.

F. Villalba López, L.F. Sáenz Mateos, V. De La Orden García, B. Mediero Valeros, J.A. Noguera Velasco, P. Ramírez Romero.

Euromedlab Barcelona 2019 Congress.

3. PIVKA-II and biochemical parameters in patients with hepatocellular carcinoma on waiting list for liver transplantation.

Felipe Alconchel, **Francisco Villalba-López**, Luis Francisco Sáenz-Mateos, Pedro Antonio Cascales-Campos, Virginia de la Orden García, Laura Martínez, José Antonio Pons, Francisco Sánchez-Bueno, Ricardo Robles, Pablo Ramírez.

28th International Congress of The Transplantation Society 2020.

4. Role of IL-6 in the management of the hepatocellular carcinoma trasplant patient.

F. Villalba López, F. Alconchel Gago, P. Cascales Campos, L.F. Sáenz Mateos, A. Baroja Mazo, P. Ramírez Romero.

14th European-African Hepato-Pancreato-Biliary Association Virtual Congress 2021.

8.3.2.2 Comunicaciones a Congresos Nacionales

1. Estudio preliminar de nuevos marcadores tumorales en pacientes trasplantados por hepatocarcinoma.

L.F. Sáenz Mateos, M.I. Sánchez Lorenzo, G.M. Varo Sánchez, V. De La Orden García, **F. Villalba López**, P. Ramírez Romero.

XXIV Reunión Científica de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos 2017.

2. Estudio preliminar de la utilidad de IL-8 en el manejo del hepatocarcinoma.

F. Villalba López, L.F. Sáenz Mateos, P. Ramírez Romero, B. Revilla.

XI Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2017.

3. Estudio de los niveles de osteopontina y metaloproteasa-1 en pacientes con hepatocarcinoma sometidos a trasplante.

M.I. Sánchez Lorenzo, L.F. Sáenz Mateos, P. Ramírez Romero, **F. Villalba López**, B. Revilla Nuin, J.A. Noguera Velasco.

XI Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2017.

4. Estudio preliminar de PIVKA-II, MMP-1, VEGF y Glipicano-3 como posibles marcadores de evolución en el trasplante hepático por hepatocarcinoma.

F. Villalba López, L.F. Sáenz Mateos, V. De La Orden García, M.I. Sánchez Lorenzo, B. Revilla Nuin, P. Ramírez Romero.

XXV Reunión Científica de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos y Medicina del Laboratorio 2018.

5. Estudio de niveles de PIVKA-II entre diferentes etiologías de hepatocarcinoma y evaluación de la posible correlación entre PIVKA-II y la escala MELD antes del trasplante hepático.

Francisco Villalba López, Luis Francisco Saenz Mateos, Pablo Ramirez Romero, Felipe Alconchel, Maria Isabel Sánchez Lorenzo, Beatriz Mediero Valeros, Virginia de la Orden García.

III Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca 2018.

6. Utilidad de la metaloproteasa 1 y alfa-fetoproteína en el paciente trasplantado por hepatocarcinoma.

L.F. Sáenz Mateos, M.I. Sánchez Lorenzo, **F. Villalba López**, V. De La Orden García, B. Mediero Valeros, J.A. Noguera Velasco, P. Ramírez Romero.

XII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2018.

7. Estudio preliminar del papel de IL-6 e IL-8 en el manejo del paciente trasplantado por hepatocarcinoma.

F. Villalba López, L.F. Sáenz Mateos, M.I. Sánchez Lorenzo, A. Baroja Mazo, J.M. Zarauz García, P. Ramírez Romero.

XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2020.

8. ¿Puede el PIVKA-II predecir la recidiva tras el trasplante hepático por hepatocarcinoma?

F. Villalba López, L.F. Sáenz Mateos, V. de la Orden García, A. Baroja Mazo, P. Ramírez Romero.

XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2020.

9. Estudio del PIVKA-II y de la interleucina-6 en el trasplante hepático por hepatocarcinoma.

Francisco Villalba López, Luis Francisco Sáenz Mateos, Virginia De La Orden García, José María Zarauz García, Alberto Baroja Mazo, Pablo Ramírez Romero.

XXVII Congreso Andaluz de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos y Medicina del Laboratorio 2021.

10. Evolución de los niveles de IL-8 en pacientes trasplantados por hepatocarcinoma a los tres años post-trasplante.

Francisco Villalba López, Maria Isabel Sánchez Lorenzo, Luis Francisco Sáenz Mateos, Alberto Baroja Mazo, Pablo Ramírez Romero.

XXVII Congreso Andaluz de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos y Medicina del Laboratorio 2021.

11. Papel de la osteopontina como biomarcador del hepatocarcinoma.

F. villalba lópez, M.I. Sánchez Lorencio, L.F. Sáenz Mateos.

XV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2021.

12. Análisis comparativo de dos analizadores para la determinación de alfa-fetoproteína.

F. villalba lópez, M.I. Sánchez Lorencio, L.F. Sáenz Mateos.

XV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2021.

13. Estudio de los índices RNL y RPL en el trasplante hepático por hepatocarcinoma.

F. Villalba López, M.I. Sánchez Lorencio, L. Rosado Jiménez, L.F. Sáenz Mateos.

XV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2021.

14. Comparación de la eficacia de los niveles pre-trasplante de PIVKA-II y AFP en la predicción de recidiva post-trasplante en el trasplante hepático por hepatocarcinoma.

Francisco Villalba López, María Isabel Sánchez Lorencio, Luis Francisco Sáenz Mateos, Alberto Baroja Mazo, Pablo Ramírez Romero.

VI Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca 2021.