



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Utilidad de la Biopsia Líquida y Otros Marcadores
Tumorales en el Trasplante Hepático por Hepatocarcinoma

Dña. María Isabel Sánchez Lorenzo
2019



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Utilidad de la Biopsia Líquida y otros marcadores
tumoraes en el Trasplante Hepático por Hepatocarcinoma

D^a María Isabel Sánchez Lorencio

2019

AGRADECIMIENTOS

Mediante estas líneas deseo expresar mi más sincero agradecimiento a algunas de las personas que durante estos años han estado a mi lado, directores, compañeros, familiares y amigos, todos de una forma u otra habéis contribuido a hacer realidad esta tesis.

Quisiera agradecer de forma muy especial a los directores de esta Tesis Doctoral, al Dr. Luis Francisco Sáenz Mateos y al Dr. Pablo Ramírez por la profesionalidad, el compromiso y la motivación que desde el principio han demostrado. Ha sido para mí un verdadero placer haber trabajado con ellos, sin cuyas aportaciones este trabajo no se hubiera realizado.

A la Unidad de Células Tumorales Circulantes del Hospital Clínico San Carlos, y concretamente a la Dra. Virginia De La Orden, por la medición de Células Tumorales Circulantes, y por la ayuda obtenida cuando la he necesitado.

Al Servicio de Análisis Clínicos, concretamente al Jefe de Servicio, el Dr. José Antonio Noguera, por su continuo apoyo y colaboración y por el buen trato recibido.

A la Dra. Rocío González, por sus sabios consejos, por su colaboración y ayuda desinteresada, pero sobre todo por su trato humano, comprensión y amistad.

A la Dra. Beatriz Revilla y al Dr. Alberto Baroja, por su gran ayuda y disponibilidad, así como por sus servicios, materiales y equipos prestados.

A la unidad de Inmunología y en especial al enfermero supervisor José Miguel. Gracias a él obtuvimos las muestras necesarias para la realización de esta tesis, siempre arrancándoles una sonrisa a nuestros pacientes, con su gran amabilidad y simpatía.

A Jacobo, por ayudarme con el trabajo estadístico y por ofrecerme sus sabios consejos.

A mis compañeros residentes, con los que he compartido estos años y que de una forma u otra han vivido la evolución de este trabajo. A Elena, Mireya, Marisa, y

especialmente a Curro por ayudarme en la recogida de las muestras de los donantes de este trabajo.

A “mis biólogos”, por ser un ejemplo para mí, en la constancia y en la superación, y por demostrarme que todo trabajo tiene su recompensa.

A mis padres, Juan y Juana Mari, por quererme tanto, y por brindarme un apoyo incondicional en todo lo que hago. Gracias por ser como sois.

A mi hermano José Antonio y Thamara, por estar siempre ahí, formar parte de mi vida y de mis experiencias.

A Juan Antonio, por todo su cariño y amor, por estar en los momentos buenos, y también en los malos, por sus consejos y su comprensión. Gracias por todo este tiempo a mi lado.

A mi hija, Nuria, por ser el motor que empuja mi vida desde el primer momento que supe de su existencia. Te quiero hoy y siempre.

A mi fiel compañera de vida, Keyla.

A la Fundación Séneca, por la ayuda económica recibida durante los años 2015-2018, dentro de las “Ayudas para la realización de proyectos de investigación destinadas a grupos competitivos”, del Programa de Apoyo a la Investigación 2014 y a la Fundación José Luis Castaño-SEQC, por la concesión de la “Beca Post-Residencia 2017-2018 para proyectos de investigación”.

Al Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y al Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria, por haberme permitido utilizar sus instalaciones, equipos y material para la realización de esta Tesis Doctoral.

A cada uno de los pacientes, que pese a estar pasando por su enfermedad, se han ofrecido voluntarios para llevar a cabo ese estudio. Y a cada una de las familias que, en

el momento más duro de su vida, donan los órganos de su ser querido para salvar la vida a otras. Gracias a todos ellos, este trabajo ha sido posible.

A todos, muchas gracias.

El trabajo mostrado en la presente tesis, se ha desarrollado en el marco de 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).

A mi pequeña Nuria

“El camino del progreso no es ni rápido ni fácil”

Marie Curie

RESUMEN/ABSTRACT

Resumen

El hepatocarcinoma (CHC) representa el 80-90% de las neoplasias primarias del hígado. Las únicas opciones curativas son la resección y el trasplante hepático. Es sabido que las metástasis a partir de un tumor localizado ocurren de forma temprana mediante la diseminación de células tumorales circulantes (CTCs). Éstas nos proporcionan una biopsia líquida a tiempo real, pudiendo ser útil para estadificar el cáncer y predecir su evolución. Además, el microambiente tumoral está formado por una serie de moléculas que juegan un importante papel en la proliferación y supervivencia celular, así como en la angiogénesis y metástasis.

El objetivo de este estudio ha sido analizar las concentraciones de CTCs en sangre periférica, junto a otros biomarcadores, pre-trasplante y pos-trasplante hepático, en pacientes con CHC y establecer su relación con la progresión de la enfermedad y con la supervivencia tras el trasplante hepático.

Para llevar a cabo este objetivo se ha desarrollado un estudio analítico observacional de cohortes dinámicas prospectivas, en el que se ha analizado los datos obtenidos de una cohorte de pacientes trasplantados hepáticos con el diagnóstico de CHC, dentro de los criterios de Milán, entre septiembre de 2014 y octubre de 2017, dentro del programa de Trasplante Hepático del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).

Al analizar los resultados, encontramos que el mejor método de detección de CTCs fue el sistema Isoflux[®]. Los niveles de CTCs descendieron tras el trasplante y, elevados niveles pre-trasplante, se asociaron a parámetros bioquímicos y clínicos de mal pronóstico (bilirrubina, PCR, invasión vascular, número de tumores y tiempo en lista de espera) y a una menor supervivencia libre de enfermedad tras el trasplante. Los niveles de alfa-fetoproteína (AFP), metaloproteasa 1 (MMP-1), osteopontina (OPN) e interleucina 8 (IL-8), descendieron tras la cirugía. Sin embargo, aumentaron en aquellos pacientes con recidiva tumoral. Además, se observó una tendencia a una menor supervivencia sin recidiva tras el trasplante en aquellos pacientes con mayores niveles pre-trasplante de AFP y MMP-1.

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que, los niveles de CTCs disminuyen tras la cirugía curativa y su determinación puede tener una implicación clínica útil a la hora de predecir la evolución del CHC tras el trasplante. Los niveles de AFP, MMP-1, OPN e IL-8 también podrían ser útiles para monitorizar la respuesta al tratamiento y la recurrencia tras la cirugía curativa en el CHC.

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 80-90% of primary liver cancers. The only potentially curative options are resection and liver transplantation. It is known that the metastatic spread of a localized carcinoma occurs at an early stage through the dissemination of circulating tumor cells (CTCs). These cells provide us a real-time liquid biopsy, which can be useful for staging the cancer and predicting its evolution. In addition, the microenvironment of the tumor is made up of a series of molecules that play an important role in the proliferation and survival of cells, as well as in angiogenesis and metastasis.

The aim of this study was to analyze the pre-transplant and post-liver transplant concentrations of peripheral's blood CTCs, together with other biomarkers, in patients with HCC, and establish their relationship with the progression of the disease and with the survival after liver transplant.

For this purpose, an observational analytical study of dynamic prospective cohorts has been developed, in which the data obtained from a cohort of liver transplant patients with the diagnosis of HCC, within the Milan criteria, was analyzed between September 2014 and October 2017, within the Hepatic Transplant program of the Clinical University Virgen de la Arrixaca Hospital (Murcia).

After analyzing the results, we found that the best CTCs detection method was the Isoflux[®] system. The levels of CTCs decreased after transplantation and, high CTCs pre-transplant levels, were associated with poor prognosis biochemical and clinical parameters (bilirubin, CRP, vascular invasion, number of tumors and time on waiting list) and a lower disease free survival rate after transplant. Alpha-fetoprotein (AFP), metalloprotease 1 (MMP-1), osteopontin (OPN) and interleukin 8 (IL-8) levels decreased after surgery. However, they increased in those patients with tumor recurrence. In addition, a trend towards lower survival without recurrence after transplantation was observed in those patients with higher AFP and MMP-1 pre-transplant levels.

Therefore, our results show that CTC levels decrease after curative surgery and its determination may have a useful clinical implication to predicting the evolution of HCC after transplantation. AFP, MMP-1, OPN and IL-8 levels could also be useful for monitoring response to treatment and recurrence after curative surgery in HCC.

ABREVIATURAS

AASLD: *American Association for the study of Liver Diseases.*

AFP: Alfa-fetoproteína.

AJCC: *American Joint Comitte on Cancer.*

ALCH: Enolismo.

ALP: Fosfatasa Alcalina.

ALT/GPT: Alanina Aminotransferasa / Transaminasa Glutámico-pirúvica.

APC: Aloficocianina.

AST/GOT: Aspartato Aminotransferasa / Transaminasa Glutámico-Oxalacética.

AUC: Área Bajo la Curva.

BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer.*

BT: Bilirrubina Total.

CEA: Antígeno Carcinoembrionario.

CHC: Carcinoma Hepatocelular / Hepatocarcinoma.

CKs: Citoqueratinas.

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

CRIPTO: Criptogénica.

CSCs: Células Madre o *Stem Cells* Circulantes.

CTCs: Células Tumorales Circulantes.

CUPI: *Chinese University Prognostic Index.*

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

E: Especificidad.

ECLIA: Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia.

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group.*

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.

EHNA: Esteatohepatitis No Alcohólica.

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.

EMT: Transición Epitelial Mesenquimal.

EpCAM: Molécula de Adhesión de Células Epiteliales.

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting.*

FAST: *Fiber-Optic Array Scanning Technology.*

FDA: Agencia Gubernamental de Control de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

FDG: 2-deoxi-2-[¹⁸F] fluoro-D-glucosa.

Fe: Sobrecarga Férrica.

FGF-2: Factor Básico de Crecimiento de Fibroblastos 2.
FISH: Hibridación In Situ Fluorescente.
FITC: Isotiocianato de Fluoresceína.
GGT: Gamma Glutamil Aminotransferasa.
GLUCOG: Glucogenosis tipo III.
GPC3: Glipicano-3.
HEMO: Hemocromatosis.
IFG's: Factores de Crecimiento Tipo Insulínicos.
IL-6: Interleucina 6.
IL-8: Interleucina 8.
ISET: *Isolation by Size of Epithelial Tumour Cells*.
LDH: Lactato Deshidrogenasa.
LOES: Lesiones Ocupantes de Espacio.
ME: Matriz Extracelular.
MELD: *Model for End-Stage Liver Disease*.
MMP-1: Metaloproteasa 1 de Matriz.
MMPs: Metaloproteasas de Matriz.
OPN: Osteopontina.
PCR: Proteína C Reactiva.
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PE: Ficoeritrina.
PET: Tomografía por Emisión de Positrones.
RECIST: *Response Evaluation Criteria in Solid Tumor*.
RM: Angio-Resonancia Magnética.
RNL: Ratio Neutrófilos-Linfocitos.
ROC: *Receiver Operating Characteristic*.
RQ: Resección Quirúrgica.
RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcriptasa Inversa.
S: Sensibilidad.
SG: Supervivencia General.
SIBLING: Glicoproteínas de Unión a Pequeñas Integrinas.
SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad.
SUV: Valor Estandarizado de Captación.
TACE: Quimioembolización Transarterial.

TC: Tomografía Computarizada.

TG: Triglicéridos.

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante β .

TIMPs: Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas.

TOH: Trasplante Ortotópico Hepático.

TP: Tiempo de Protrombina.

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

VEGF-C: Factor de Crecimiento Endotelial Vacular C.

VHB: Virus de la Hepatitis B.

VHC: Virus de la Hepatitis C.

VHD: Virus de la Hepatitis D.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

VPN: Valor Predictivo Negativo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 HEPATOCARCINOMA.....	3
1.1.1 Epidemiología.....	3
1.1.2 Etiología.....	4
1.1.3 Manifestaciones clínicas.....	6
1.1.4 Diagnóstico.....	7
1.1.4.1 Programas de cribado de CHC.....	11
1.1.4.2 Otras pruebas de valoración de la función hepática en CHC.....	12
1.1.5 Pronóstico.....	13
1.1.6 Prevención.....	14
1.1.7 Estadificación.....	14
1.1.8 Tratamiento.....	19
1.2 CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.....	23
1.2.1 Aislamiento, detección y caracterización de CTCs.....	26
1.2.1.1 Sistemas de enriquecimiento e identificación de CTCs.....	27
1.2.1.2 Aislamiento e identificación de CTCs por inmunomagnetismo.....	33
1.2.2 Papel de las CTCs en el CHC.....	36
1.2.3 Transición Epitelial Mesenquimal (EMT) y Células <i>Stem Cell</i> Circulantes (CSCs).....	38
1.3 OTROS BIOMARCADORES EN ESTUDIO EN EL CHC.....	40
1.3.1 Metaloproteasas de matriz (MMPs).....	41
1.3.1.1 Metaloproteasa-1 (MMP-1).....	44
1.3.1.2 MMP-1 en CHC.....	45
1.3.2 Glipicano-3 (GPC3).....	46
1.3.2.1 GPC3 en CHC.....	47
1.3.3 Osteopontina (OPN).....	49
1.3.3.1 Papel de OPN en el cáncer.....	50
1.3.3.2 OPN en CHC.....	50
1.3.4 Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF).....	51
1.3.4.1 VEGF en CHC.....	51
1.3.4.2 Factor de Crecimiento Endotelial Vascular C (VEGF-C).....	52
1.3.5 Interleucina 8 (IL-8).....	53
1.3.5.1 IL-8 en CHC.....	53
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	55

3. OBJETIVOS	59
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	63
4.1 PACIENTES Y ÁMBITO DE ESTUDIO	65
4.2 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	67
4.3 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	69
4.3.1 Criterios de Inclusión	69
4.3.2 Criterios de Exclusión	69
4.4 MUESTREO	69
4.5 VARIABLES DEL ESTUDIO	70
4.5.1 Datos demográficos	70
4.5.2 Parámetros analíticos pre y post-trasplante	70
4.5.2.1 CTCs en sangre	70
4.5.2.2 Parámetros bioquímicos	70
4.5.2.3 Marcadores tumorales clásicos	71
4.5.2.4 Otros marcadores tumorales	71
4.5.2.5 Parámetros hematológicos.....	71
4.5.2.6 Parámetros de coagulación.....	72
4.5.3 Variables clínicas	72
4.6 RECOGIDA DE VARIABLES	73
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	75
4.7.1 Aislamiento y detección de CTCs por el Sistema Isoflux®	75
4.7.2 Aislamiento y detección de CTCs por el sistema CellSearch®	77
4.7.3 Determinación de parámetros bioquímicos, hematológicos y de coagulación.....	78
4.7.4 Determinación de marcadores tumorales clásicos: AFP y CEA.....	78
4.7.5 Determinación de otros marcadores tumorales	79
4.8 ANÁLISIS DE DATOS	80
5. RESULTADOS	83
5.1 Estadística descriptiva de las variables	85
5.2 Comparación del recuento de CTCs entre los métodos analíticos CellSearch® e Isoflux®	100
5.3 Relación entre las CTCs y los parámetros bioquímicos, hematológicos y de coagulación pre-trasplante	102

5.4 Asociación entre el número de CTCs pre-trasplante y parámetros demográficos y clínicos	106
5.5 Asociación entre los niveles de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 e IL-8, con los niveles de CTCs Y AFP, antes y después del trasplante, y con parámetros clínicos pre-trasplante.....	108
5.6 Comparación de los niveles de CTCs y otros marcadores tumorales (AFP, MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8) pre y post-trasplante.....	116
5.7 Determinación de la eficacia en la predicción de recidiva post-trasplante de la determinación de los niveles de CTCs, AFP y MMP-1 pre-trasplante	131
5.8 Asociación entre la concentración de CTCs pre-trasplante y tiempo de SG y tiempo de SLE tras el trasplante	135
5.9 Análisis de SG y SLE tras el trasplante.....	135
6. DISCUSIÓN	151
7. CONCLUSIONES	177
8. BIBLIOGRAFÍA	181
9. ANEXOS.....	221

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HEPATOCARCINOMA

El hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (CHC) constituye entre el 80-90% del total de neoplasias ocurrientes en el hígado y un 5% de todos los cánceres malignos a nivel mundial. Los últimos datos proporcionados por GLOBOCAN mostraron unos 782.000 nuevos casos y unas 745.000 muertes por cáncer de hígado en todo el mundo en 2012, ocupando el segundo lugar entre las causas de mortalidad relacionadas con el cáncer (1). Si este tumor no es eliminado de forma completa, la enfermedad es mortal en los primeros 3-6 meses (2,3), por lo que un diagnóstico y tratamiento temprano puede bloquear la progresión tumoral y mejorar el pronóstico en estos pacientes. El CHC suele aparecer en torno a un 90% de casos de cirrosis hepática ya establecida (4), siendo la principal causa de muerte por cirrosis (5).

Importantes avances recientes, han permitido un diagnóstico y un tratamiento precoz de los diferentes estadios de esta patología.

1.1.1 Epidemiología

La incidencia del CHC está aumentando en los últimos años en la mayor parte de los países, por lo que se considera un grave problema de salud. Este hecho ocurre de forma paralela a un aumento de la incidencia del virus de la hepatitis C (VHC).

La incidencia del CHC presenta variaciones geográficas, debidas a factores genéticos/raciales, factores ambientales y a diferencias geográficas de los factores de riesgo de la enfermedad (6). Así pues, existen zonas de elevada incidencia (>10 casos/100.000 habitantes) en Sudeste Asiático y África subsahariana, donde el virus de la hepatitis B (VHB) presenta altas tasas de infección. Zonas de mediana incidencia (5-10 casos/100.000 habitantes), en países de la zona mediterránea y zonas de baja incidencia (<5 casos/100.000 habitantes) en norte de Europa, Australia y América. En las regiones con baja incidencia o intermedia, los principales factores de riesgo son el alcoholismo y la infección por el virus de la hepatitis C (7).

El CHC se presenta de forma más habitual en hombres que en mujeres. Estas diferencias se deben a la epidemiología de los factores de riesgo y, posiblemente a un efecto trófico ejercido por las hormonas androgénicas. La edad de aparición ronda entre los 60-70 años, aunque en zonas de mayor incidencia puede aparecer incluso antes.

1.1.2 Etiología

Cualquier patología hepática que conduzca a una cirrosis, es un importante factor de riesgo para desarrollar un CHC posterior, aunque en ocasiones no ocurre así.

Una vez establecida la cirrosis, el riesgo de desarrollar un CHC es independiente de la causa que la originó, y ese riesgo persiste, aunque en menor medida, a pesar de eliminar el agente causante (6). Durante el desarrollo de cirrosis, se produce la activación de vías mitógenas dando lugar a poblaciones de hepatocitos displásicos como resultado de la alteración de la expresión génica. Este proceso puede tardar entre 10 y 30 años (8). Finalmente, resultará en la aparición de nódulos displásicos de bajo grado o de nódulos displásicos de alto grado (9).

A pesar de que el desarrollo del CHC se da principalmente en enfermos con hepatopatía avanzada, existe un 10% de pacientes con CHC que únicamente tienen fibrosis leve cuando son diagnosticados (10).

Los principales factores de riesgo para el CHC son los siguientes (11):

1- *Infección crónica por VHB:*

Este virus de ADN puede desarrollar enfermedad hepática llegando al estado de cirrosis y, por tanto, de CHC, con una incidencia aproximada del 2,5% anual, aunque también posee cierto poder oncogénico por sí solo, con una incidencia del 0,5% anual (12), ya que puede integrarse en el genoma de los hepatocitos y desarrollar CHC sin necesidad de alcanzar el estado de cirrosis previa (este fenómeno ocurre entre el 10 y el 30% de los casos de CHC ocasionados por el VHB) (7). Por todo esto, el tiempo transcurrido desde la infección del virus y la aparición del CHC es bastante impredecible. La infección por VHB se considera endémica en Asia oriental y África Subsahariana, siendo la principal causa de CHC. En estas regiones, el riesgo de desarrollar CHC es muy alto aun presentando el virus una baja replicación, debido a la infección en edades muy tempranas, llegando a infecciones crónicas en la mayoría de los casos (12). Esto explica la elevada incidencia de CHC en estas áreas. Existen además, una serie de factores de riesgo añadidos, que hacen más probable el desarrollo de CHC: una carga viral elevada, la presencia de cirrosis previa a la infección, el sexo masculino, la edad avanzada, antecedentes familiares de CHC, VHB genotipo C, persistencia de la replicación viral, coinfección con ciertos virus como el VHC, virus de

hepatitis D (VHD) o inmunodeficiencia humana (VIH), exposición a aflatoxinas y el abuso de alcohol (6).

El tratamiento del VHB con interferón y análogos de nucleótidos reduce el riesgo significativamente. No obstante, en los últimos años se ha observado una disminución generalizada del CHC ocasionado por el VHB debido a la implementación de la vacuna universal contra el mismo.

2- Infección crónica por VHC:

En Europa, donde la prevalencia es intermedia, el VHC constituye la causa más frecuente de CHC. En estas regiones el VHC infecta entre un 1 y un 2,64% de la población. De ellos, entre un 20-30% desarrollará cirrosis y entre un 3-5% CHC. De la misma manera que el VHB, la infección por el VHC puede conducir a la aparición de CHC tras la aparición de cirrosis previa, aunque también tiene poder oncogénico en ausencia de cirrosis, pero se requiere al menos un estado de fibrosis avanzado (13). El mecanismo etiopatogénico no está del todo claro, se cree que es debido a una reacción inflamatoria de los hepatocitos al combatir el virus, no al efecto oncogénico del mismo. Además, un incremento hepático del hierro, aumenta el estrés oxidativo intracelular. El CHC debido a VHC está fuertemente asociado pues, con el grado de inflamación y necrosis hepática. La proliferación de hepatocitos poco diferenciados, la aparición de nódulos displásicos y finalmente del CHC, podrían ser consecuencia del rápido recambio celular y la inflamación persistente provocada por el virus (14). El desarrollo de CHC como consecuencia de la infección por VHC habitualmente se da en estadios avanzados de la enfermedad hepática, con intervalo de tiempo aproximado entre la adquisición del virus y la aparición de CHC de 20 a 30 años.

3- Toxinas ambientales:

Esta es una de las principales causas de CHC en países como África y Asia, donde existen dos tipos de toxinas: la aflatoxina, micotoxina contaminante de legumbres y cereales, y las microcistinas, toxinas producidas por algas verdes y que contaminan el agua.

4- Enolismo:

El consumo de alcohol se relaciona con la aparición de cirrosis y, por lo tanto, de CHC. Además, el enolismo junto a la infección por VHB o VHC aumenta el riesgo.

5- *Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA):*

En países industrializados es una causa potencial de CHC, con un riesgo de desarrollar la neoplasia similar al de la cirrosis asociada a VHC (15).

Se desconoce si el riesgo de desarrollar CHC aumenta en pacientes con EHNA sin cirrosis establecida, o en aquellos pacientes con factores de riesgo para desarrollar la EHNA, tales como el denominado “síndrome metabólico” (obesidad, diabetes mellitus, dislipemia, resistencia a la insulina). Tampoco se conoce si la coexistencia de estas patologías supone un mayor riesgo de CHC en pacientes con cirrosis de otras etiologías (16,17). Lo que sí se sabe es que las condiciones incluidas dentro del denominado “síndrome metabólico” se asocian a una mayor mortalidad relacionada con el CHC (18).

6- *Cirrosis por otras causas:*

Hepatopatía crónica, hemocromatosis, cirrosis biliar primaria, entre otras.

Por último, el tabaco también aumenta el riesgo del CHC, mientras que el consumo de café lo disminuye (19,20).

1.1.3 Manifestaciones clínicas

Habitualmente, el CHC no presenta síntomas, ya que un 60% de enfermos son diagnosticados en estadios precoces.

Debido a que la mayoría de los casos surgen sobre una cirrosis ya establecida, pueden aparecer síntomas típicos de ésta, como la descompensación.

El desarrollo de síntomas no suele producirse hasta que el tumor alcanza tamaños entre 4,5 y 8 cm (21). Los signos y síntomas más comunes son dolor abdominal, pérdida de peso y hepatomegalia con masas palpables. Otros síntomas más raros son la ictericia obstructiva, hemobilia, hemoperitoneo, dolor óseo, disnea y fiebre (11).

En aquellos pacientes con cirrosis previamente compensada, pero que desarrollan ascitis, sangrado digestivo por varices esofágicas y encefalopatía, se debe sospechar la aparición de CHC. Todas estas complicaciones suelen relacionarse con la presencia de invasión vascular (22).

El sangrado intraperitoneal secundario a ruptura tumoral, es una complicación característica, definida por gran dolor y distensión abdominal con una disminución notable del hematocrito.

Por otra parte, pueden presentarse otros signos y síntomas que son secundarios al síndrome paraneoplásico, como hipoglucemia debida al aumento del metabolismo, eritrocitosis por secreción de eritropoyetina, hipercalcemia por secreción de proteínas relacionadas con la hormona paratiroidea o metástasis óseas, síntomas cutáneos y diarrea acuosa severa por la secreción de péptidos (23). Por último, en ocasiones pueden aparecer síntomas propios de los lugares en los que metastatiza (pulmón, hueso, ganglios linfáticos, suprarrenal y cerebro) (11).

1.1.4 Diagnóstico

Debido a la elevada incidencia y dado el carácter asintomático de esta neoplasia en estadios iniciales, es fundamental la implementación de programas de cribado y vigilancia de pacientes de alto riesgo, en los cuales habitualmente se diagnostica este tumor. Las guías de práctica clínica, como la de la *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) (24) y la guía Europea (25), aconsejan la realización de ecografías semestrales en pacientes que, presentando alto riesgo de desarrollo de tumor, podrán recibir tratamiento adecuado en caso de ser diagnosticados. La ecografía ofrece una muy buena relación coste-beneficio, ya que es económica, sin riesgos de radiación y con una sensibilidad y especificidad aceptables (26).

La determinación serológica de alfa-fetoproteína (AFP), también ha sido utilizada en los estudios de cribado, con un punto de corte de 10-20 ng/mL. Sin embargo, los valores de sensibilidad y especificidad son muy bajos. Por ello, las principales guías desaconsejan su uso (24,25,27).

Los pacientes de alto riesgo de CHC en los que están indicados los programas de cribado, son los siguientes (24):

- ✓ Pacientes con cirrosis, independientemente de la etiología.
 - Cirróticos portadores del VHB.
 - Cirróticos portadores del VHC.
 - Cirrosis biliar primaria estadio 4.
 - Cirrosis por hemocromatosis genética.

Cirrosis por déficit de alfa-1-antitripsina.

Cirrosis debido a otras causas.

- ✓ Pacientes caucásicos sin cirrosis, portadores del VHB inactivo, en los que además presentan factores de riesgo que aumentan la incidencia de CHC:

Edad avanzada.

Replicación viral persistente.

Coinfección con VHC o VIH.

Otras enfermedades hepáticas asociadas.

Historia familiar de CHC.

- ✓ Pacientes caucásicos con infección activa por VHB (carga viral elevada y/o transaminasas elevadas), en ausencia de cirrosis.

- ✓ Pacientes de Asia oriental o África Subsahariana infectados por VHB:

Varones asiáticos portadores del VHB >40 años.

Mujeres asiáticas portadoras del VHB >50 años.

Africanos portadores del VHB de cualquier edad.

En estas áreas geográficas, es importante un cribado precoz, ya que la infección es endémica, por lo que desarrollan CHC en edades más tempranas.

- ✓ Pacientes infectados por VHB y VHC en tratamiento, aunque sufran seroconversión o erradicación de la infección, siempre y cuando fueran candidatos al cribado antes de la terapia.

- ✓ Pacientes en lista de espera de trasplante ortotópico hepático (TOH), para detección de tumores de pequeño tamaño susceptibles al tratamiento, como de tumores demasiado grandes que excluyan al paciente de la recepción de un nuevo órgano.

Se cree que el cribado puede ser beneficioso también, pero con evidencia menos clara en los siguientes casos:

- ✓ Pacientes portadores del VHB <40 años (varones) o <50 años (mujeres).
- ✓ Pacientes con infección por el VHC con fibrosis estadio 3.
- ✓ Pacientes afectados de EHNA.

Tras una prueba de cribado positiva, el diagnóstico definitivo se lleva a cabo de forma no invasiva, mediante el empleo de pruebas de imagen dinámicas. Estas son principalmente la tomografía computarizada (TC) cuatrfásica y la angio-resonancia magnética (RM) (24).

1-*TC abdominal*: con una sensibilidad del 68% y especificidad del 93% (28), permite el diagnóstico de lesiones de >2cm de tamaño.

2- *RM abdominal*: con una sensibilidad del 81% y una E del 85% (28). Tiene la ventaja de no requerir contraste nefrotóxico.

Otras técnicas de imagen menos empleadas para el diagnóstico son, la angiografía, la gammagrafía y la tomografía por emisión de positrones (PET). El PET-TC combina la tomografía de emisión de positrones con la tomografía computarizada. En esta técnica se usa la 2-deoxi-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucosa (FDG), un marcador en muchos cánceres, según su captación por el tejido tumoral, que va a depender de la actividad proliferativa del tejido maligno y del número de células tumorales viables (29). Con el PET se mide la concentración de radioactividad in vivo, que será proporcional a la concentración de FDG. No obstante, interesa la captación relativa de FDG. Esto es debido a que existen dos importantes fuentes de variación en la captación de FDG: la cantidad de FDG inyectada y el tamaño del paciente. Por ello, comúnmente se emplea el Valor Estandarizado de Captación (SUV) (30), que mide la cantidad relativa de captación de FDG, en función de la cantidad de FDG inyectada y el peso del paciente, lo que facilita la comparación de estos valores entre pacientes. Presenta una baja sensibilidad para el diagnóstico (55-65%), con muchos falsos positivos y negativos. Existen valores de SUV elevados en tejidos inflamatorios no tumorales y a la inversa, tejidos tumorales con una mínima captación. Es empleado sobre todo para la detección de metástasis a distancia (11).

Además de las técnicas de imagen, son empleados los marcadores serológicos, que complementan al diagnóstico. Dentro de este grupo, el biomarcador tumoral más empleado es la AFP (31). Descubierta por primera vez en 1956 (32), se trata de una glicoproteína sintetizada principalmente en el hígado fetal. Sus niveles se encuentran elevados en neonatos, descendiendo progresivamente hasta alcanzar valores <10 ng/mL dentro del primer año de vida. Los valores elevados en el adulto están ligados a embarazo, mucoviscidosis, a la presencia de tumores germinales gonadales y otros cánceres (gastrointestinal, pancreático, biliar), hepatopatía (cirrosis, hepatitis aguda o crónica) o CHC. La concentración sérica de 20 ng/mL de este marcador junto a pruebas de imagen (33,34), suele ser el punto de corte universalmente utilizado para el diagnóstico del CHC. Sin embargo, la sensibilidad para su diagnóstico es bastante baja, oscilando entre el 50-70% (35,36), descendiendo al 22% cuando el punto de corte empleado es 200 ng/mL (37-41). Sus niveles pueden estar elevados en otras situaciones

no cancerosas como enfermedad hepática crónica e infección por VHC (42,43), presentando sobre todo un valor predictivo negativo (VPN) elevado (98%). Además, muchos pacientes con CHC presentan pequeñas elevaciones de AFP, mientras que el 80% de CHC de pequeño tamaño (<2cm) no expresan AFP. Por ello, en la actualidad su uso se ha limitado únicamente a establecer el pronóstico del CHC, considerándose un factor de recurrencia de la enfermedad (44,45). Su concentración no se correlaciona con el estadio ni el grado de malignidad del tumor, sin embargo, sí se ha visto que correlaciona con el tamaño y extensión tumoral en alrededor del 60% de tumores <5 cm y del 77% de tumores >5 cm.

Otro marcador tumoral empleado para el seguimiento de CHC es el Antígeno Carcinoembrionario (CEA). Es una glicoproteína de elevado peso molecular (180 kDa), cuya función fisiológica es desconocida, si bien se considera que podría estar relacionada con mecanismos de reconocimiento celular o en los mecanismos de adhesión, debido a su semejanza con las inmunoglobulinas. CEA es el marcador tumoral más ampliamente utilizado, pudiendo detectarse incrementos en numerosos adenocarcinomas gastrointestinales (colorrectal, gástrico, pancreático, esofágico y hepático), de mama y otros. Sin embargo, tiene un valor limitado para el diagnóstico inicial de la enfermedad. Las concentraciones séricas consideradas como normales son inferiores a 5 ng/mL. Este marcador tiene elevada especificidad, ya que, aunque se pueden encontrar valores elevados en otras situaciones benignas, los incrementos no son superiores a 25 ng/mL. En la actualidad, se considera que la mayor utilidad clínica del CEA reside en el seguimiento del curso clínico de la enfermedad de cara a la predicción de recurrencia tumoral, principalmente la hepática y la retroperitoneal.

Los criterios de diagnóstico no invasivo han supuesto un gran avance en el diagnóstico del CHC. No obstante, el diagnóstico también puede realizarse mediante otras técnicas invasivas como la biopsia y el estudio histológico. Sin embargo, la biopsia de nódulos hepáticos en presencia de cirrosis no es un proceso fácil. Se plantean complicaciones tales como, difícil acceso percutáneo, presencia de ascitis, coagulopatía por la enfermedad hepática de base, difícil visualización de los pequeños nódulos por ecografía, etc, dificultando todo ello la extracción de una muestra significativa. Además, la biopsia, al ser un procedimiento invasivo, puede presentar otras complicaciones graves, aunque muy poco frecuentes como el sangrado y la diseminación del tumor.

En los últimos años, ha cobrado importancia la determinación de microRNA plasmático como ayuda para establecer un diagnóstico precoz (46).

1.1.4.1 Programas de cribado de CHC

En los programas de cribado mediante ecografía, si se observan nódulos <1cm, se aconseja un seguimiento ecográfico cada 3-6 meses, debido a que es poco probable su naturaleza maligna y a que su caracterización mediante estudios radiológicos y biopsia es un proceso complejo debido a su pequeño tamaño. En el caso de que estos nódulos sufran cambios o crezcan, se realizarán pruebas de imagen complementarias (figura 1).

Cuando las lesiones observadas durante el cribado ecográfico sean >1cm, se recomienda pruebas de imagen dinámicas complementarias para el diagnóstico de CHC.

El diagnóstico de CHC, según la guía de la AASLD, se basa en la observación de una lesión de entre 1-2cm de diámetro con patrón vascular típico en al menos una técnica de imagen, o bien mediante diagnóstico histológico en los pacientes que no cumplen el criterio anterior (24).

Se define “patrón vascular típico”, como una intensa captación de contraste (hiperintensidad) en fase arterial seguida de lavado rápido del contraste (hipointensidad) en fase venosa portal o en fase tardía (“washout”) en las pruebas de imagen. Este patrón es específico del CHC y permite su diagnóstico en nódulos de tan sólo 1-2 cm (47-49). Este fenómeno es debido a que el CHC está irrigado solo por ramas de la arteria hepática, a diferencia del resto del parénquima hepático que tiene un aporte mixto (arteria hepática y vena porta). Así que, cuando se aplica el contraste en fase arterial, la captación será más intensa en el tumor, y el tejido hepático sano tendrá una menor captación porque la sangre estará mezclada con la que recibe de la porta carente de contraste. Cuando se aplica el contraste en fase portal, el tejido tumoral será hipointenso con respecto al resto del parénquima debido a que el contraste solo alcanza las ramas portales que irrigan el parénquima hepático normal.

Si las lesiones presentan 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 o repetición de biopsia (figura 1).

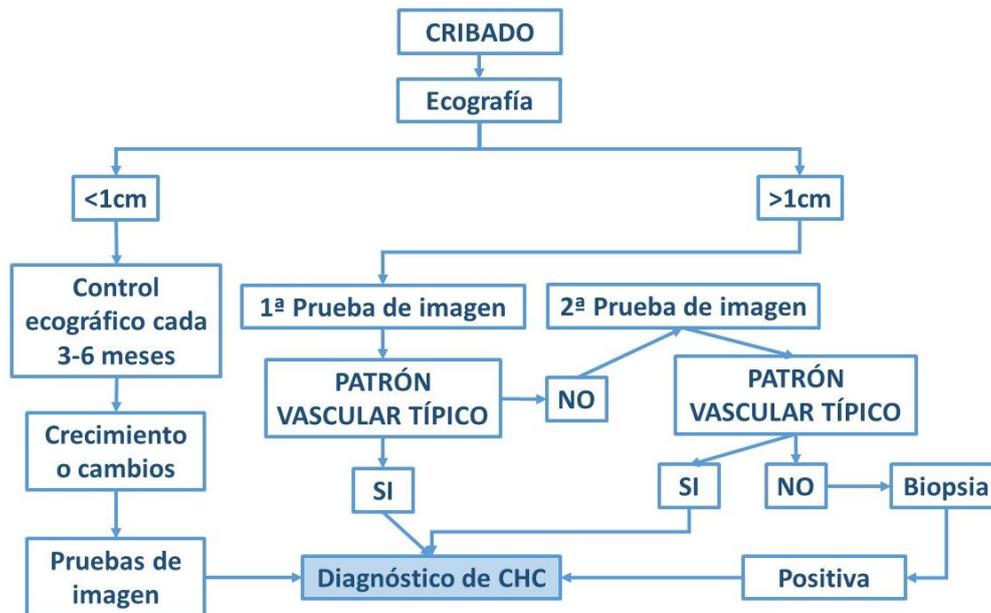


Figura 1. Algoritmo diagnóstico del CHC recomendado por la *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD). Adaptada de Bruix J. y cols., 2011 (24).

La prevalencia de lesiones metastásicas en el momento del diagnóstico es baja, por lo que no se recomienda estudiar de forma rutinaria al paciente para la búsqueda de enfermedad tumoral extrahepática. Sin embargo, en tumores de gran tamaño (>5cm) o en aquellos con invasión vascular, la probabilidad de extensión a distancia es más elevada, por lo que es necesario completar el estudio mediante TC torácico, de abdomen y pelvis, junto a gammagrafía ósea.

1.1.4.2 Otras pruebas de valoración de la función hepática en CHC

Una serie de determinaciones de laboratorio se emplean para el seguimiento de la evolución de la enfermedad en pacientes con CHC. Entre estas pruebas encontramos:

- Enzimas hepáticas: son los indicadores más sensibles de daño hepático. Aspartato aminotransferasa (AST) o transaminasa glutámico-oxalacética (GOT), alanina aminotransferasa (ALT) o transaminasa glutámipirúvica (GPT) y lactato deshidrogenasa (LDH). La GPT es el indicador más sensible y específico de daño hepatocelular.

- Indicadores de obstrucción biliar: fosfatasa alcalina (ALP), gamma glutamil aminotransferasa (GGT), bilirrubina y colesterol. La prueba más importante es la bilirrubina. Se ha visto que la gamma glutamil aminotransferasa, aumenta su actividad en tejidos con CHC (50). Presenta una sensibilidad del 74% en la detección de CHC y una sensibilidad del 43,8% en la detección de CHC de pequeño tamaño (51).
- Indicadores de la función hepática: bilirrubina, albúmina, tiempo de protrombina (TP). La albúmina es un buen indicador de enfermedad crónica.
- Marcadores de inflamación: proteína C reactiva (PCR), ratio neutrófilos-linfocitos (RNL). Un elevado RNL se ha asociado a un peor pronóstico en varios tipos de cáncer, como el colorrectal, el pancreático y el colangiocarcinoma (52-54). El RNL pre-trasplante es un parámetro predictor del pronóstico tras la cirugía en el CHC (55,56). Se ha visto que los pacientes trasplantados por CHC con valores $RNL \geq 4$ pre-trasplante, presentan menores tasas de supervivencia general (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) al año, a los tres y a los cinco años tras el trasplante en comparación con aquellos que presentan un $RNL < 4$ (56). Estos resultados sugieren que el RNL podría ser un buen marcador de recurrencia temprana tras el trasplante y ser un nuevo criterio de selección para candidatos al trasplante por CHC.
- Otros marcadores: triglicéridos (TG), ferritina, recuento de plaquetas y glucosa.

1.1.5 Pronóstico

De forma general, la mediana de supervivencia de los pacientes en el momento del diagnóstico oscila entre 6 y 20 meses (57). El pronóstico de estos enfermos es muy difícil de establecer. Se sabe que el tumoral en el momento del diagnóstico no es un buen predictor de la evolución de la enfermedad, ya que se ha descrito que estos tumores pueden tardar en duplicar su tamaño una mediana de tiempo de entre 1 a 20 meses. Además, en algunos enfermos la tasa de crecimiento es estable, mientras que en otros, crece de forma exponencial o incluso reducen su tamaño (58).

Varios estudios demuestran que AFP puede ser un buen marcador para establecer el pronóstico en estos pacientes. Se ha visto que valores ≥ 400 ng/mL en pacientes trasplantados, presentan una mayor probabilidad de recidiva (59). Otros, indican que

concentraciones ≥ 1000 ng/mL se asocian a una mayor incidencia de invasión vascular tumoral, y por lo tanto, a un peor pronóstico (60).

1.1.6 Prevención

Existen dos niveles diferentes de prevención:

Prevención primaria: consiste en evitar la adquisición de los factores de riesgo (VHB, VHC, consumo de alcohol y EHNA) mediante campañas de prevención y vacunación (vacuna para el VHB a todos los recién nacidos e inmunodeprimidos en riesgo de exposición) (61).

Prevención secundaria: consiste en administrar tratamiento antiviral, para el control del VHB o erradicación del VHC, en aquellas personas que hayan adquirido una infección crónica por estos virus, reduciendo de forma importante el riesgo de aparición de CHC, junto a programas de vigilancia o cribado (62,63).

1.1.7 Estadificación

En hepatopatías en las que se encuentran en fase de cirrosis, el sistema Child Pugh, es el más usado para clasificar el grado de disfunción hepática (64). Se trata de un modelo iniciado en el año 1964 por Child y Turcotte (65) y modificado posteriormente por Pugh en el año 1972 (66). Es un score que presenta un fácil manejo clínico y constituye un valor pronóstico de severidad de la hepatopatía. Se realiza de acuerdo al grado de ascitis, las concentraciones plasmáticas de bilirrubina y albúmina, el TP y el grado de encefalopatía (tabla 1). Una puntuación total de 5-6 es considerada grado A (enfermedad bien compensada); 7-9 es grado B (compromiso funcional significativo); y 10-15 es grado C (enfermedad descompensada). Estos grados se correlacionan con una sobrevida del paciente al año y a los 2 años (tabla 2).

Tabla 1. Escala de Child-Pugh. Pugh y cols., 1973 (66).

Parámetros	Puntos asignados		
	1	2	3
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada
Bilirrubina (mg/dL)	≤ 2	2-3	> 3
Albúmina (g/dL)	$> 3,5$	2,8-3,5	$< 2,8$
TP			
• Segundos	1-3	4-6	> 6
• INR	$< 1,8$	1,8-2,3	$> 2,3$
Encefalopatía	No	Grado 1-2	Grado 3-4

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia asociado a cada grado de la escala Child-Pugh. Adaptada de Mejide, HM. (64).

Grado	Supervivencia al año (%)	Supervivencia a 2 años (%)
A	100	85
B	80	60
C	45	35

En cuanto a la estadificación del CHC, ésta sirve para predecir el pronóstico de la enfermedad tumoral, clasificar a los pacientes según su pronóstico y elegir un tratamiento adecuado.

Existen principalmente tres sistemas de estadificación: el sistema TNM según AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), el sistema BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*) y el sistema CLIP (*The Cancer of the Liver Italian Program*). Otros sistemas de clasificación menos empleados son, el sistema Okuda (67), el sistema Francés (68), y sistema CUPI (*Chinese University Prognostic Index*) (69), todos ellos con limitaciones en cuanto a la capacidad pronóstica de pacientes con estadios tempranos de CHC.

El sistema de estadificación según TNM clasifica a los enfermos en 7 estadios (I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IVA y IVB), en función de la presencia o ausencia de invasión vascular, número de nódulos tumorales (único o múltiples), tamaño de los nódulos (> 5 cm o ≤ 5 cm), y presencia de metástasis en ganglios regionales o a distancia (tabla 3). La Asociación Americana Hepato-Pancreato-Biliar recomienda el uso de este sistema para predecir la supervivencia de los pacientes subsidiarios de tratamiento quirúrgico (70).

Tabla 3. Sistema TNM según *American Joint Committee on Cancer*, para estadificación del CHC. Edge SB. y cols. 2010 (71).

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		
Estadíos			
Estadío I	T1	N0	M0
Estadío II	T2	N0	M0
Estadío IIIA	T3a	N0	M0
Estadío IIIB	T3b	N0	M0
Estadío IIIC	T4	N0	M0
Estadío IVA	Cualquier T	N1	M0
Estadío IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1

El sistema de estadificación CLIP se usa para predecir la supervivencia de pacientes con CHC avanzado (72), en función de la puntuación *Child-Pugh*, número de nódulos tumorales, niveles de AFP sérica y presencia o ausencia de invasión portal (tabla 4).

Tabla 4. Sistema CLIP para estadificación del CHC (73).

Variable	Puntuación
Estadio Child-Pugh	
A	0
B	1
C	2
Morfología tumoral	
Uninodular y extensión $\leq 50\%$	0
Multinodular y extensión $\leq 50\%$	1
Masivo o extensión $> 50\%$	2
AFP	
< 400 ng/dL	0
≥ 400 ng/dL	1
Trombosis de la vena porta	
No	0
Sí	1

El sistema de estadificación ampliamente aceptado es el sistema BCLC (figura 2). Éste integra como variables pronósticas el tamaño tumoral y número de tumores, la disfunción hepática subyacente (escala *Child-Pugh*) y la calidad de vida del enfermo. Ésta última se estima con la escala funcional desarrollada por el *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) en 1960 (74), que permite clasificar a los pacientes en 5 estadios dependiendo de su capacidad física (tabla 5). El sistema BCLC es el único sistema de estadificación que vincula cada grupo pronóstico con una recomendación terapéutica (75,76). Además, está considerado como el sistema que estadifica con una mayor precisión a aquellos pacientes con enfermedad avanzada que no pueden ser sometidos a resección hepática o trasplante (70).

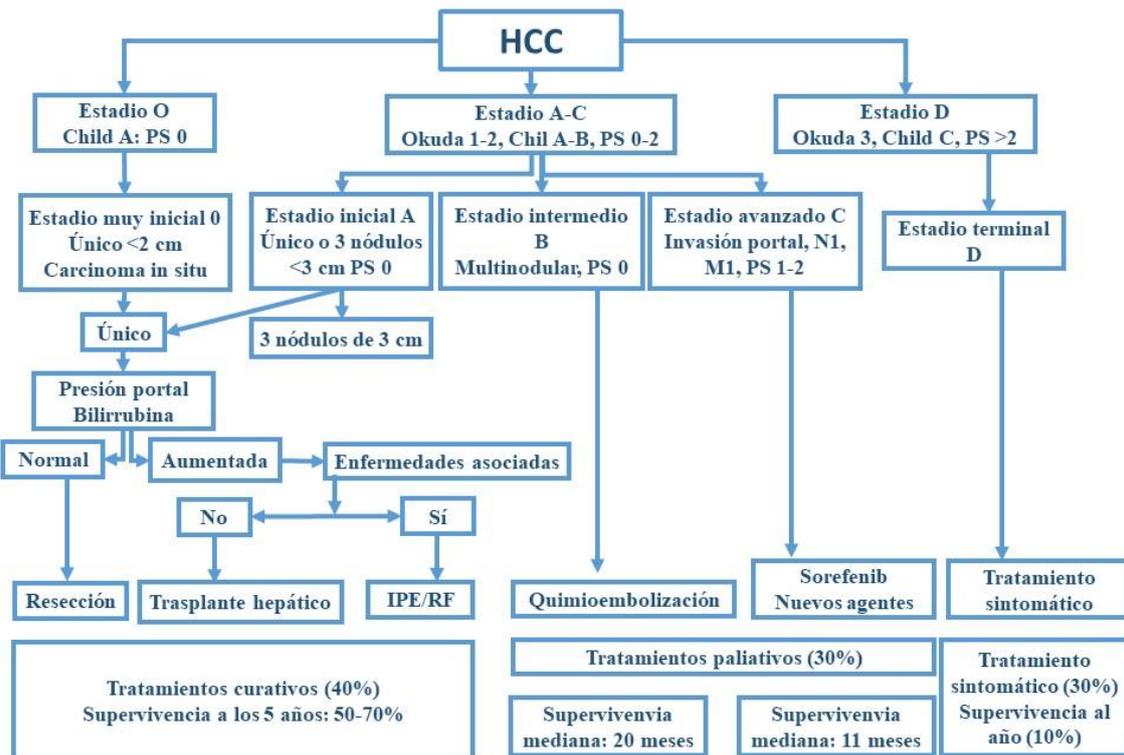


Figura 2. Sistema de estadificación del CHC según BCLC. CHC: hepatocarcinoma; IPE: inyección percutánea de etanol; PS: *performance status* “capacidad funcional del paciente”; RF: radiofrecuencia; SPV: supervivencia. Adaptada de Forner A. y cols., 2010 (75).

Tabla 5. Escala funcional ECOG. Zubrod y cols., 1960 (74).

Estadio funcional	Definición
0	Sin restricciones
1	Limitación de actividad intensa; capacidad de realizar trabajo ligero
2	Capaz del autocuidado pero incapaz de trabajar; se levanta >50% del tiempo
3	Limitado para el autocuidado; confinado a cama o sillón >50% del tiempo
4	Completamente dependiente; vida en cama o en sillón todo el tiempo
5	Exitus

Recientemente, existen avances importantes en el campo de la biología molecular del CHC, lo que en un futuro nos permitirá reconocer patrones genéticos específicos que permitan a su vez establecer un pronóstico de la enfermedad, así como la elección de tratamientos más dirigidos.

1.1.8 Tratamiento

Las opciones terapéuticas van a depender de la gravedad de la hepatopatía (11). En los estadios iniciales de la enfermedad, se aplican tratamientos considerados como curativos, y son: la resección quirúrgica tumoral (RQ), el TOH y la intervención ablativa percutánea por radiofrecuencia o inyección de alcohol (24,76).

El TOH se considera el tratamiento ideal en el CHC en estadio precoz, ya que no sólo resuelve el problema tumoral sino también la cirrosis hepática sobre la que asienta el tumor. Éste está indicado únicamente en pacientes no candidatos a resección que cumplen unos criterios de selección establecidos en los años 90, denominados Criterios de Milán (77):

- a) Tumor único ≤ 5 cm
- b) Tres tumores, ninguno mayor de 3 cm.
- c) Sin invasión vascular.
- d) Sin metástasis ganglionares ni a distancia.

Aplicando estos criterios de selección para el TOH, el pronóstico es similar al de pacientes cirróticos trasplantados por causas benignas, con tasas de supervivencia constatadas de $>70\%$ a los 5 años y tasas de recurrencias de $>15\%$ (78). El pronóstico tras el trasplante se determina usando características clínicopatológicas tras la examinación de la pieza, como la presencia de invasión vascular, tamaño tumoral, número de tumores y grado de diferenciación histológica según Edmonson y Steiner (79,80).

En algunas situaciones, no se cumplen estrictamente los criterios de Milán. Estas excepciones son debidas a que los criterios de Milán fueron definidos a partir de ensayos con pacientes con CHC debido al VHC y, por lo tanto, un peor pronóstico que otros pacientes con VHB, otras hepatopatías, o pacientes con CHC no cirróticos. No obstante, la inclusión en lista de espera de un enfermo en estas situaciones nunca debe suponer un mayor tiempo de espera que para otro que sí cumple los criterios de Milán (81).

Las desventajas del TOH son la escasez de donantes y, por lo tanto, el tiempo en lista de espera, durante el cual la enfermedad puede progresar (10-20% de los casos), dejando de ser el paciente subsidiario al trasplante, y obligando a la exclusión de la lista. Para afrontar este problema, existen diferentes estrategias:

- ✓ Aumento del número de donantes: mediante la práctica del denominado “trasplante dominó” o el trasplante de donante vivo. Esta última estrategia es limitada en la práctica debido a la morbimortalidad del donante, a las complicaciones biliares y a la mayor probabilidad de recurrencia del VHC en el injerto de donante vivo.
- ✓ Tratamiento del CHC en lista de espera de trasplante: se aplica un tratamiento locorregional con quimioembolización transarterial (TACE) o ablación percutánea por radiofrecuencia, recomendados si el tiempo de espera excede los 6 meses (82).
- ✓ Sistemas de priorización: existe un sistema de priorización para el TOH, basado en la gravedad de la hepatopatía, denominado *Model for End-Stage Liver Disease* (MELD). Este sistema es un modelo matemático de predicción de la supervivencia a los 3 meses de una persona con enfermedad hepática crónica, basado en valores de bilirrubina, INR y creatinina sérica (83). Este sistema presenta mayor precisión y objetividad que la escala *Child-Pugh* (84). Va de 6 a 40. A mayor puntuación, peor pronóstico, por lo tanto mayor prioridad para recibir el órgano (84).

Existe una proporción de pacientes que se podrían beneficiar del TOH y son excluidos por no cumplir los criterios de Milán. En este tipo de pacientes, en ocasiones se da el denominado “*down-staging*”, que consiste en tratar el tumor que inicialmente excede los límites de Milán, consiguiendo una respuesta parcial, y permaneciendo dentro de los criterios de Milán al menos durante 6 meses (76). Este fenómeno indicaría la presencia de un tumor de mayor benignidad y, por lo tanto, podrían beneficiarse del TOH.

En cuanto a los tratamientos paliativos, estos pretenden detener la progresión de la enfermedad, y con ello aumentar la supervivencia. Dentro de este grupo encontramos la TACE, el único tratamiento paliativo que ha demostrado ser beneficioso en términos de supervivencia para los pacientes con CHC en estadio intermedio (82). Consiste en la embolización supraselectiva de la vascularización arterial tumoral que suele ser predominante en el CHC, junto a la aplicación de quimioterapia local. Está indicada en (11): a) CHC de gran tamaño no candidatos a cirugía (CHC en estadio intermedio o estadio B de la clasificación BCLC); b) tratamiento puente en pacientes a la espera de

un TOH; c) para reducir la estadificación del CHC y cumplir los criterios de trasplante; d) previa a la resección, para aumentar la supervivencia en pacientes con cirrosis severa.

El procedimiento debe ser lo más selectivo posible, con el fin de preservar las zonas sanas del parénquima hepático. Se inyecta un agente quimioterápico (adriamicina y cisplatino son los más frecuentes (85)) mezclado con un medio de transporte (lipiodol) que es retenido selectivamente dentro del tumor. Inmediatamente después de la administración del fármaco, se obstruye el flujo arterial con sustancias embolizantes, como el alcohol de polivinilo. Con este procedimiento se consigue una máxima concentración del fármaco en el tumor con una mínima concentración sistémica de éste, junto a una oclusión de los vasos que nutren al tumor. La tasa de respuesta radiológica que se consigue con la TACE llega hasta un 60%, y menos de un 2% de los pacientes consiguen una respuesta completa. Esto es debido a que el tejido tumoral recupera la irrigación y continúa creciendo, por lo que es necesaria la repetición de este tratamiento para conseguir beneficio (82,86,87).

En los últimos años, se ha comenzado a introducir un nuevo sistema denominado DEB (“drug eluting beads”)-TACE. Consiste en la utilización de esferas de alcohol de polivinilo cargadas de adriamicina. Esta nueva variante permite una mayor concentración junto a la liberación gradual del agente quimioterápico, disminuyendo la aparición de efectos adversos (88-90), aumentando la tolerancia y consiguiendo un mayor porcentaje de necrosis tumoral post-tratamiento (89,91), alcanzando respuestas radiológicas cercanas al 80%.

De forma más reciente, se han desarrollado otros tratamientos locorreregionales, destacando la radioembolización mediante esferas con radioisótopos como el Ytrio-90.

La quimioterapia como opción terapéutica, no ha mostrado ser eficaz, ya que el CHC parece ser poco sensible a ésta debido, probablemente, a la elevada expresión de genes resistentes (11). Además, por lo general, los pacientes son de edad avanzada que, junto a la hepatopatía de base, son poco tolerantes a las drogas quimioterápicas. Sólo el Sorafenib, un inhibidor multiquinasa de bajo peso molecular, se considera un tratamiento de elección en el CHC avanzado, mostrando los mejores resultados hasta el momento (47).

La evaluación de la respuesta al tratamiento del CHC es un aspecto clave para la predicción de la supervivencia. Para ello se recomienda monitorizar al paciente a través de pruebas de imagen (TC o RM) y AFP cada 6 a 12 meses (92). La elevación de AFP puede utilizarse como marcador de recidiva.

Los criterios ampliamente utilizados para evaluar de forma objetiva la respuesta a los tratamientos oncológicos, son los denominados criterios RECIST (*Response evaluation criteria in solid tumor*). Se basa en las medidas de la lesión pre y postratamiento, para evaluar una posible persistencia o recidiva de la enfermedad. Sin embargo, estos criterios no son útiles en el CHC, ya que no tienen en cuenta la cuantía de necrosis tras los tratamientos locales, infraestimando la respuesta tumoral radiológica. En el CHC, se emplean los criterios “RECIST modificados”. En estos criterios se tiene en cuenta el tamaño de los diámetros de tumor viable antes y después del tratamiento, aproximándose más a la respuesta radiológica real (tabla 6) (93).

Tabla 6. Criterios RECIST modificados para la evaluación de la respuesta tumoral radiológica en el CHC. Adaptada de Lencioni, R. y cols., 2010 (93).

Criterios RECIST modificados	
Respuesta completa	Ausencia completa de captación de contraste en todas las lesiones diana.
Respuesta parcial	Disminución del $\geq 30\%$ en la suma de los diámetros de las lesiones diana viables, tomando como referencia la suma de los diámetros en la exploración basal de las lesiones diana.
Progresión	Aumento $\geq 20\%$ en la suma de los diámetros de las áreas con actividad tumoral de las lesiones diana tomando como referencia el diámetro menor del área de captación basal previa al tratamiento. Cualquier lesión de nueva aparición $> 10\text{mm}$ con patrón típico radiológico de CHC o con crecimiento progresivo en sucesivas exploraciones.
Enfermedad estable	Lesiones que no cumplen criterios de respuesta parcial ni de progresión.

1.2 CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

Las células tumorales circulantes (CTCs) se describieron por primera vez por Asworth en 1869 en pacientes con cáncer (94). A partir de este descubrimiento, durante mucho tiempo se creyó, que estas células eran las responsables de la progresión de la enfermedad tumoral y de la aparición de las metástasis a distancia. Pero no se pudo establecer su verdadero significado biológico debido a su escasez en número y a la inexistencia de técnicas adecuadas para su aislamiento e identificación en aquel momento.

En los últimos años se ha profundizado en la investigación de estas células tumorales (95). Gracias al desarrollo de nuevas tecnologías, se ha descubierto que las CTCs poseen alteraciones genéticas características que son típicas de células neoplásicas, y que su presencia es muy rara en sangre periférica de personas sanas (96). Estas células proceden de un carcinoma primario o metastásico y migran en el sistema circulatorio ocasionando procesos metastásicos (97). Pueden estar presentes en sangre periférica incluso antes de que el tumor sea clínicamente detectado (96). El principal destino de estas células son los ganglios linfáticos, médula ósea, sangre periférica, y finalmente órganos distantes (figura 3).

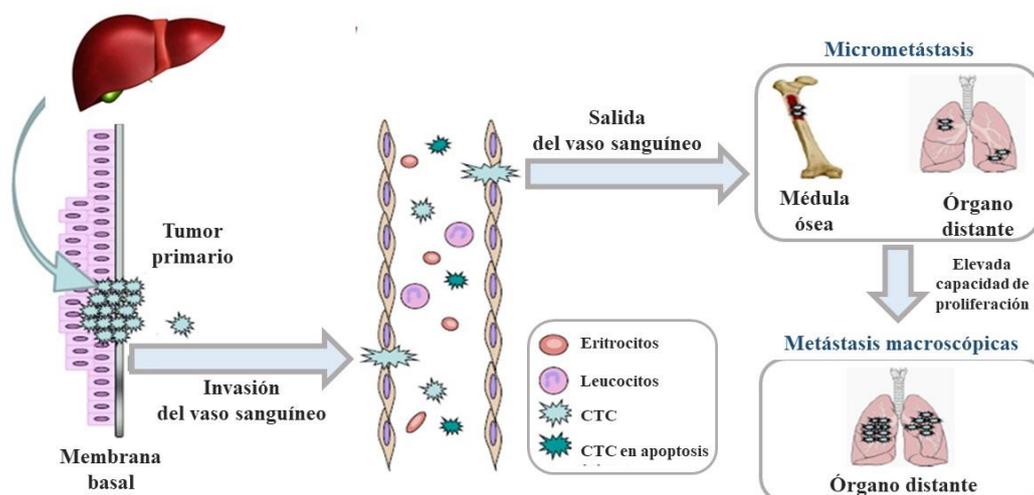


Figura 3. CTCs y su diseminación a partir del tumor primario. Las CTCs alcanzan el torrente sanguíneo siendo capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo hasta que invaden órganos distantes, dando lugar a metástasis.

Las CTCs y las micrometástasis que ocasionan, pueden permanecer en estado latente durante muchos años, incluso después de la eliminación del tumor primario, dando lugar finalmente a la aparición de metástasis (98).

La mayoría de las células cancerosas que se diseminan a partir de la lesión primaria en la circulación sanguínea son eliminadas por las células inmunitarias (97). Se estima que, diariamente, pueden desprenderse 1 millón de CTCs por cada gramo de tejido tumoral (99). No obstante, sólo 1 de cada 10^5 - 10^6 CTCs presentes en la circulación sanguínea pueden alcanzar otros tejidos, y sólo un pequeño porcentaje de éstas últimas, desarrollará metástasis (100).

Así pues, la evaluación de las CTCs no sólo nos proporcionan información sobre la biología del tumor y la diseminación de éste, sino que se consideran biomarcadores emergentes del proceso metastásico, proporcionándonos una biopsia líquida a tiempo real que podría sustituir a la biopsia tradicional (101-104). La determinación del número de CTCs y su caracterización en pacientes con cáncer promete ser de gran ayuda para identificar a pacientes con riesgo de recaídas, estratificar a los pacientes para recibir terapias adyuvantes específicas y para monitorizar el tratamiento (101-103). La disminución o desaparición de las CTCs puede indicar una respuesta favorable al tratamiento. Por el contrario, la persistencia de CTCs, puede sugerir la resistencia al tratamiento y la erradicación incompleta de las células cancerosas, aunque el tumor metastásico no haya sido clínicamente detectado.

Las CTCs se han correlacionado con parámetros tales como, la SLE y la SG, en pacientes con cáncer de mama, colorrectal y próstata metastatizante. En estudios realizados en pacientes con cáncer de mama, se observó que pacientes con <5 CTCs /7,5 mL en sangre periférica, tenían mayor SLE y SG que pacientes con >5 CTCs/7,5 mL (105,106). Los mismos resultados se obtuvieron en cáncer de próstata metastásico (107,108). En cáncer colorrectal metastásico, un valor de >3 CTCs/7,5 mL en sangre, en cualquier fase de la enfermedad, se asoció a un mal pronóstico, con SLE y SG más corta (107,109,110). La detección de CTCs ha sido demostrada, además, en otros cánceres, como en:

- Cáncer pancreático: en un estudio se detectaron niveles ≥ 1 CTC/7,5mL en aproximadamente el 50% de todos los pacientes con cáncer de páncreas (111). En otro estudio, se detectó 4 CTCs/7,5mL en un paciente con una masa pancreática que posteriormente resultó ser un carcinoma (112), por lo que se concluyó que las CTCs podrían tener un valor diagnóstico en cáncer pancreático.

- Cáncer gástrico: estudios demuestran que las tasas de recuperación de CTCs (>2 CTC/7,5mL) son mayores en pacientes con metástasis que sin metástasis (113).
- Cáncer de esófago: se ha visto que niveles de ≥ 2 CTCs/7,5mL se asocian a un mal pronóstico y a diseminación tumoral (113,114).
- Cáncer neuroendocrino: se ha visto que la detección de CTCs se asocia con la progresión de la enfermedad tumoral (115).
- Cáncer de pulmón: Hofman y cols., asociaron niveles elevados de CTCs con una corta supervivencia (116). En otro estudio, se puso de manifiesto que los pacientes metastásicos presentaban niveles mayores de CTCs que los que no presentaban metástasis a distancia (117). Además, las CTCs parecen estar más elevadas en pacientes con cáncer de pulmón en estadios avanzados, y sus niveles parecen disminuir tras la administración del tratamiento quimioterápico (118). Dorsey y cols. (119) concluyeron que las CTCs se consideraban una “biopsia a tiempo real”, permitiendo una monitorización de la progresión tumoral, con elevado valor pronóstico de recurrencia.
- Cáncer de vejiga, entre otros. En un estudio se vio que las CTCs estaban presentes en el 100% de pacientes con enfermedad metastásica y podrían ser una importante herramienta en la monitorización del tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer de vejiga avanzado, asociándose la presencia de estas con una baja supervivencia libre de enfermedad (120).

Varios estudios han demostrado, además, que la cuantificación de CTCs en pacientes con cáncer antes de una intervención quirúrgica presenta mejor valor predictivo de recurrencia, que los niveles de CTCs tras la cirugía (113,121).

Así pues, la importancia de la detección, determinación y caracterización de las CTCs, recae en:

- o Establecer el pronóstico en tumores sólidos (en términos de SLE y SG) y vigilar la recurrencia de la enfermedad.
- o Vigilar la diseminación, la resistencia a medicamentos y qué terapias inducen muerte celular tumoral.

1.2.1 Aislamiento, detección y caracterización de CTCs

La detección de CTCs se lleva a cabo a partir de sangre periférica teniendo como ventajas la facilidad de obtención de la muestra y la posibilidad de extracción de forma reiterada.

En la última década, con el progreso de nuevas tecnologías y técnicas basadas en inmunohistoquímica, biología molecular y citometría de flujo para la detección de CTCs, ha aumentado de forma exponencial la evaluación clínica de éstas en varios tipos de tumores sólidos. No obstante, la determinación de CTCs constituye todo un desafío debido a que son extraordinariamente raras en la sangre (122), encontrándose únicamente unas pocas por cada mililitro de sangre, en comparación con los leucocitos y hematíes, que se encuentran en el orden de millones y billones respectivamente (102,103), por lo que se requieren métodos de elevada sensibilidad para su detección y aislamiento (95).

Aunque se han desarrollado en los últimos años muchas técnicas para el aislamiento, detección y caracterización de CTCs, aún no existe ninguna que sea ideal. En el proceso de aislamiento y detección de CTCs, todavía existe mucha confusión sobre la verdadera definición de CTC. Hoy en día se sabe que las CTCs son ampliamente heterogéneas, y pueden expresar una gran variedad de marcadores según el tipo histológico del tumor, o incluso ser diferentes dentro de un mismo paciente (123). Varios estudios han demostrado que las CTCs pueden presentar características fenotípicas y genotípicas diferentes a las células del tumor primario (101). Esto puede ser explicado, bien por el hecho de que las células metastásicas dentro del tumor primario, son un subtipo de células que son capaces de desprenderse fácilmente, o bien, porque las CTCs adquieren nuevas mutaciones durante su circulación, independientemente del tumor primario de origen (124). Así que, no existe un único parámetro (como el tamaño, citomorfología, tinción patológica para marcadores tipo proteínas, ARN o ADN), que sea suficiente para definir la verdadera CTC. Además, algunos tipos de CTCs pueden no ser detectadas por la pérdida de marcadores, como la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), citoqueratinas (CKs), o debido a la pérdida de éstas durante el proceso de diseminación (123,125). En el estudio de Coumans y cols., se mostró cómo definiciones diferentes de CTCs resultaban en contajes diferentes con variaciones importantes en la clínica (126). Por lo que

actualmente no existe un método “gold estándar” para determinar el número de CTCs (123).

Hay varios parámetros clave dignos de consideración a la hora de diseñar un método para aislar CTCs: (a) especificidad, (b) sensibilidad, (c) pureza, (d) viabilidad, y (e) rendimiento. Todos los ensayos posteriores, tales como el análisis genómico, molecular y el cultivo para la prueba de fármacos *in vitro*, dependerán de estos factores.

Debido a su escaso número (se estima 1 CTC por cada 10^6 - 10^7 células mononucleares), las técnicas actuales utilizadas para detectar CTCs en pacientes con cáncer, utilizan un primer paso de enriquecimiento pre-analítico que consiste en propiedades físico-químicas (densidad, tamaño, viscosidad, carga eléctrica) y biológicas (expresión de proteínas de superficie, viabilidad) de las CTCs, seguido de un paso de detección celular. La mayoría de técnicas de enriquecimiento se basan en anticuerpos unidos a partículas magnéticas dirigidos contra EpCAM. En la detección de CTCs puede usarse métodos directos basados en anticuerpos, tales como inmunocitoquímica y la citometría de flujo (*fluorescence-activated cell sorting* o FACS), o mediante métodos indirectos basados en la detección de ácidos nucleicos (127).

1.2.1.1 Sistemas de enriquecimiento e identificación de CTCs

- *Gradiente de densidad*: las diferentes poblaciones celulares sanguíneas son separadas en función de sus densidades en un gradiente (122,128,129), tras centrifugación. Pueden usarse distintos medios de gradiente (CICs, sacarosa, etc.) Los eritrocitos, neutrófilos, plaquetas y células mononucleadas (linfocitos, monocitos, células epiteliales y tumorales), se disponen en distintas capas en el tubo, de manera que aquellas células que tienen mayor densidad que el gradiente quedan en el fondo del tubo, las que tienen igual densidad quedan en el medio y las de menor densidad, como las CTCs, quedan en la parte superior formando un anillo. Con esta técnica se alcanzan tasas de recuperación entre el 70-90% (130,131). Ejemplos de gradientes comerciales son el tubo Ficoll o Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bioscience, Amersham Biosciences AB) o Lymphopred (Nicomed) para separar las células de la serie roja del resto, incluyendo las CTCs. Otro, el sistema OncoQuick (Greiner BioOne, Frickenhausen, Germany),

lleva un tampón específico para el aislamiento de CTCs, tras la centrifugación (131-134) (figura 4).

Estos métodos a pesar de ser caros, son muy rápidos y se usan principalmente en los laboratorios de rutina. Como inconvenientes de los gradientes de densidad, destacan la baja sensibilidad, la contaminación con otras células y pérdida de CTCs. Sin embargo, pueden ser buenos métodos de pre-enriquecimiento previos a otras técnicas más específicas.

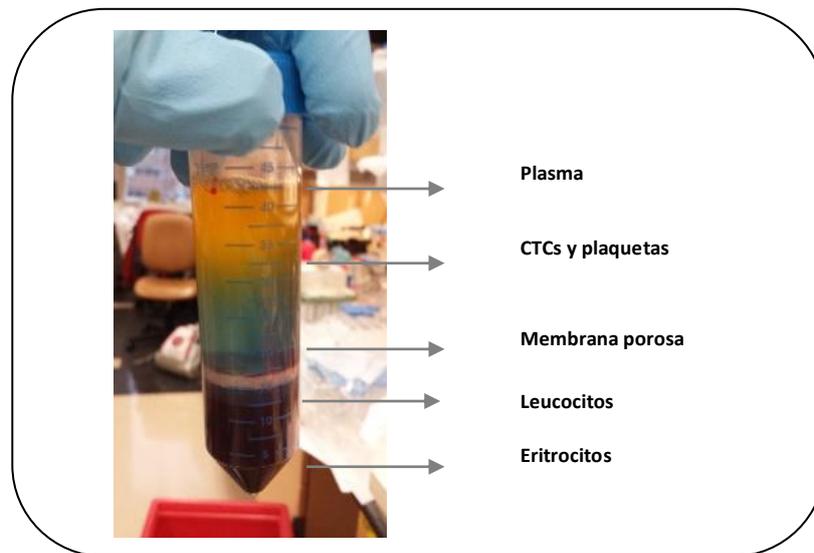


Figura 4. Tubo de OncoQuick tras la centrifugación.

- *Filtro ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumour Cells) (Metagenex, Paris, France):* se basa en un dispositivo microfiltro (membrana de policarbonato) donde se capturan las CTCs en base a su tamaño, basándose en el hecho de que la célula tumoral es mucho más grande que el resto de células sanguíneas ($>10 \mu\text{m}$) (135). Las ventajas de este método de aislamiento son que es una técnica rápida, con buena sensibilidad, que mantiene la célula intacta, crucial para una purificación posterior, así como para el análisis morfológico y molecular de CTCs. Las principales desventajas son la baja especificidad (hay leucocitos que quedan retenidos), pérdida de CTCs y el coste. De igual manera que los gradientes de densidad, puede ser un buen método de pre-enriquecimiento previo a otras técnicas más específicas.

- *Citocentrifugación:* fue diseñada para fluidos hipocelulares. Presenta revoluciones a bajas velocidades y tiene una aceleración y deceleración más gradual que las centrifugas normales. Como ventajas podemos destacar que es un método rápido y asequible. Permite la identificación de las CTCs posteriormente por otros métodos, depositando una capa fina de células en un frotis de fácil evaluación preservando la morfología celular. Por medio de un software de análisis de imagen se estudia y registra los campos donde mayores células anormales hay. Respecto a las desventajas, es un método que incrementa la muerte de las células a estudio.
- *Tampón de lisis:* cada tipo celular posee una presión osmótica diferente debido a su estructura y contenido. Con este método se trata a las muestras con tampones que pueden ser hipo o hiperosmóticos para cualquier célula distinta a la que nos interesa aislar, provocando su lisis. Tras la lisis, se centrifuga la muestra y los precipitados contendrán las CTCs. El siguiente paso podría ser la extracción del ADN o ARN de las CTCs o la purificación y enriquecimiento mediante partículas inmunomagnéticas. Sin embargo, los métodos que usan tampones de lisis pueden producir la muerte de muchas células, incluyendo a las CTCs, no siendo apropiado en muestras con un número bajo de CTCs, pudiendo dar lugar a falsos negativos.
- *Dielectroforesis:* aislamiento de CTCs de acuerdo a sus propiedades dieléctricas, que dependerán de su tamaño y las propiedades de su membrana, en un campo eléctrico no homogéneo (136).
- *Inmunomagnetismo:* selección de CTCs por partículas inmunomagnéticas (ferrofluido) y posterior tinción con reactivos inmunofluorescentes. Permite una identificación y cuantificación de CTCs procedentes de tumores epiteliales de manera fiable y reproducible. Esto sugiere la utilidad de su aplicación en el seguimiento y terapéutica.
- *Citometría de flujo:* la tecnología FACS permite el análisis simultáneo de varias características tanto físicas como químicas de las células en suspensión,

mediante el empleo de un sistema óptico-electrónico. Esta técnica detecta la capacidad que tiene la célula para desviar la luz del láser incidente y emitir fluorescencia. Además, detecta moléculas específicas de las CTCs mediante el uso de anticuerpos que reconocen marcadores intra y extracelulares. La ventaja de este sistema es que las células permanecen morfológicamente intactas permitiendo su tipificación posterior (137), sin embargo, debido al escaso número de CTCs en sangre total, únicamente se considera una herramienta útil para su aislamiento empleando marcadores específicos, si previamente se ha hecho un pre-enriquecimiento (138,139), aunque su aplicación en tumores epiteliales sólidos no está estandarizada.

- *Tecnología “Epithelial Immunospot” o EpiSpot*: es un método funcional para el conteo de CTCs, basado en la inmunodetección de moléculas secretadas por CTCs viables en cultivo durante 24-48 horas (140,141). Se consigue un perfil de proteínas específicas secretadas por las CTCs identificándolas y cuantificándolas enzimáticamente. Las células que no secretan cantidades adecuadas de proteínas específicas no son detectadas. Es una técnica que podría proporcionar información sobre el perfil proteico secretor de las CTCs en el contexto de la formación de metástasis.
- *CTC-chip*: fue desarrollado en 2007 para la detección de CTCs en sangre (138,142) y consiste en un microchip con alrededor de 80.000 puntos detectores microscópicos, cargados de anticuerpos dirigidos frente a CTCs de origen epitelial. Esta técnica permite detectar y cuantificar células tumorales con una sensibilidad de una entre mil millones. Las CTCs capturadas se visualizan mediante tinción con anticuerpos contra CKs o marcadores específicos de tejido. Para la enumeración de CTCs, todo el dispositivo se visualiza en múltiples planos utilizando un sistema de imágenes semiautomático. El microchip es capaz de identificar diferentes tumores, dependiendo del anticuerpo empleado. Permite un seguimiento en tiempo real de la respuesta a las terapias quimioterapéuticas, con una fiabilidad del 99%.
- *FAST (Fiber-optic array scanning technology)*: método citométrico que emplea marcadores de inmunohistoquímica para la detección de CTCs. Las células son

captadas a través del FAST y posteriormente se observan con el microscopio de fluorescencia. Con esta técnica se evalúa pleomorfismo, enfocada a estudiar las características citomorfológicas de las CTCs de tumores sólidos.

- *Métodos Indirectos Moleculares:* los ensayos de ácidos nucleicos con multimarcadores moleculares, se consideran los más sensibles y específicos, a pesar de no poder observar la morfología celular. Los más empleados son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y algunas variaciones de la misma (tabla 7).

El ADN circulante tumoral (ADNct) se define como material genético liberado por las células apoptóticas al torrente sanguíneo en forma de fragmentos de pequeño tamaño, y este proceso implica la fragmentación del ADN. Se ha visto que el ADNct está presente, frecuentemente, en pacientes sin CTCs detectables, lo que sugiere que estos dos biomarcadores son entidades distintas (143).

La PCR tradicional a partir de ADNct se emplea para la identificación y la caracterización de las CTCs. Para ello, se buscan mutaciones en oncogenes o genes supresores de tumor, presentes en estas células. Sin embargo, como principal inconveniente está la gran variabilidad genética entre diferentes tipos histológicos de tumor (144), además de la baja especificidad de la técnica, ya que no se sabe si el ADN libre que es amplificado proviene de las CTCs o de tumores primarios, metastásicos o de tejido no tumoral.

Así pues, la técnica más empleada para la detección de ADNct es la PCR digital (figura 5). Ésta permite una cuantificación absoluta y es más precisa y sensible. La PCR digital lleva a cabo una sola reacción dentro de una muestra, sin embargo, la muestra se separa en un gran número de particiones, donde se lleva a cabo la reacción de PCR a tiempo real de forma individual. Una parte de estas reacciones contienen la molécula diana, con la secuencia mutada (positivo), mientras que otras no la tienen (negativo). Tras el análisis de PCR, la fracción de respuestas negativas se utiliza para generar una respuesta absoluta para el número exacto de moléculas diana en la muestra, sin referencia a estándares o controles internos. Esta separación permite una colección más fiable y una medición más sensible de las cantidades de los ácidos nucleicos. Este método ha sido demostrado como útil para el estudio de las variaciones en las secuencias de genes, como las variantes en el número de copias y las mutaciones puntuales.

Otras variantes de PCR, son la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) que detecta en la circulación sanguínea pequeñas cantidades de moléculas de ARNm específicas de ciertas proteínas que sólo se expresan por las células tumorales del carcinoma (122,145). Además, también puede ser empleada tras el aislamiento previo de CTCs. Éste fenómeno, demuestra que la célula tumoral está presente en sangre, y que tiene activa su maquinaria de transcripción, por lo que está capacitada para la invasión (146). Sin embargo, el principal inconveniente de la RT-PCR es la detección de falsos positivos (144). Por lo que no es una técnica reproducible ni validada. Además, existe controversia acerca de su aplicación en la predicción del pronóstico y respuesta terapéutica. Tanto con el uso de la RT-PCR anidada (*nested* RT-PCR) y de la RT-PCR a tiempo real se consigue aumentar la sensibilidad. Mediante la RT-PCR a tiempo real la sensibilidad alcanzada es la de 1 CTC entre 10^6 células nucleadas de sangre periférica, siendo el mejor método para la detección de recaídas vía sanguínea (147-149).

Tabla 7. Métodos de detección de CTCs basados en ensayos de ácidos nucleicos.

Técnica	Volumen de muestra	Principio	Ventajas	Inconvenientes
PCR	5-10 mL	ADN	Alta sensibilidad Fase de enriquecimiento preanalítica corta	Baja especificidad No análisis morfológico
RT-PCR	5-10 mL	ARN	Alta sensibilidad Detección de CTCs viables	No análisis morfológico
<i>Nested</i> RT-PCR	5-10 mL	ARN	Sensibilidad muy alta Detección de CTCs viables	No análisis morfológico
RT-PCR a tiempo real	5-10 mL	ARN	Sensibilidad muy alta Detección de CTCs viables Cuantificación celular	No análisis morfológico
RT-PCR a tiempo real multimarcaador	5-10 mL	ARN	Alta sensibilidad y especificidad Detección de CTCs viables Cuantificación celular	No análisis morfológico

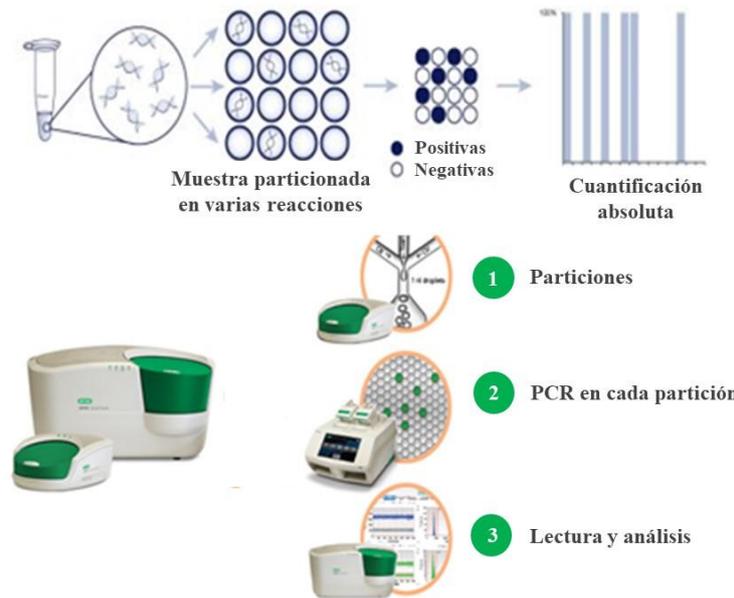


Figura 5. PCR digital para la determinación de ADN circulante. Bio-Rad Laboratories, Inc.

- *FISH (hibridación in situ fluorescente)*: empleo de moléculas fluorescentes (sondas) complementarias a las secuencias de ADN de interés de las CTCs. Posteriormente las CTCs se observan al microscopio de epifluorescencia. Este método está validado para la genotipificación de las CTCs, ya que permite evidenciar cambios citogenéticos (deleciones, translocaciones, amplificación de genes) en los cromosomas de las CTCs.

1.2.1.2 Aislamiento e identificación de CTCs por inmunomagnetismo

Es la técnica más empleada para la detección de CTCs en la práctica clínica. Consiste en el uso de partículas magnéticas (ferrofluido) rodeadas de una capa polimérica revestida con anticuerpos dirigidos a antígenos epiteliales de superficie tumor-específicos. Posteriormente las CTCs se separarán del resto aplicando un campo magnético (150). Este procedimiento de separación se denomina “selección positiva” (132,147,151). El marcador epitelial de superficie más empleado para la identificación de CTCs es EpCAM, glicoproteína transmembrana tipo I, presente de forma ubicua en células epiteliales y en sus tumores (102,103), descrita por primera vez en 1979 en carcinoma de colon (152). Las CTCs EpCAM+ se han correlacionado con mal

pronóstico en pacientes con diferentes cánceres en estadios tempranos y metastásicos, como el de mama, colon, próstata, CHC, entre otros (110,153-155). Generalmente, la sensibilidad del método inmunomagnético, se mejora usando anticuerpos frente al antígeno leucocitario CD45 para discriminar las CTCs de los leucocitos (“selección negativa”) (123).

Las células capturadas son identificadas y enumeradas posteriormente con un microscopio de fluorescencia, previo la tinción inmunofluorescente con anticuerpos específicos frente a CKs, CD45 y tinción fluorescente del núcleo.

Esto permite diferenciar las CTCs de los leucocitos, basándonos en la presencia de células nucleadas, con fluorescencia positiva para EpCAM y CKs, negatividad para CD45 y en sus características morfológicas (103,142,156) (figura 6).

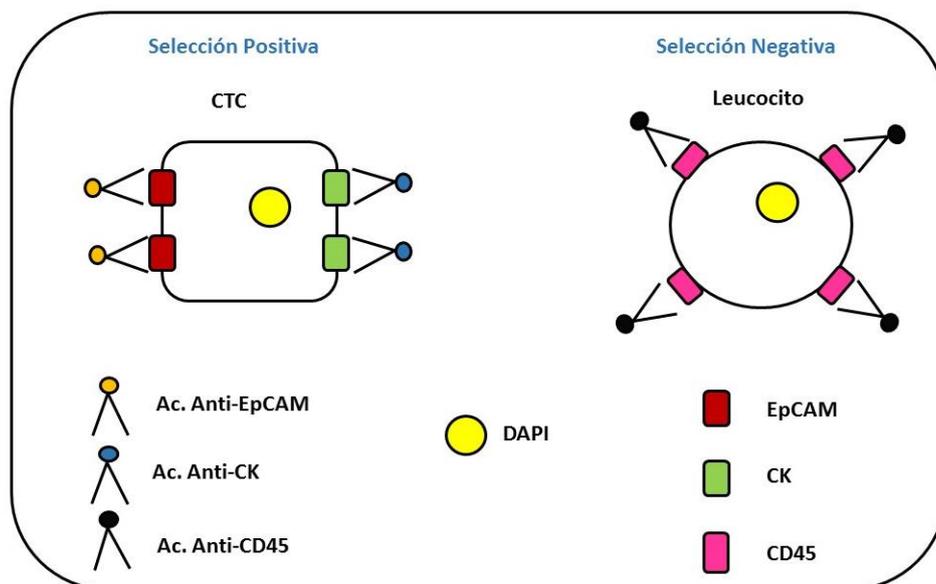


Figura 6. Esquema de la detección de CTCs (EpCAM+, CK+ y CD45-). Los leucocitos, por el contrario, son EpCAM-, CK- y CD45+.

Como ventajas de esta técnica de aislamiento de CTCs, encontramos una elevada especificidad, permite el análisis morfológico de las CTCs y posterior análisis molecular, permite la identificación de múltiples antígenos, y la cuantificación directa de CTCs. Como inconvenientes, destacamos que es un método caro, necesita de marcadores específicos y disponibilidad de anticuerpo (157).

Otra de las desventajas de las técnicas que emplean la detección inmunológica de EpCAM, es que pueden darse falsos positivos debido a la expresión de marcadores

epiteliales en células de origen no epitelial (macrófagos, células plasmáticas y precursores hematopoyéticos) y por la presencia de células epiteliales no tumorales (procedentes de una inflamación, traumas...etc.) (132-134,158,159). Además, puede darse la pérdida de expresión del antígeno de superficie EpCAM antes de que las CTCs adquieran la capacidad de entrar en el torrente sanguíneo, un proceso denominado EMT o “Transición Epitelial Mesenquimal” (160), por lo que las CTCs de origen epitelial no siempre son EpCAM+ y la captura de CTCs con anticuerpos anti-EpCAM podría no reconocer una parte significativa de éstas (161).

Diferentes métodos han sido desarrollados y comercializados para el aislamiento de las CTCs basados en la detección de la molécula EpCAM. Uno de ellos, es el sistema semiautomático CellSearch[®] (Menarini Silicon Biosystems). El sistema CellSearch[®], es el único método aprobado por la Agencia Gubernamental de control de alimentos y medicamentos de los EE.UU (FDA) para analizar CTCs en pacientes con cáncer de mama, colon y próstata (123,156,162), capaz de detectar en sangre periférica 1 CTC por cada 10^5 - 10^7 células mononucleares por inmunomagnetismo (163). Este sistema de detección de CTCs es simple, no invasivo y ha demostrado tener utilidad como complemento a las técnicas de imagen para establecer el pronóstico y monitorización del tratamiento en pacientes con diferentes cánceres (164,165). En 2004, Cristofanilli y cols., aislaron CTCs EpCAM+ a través de este método en pacientes con cáncer de mama, suponiendo un gran impacto en el pronóstico y en el manejo de la enfermedad (166). Estos autores, no encontraron valores ≥ 2 CTCs/7,5 mL en pacientes sanas ni en pacientes con enfermedades de mama benignas. Además, en el estudio llevado a cabo por Andreopoulou y cols. en pacientes con cáncer de mama metastásico, el sistema CellSearch[®], mostró una sensibilidad equivalente al sistema molecular AdnaGen AG (Langenhagen, Germany), basado en la detección de CTCs por RT-PCR, con una concordancia del 73% y del 69% para puntos de corte de ≥ 2 y ≥ 5 CTCs/7,5mL, respectivamente (167).

Un nuevo mecanismo inmunomagnético, el sistema Isoflux[®] (Fluxion Biosciences Inc, South San Francisco, CA), técnica automatizada, estandarizada y reproducible, permite una recuperación prácticamente completa de las CTCs intactas (168). Varios estudios han demostrado que este nuevo sistema presenta una mayor sensibilidad en la recuperación de CTCs, con tasas de recuperación de CTCs significativamente superiores a las del sistema CellSearch[®] (168,169), debido posiblemente, a que el

sistema Isoflux[®] consigue un flujo más uniforme de la muestra y una fuerza magnética más potente dentro del cartucho de aislamiento (169).

Con esta técnica, se puede llevar a cabo la determinación de CTCs en sangre periférica en cualquier momento de la enfermedad tumoral permitiendo establecer el pronóstico y predecir la supervivencia. Además, nos permite realizar el seguimiento de estos pacientes junto con los métodos clínicos actuales.

1.2.2 Papel de las CTCs en el CHC

Pese a que los tratamientos curativos en el CHC son, como ya se ha mencionado, la resección y el trasplante hepático, se ha visto que el 40% de los pacientes con hepatectomía y más de un 10% de receptores de hígado trasplantados, presentan recurrencias dentro del primer año tras la cirugía, lo que conduce a la muerte de la mayoría de pacientes (170). Este hecho sugiere que las CTCs, son una fuente importante de metástasis y recurrencia en el CHC (135,171,172). Pero los mecanismos responsables de la recurrencia del tumor son todavía poco conocidos. Los tratamientos quirúrgicos, como la resección y el trasplante hepático, pueden incrementar la diseminación de hepatocitos y de células tumorales (173).

Varios estudios demuestran la presencia de CTCs en pacientes con CHC. En uno de ellos, realizado en ratones xenotrasplantados con CHC humano, se mostró cómo existía una liberación continua de CTCs al torrente sanguíneo (174). Estas células tumorales pueden llegar hasta órganos distantes produciendo metástasis o bien pueden retornar al nuevo hígado implantado, dando lugar a recurrencias intrahepáticas.

Además, las CTCs, determinadas por distintos métodos, entre los que se encuentran los métodos inmunomagnéticos, únicamente parecen encontrarse en enfermos de CHC, y están ausentes en pacientes con cirrosis, hepatitis crónica y en personas sanas (175-177). Este hecho confirma que las CTCs EpCAM+ tienen un origen tumoral (155).

Sun y cols., llegaron a la conclusión que la determinación de CTCs podía ser considerada como una biopsia a tiempo real en estos pacientes (178). Y es que las CTCs se han asociado a la presencia de invasión vascular (175,177), estadio y grado de diferenciación histológica tumoral, y por lo tanto a un peor pronóstico (150,177). Además, los niveles de CTCs se han asociado a niveles de AFP (175), marcador serológico más empleado para estudiar la evolución del CHC.

Por otra parte, Xu y cols., detectaron un menor recuento de CTCs en pacientes con CHC cumplidores de los criterios de Milán, que aquellos pacientes que no los cumplían (150).

Todos estos estudios, sugieren que, las CTCs parecen jugar un importante papel en la metástasis del CHC. Su detección podría tener una implicación clínica útil para el diagnóstico, estadificación del cáncer, selección de los posibles candidatos a trasplante y establecer un pronóstico tras el tratamiento. Además, podrían suponer una nueva diana terapéutica para prevenir el proceso metastásico.

En pacientes trasplantados, uno de los lugares más comunes donde vuelve aparecer un tumor es en el aloinjerto trasplantado (170). Este fenómeno, denominado auto-siembra del tumor o “*self-seeding*” (179), probablemente se deba al retorno de CTCs sobrevivientes del torrente sanguíneo, debido a que los tumores presentan paredes vasculares más permeables (180,181). De manera que, las CTCs no necesitarían ningún tipo de adaptación original para sobrevivir y prosperar en el microambiente del tumor original. Kim y cols., evidenciaron que este fenómeno de auto-siembra tumoral se daba en modelos experimentales de carcinoma de mama, colon y melanoma maligno (179). En estos modelos, los tumores introducidos eran auto-sembrados por líneas celulares metastásicas de los 3 cánceres respectivos cuando éstas eran inoculadas, demostrando, además, que las células metastásicas eran más eficientes en el proceso de migración y auto-siembra que sus poblaciones celulares tumorales parentales.

Los mecanismos por los cuales tiene lugar el proceso de auto-siembra, no se conocen exactamente, aunque existen varias hipótesis:

1. El tejido original presenta la capacidad de atraer a CTCs (179) .
2. Fugas vasculares.
3. Las CTCs poseen la capacidad innata de volver al sitio original o explantes debido a la existencia de un microambiente familiar (179,182).

La primera hipótesis es apoyada por la secreción de interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) y Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) entre otras, por parte del tejido tumoral (179) y por células inflamatorias reclutadas en el tumor (183), que actúan como quimioatrayentes, mientras que la tercera hipótesis es sugerida por la expresión de metaloproteasa-1 de matriz (MMP-1) y el componente de citoesqueleto de actina, Fascin 1, por las CTCs (179). Estas moléculas liberadas por células metastásicas, están implicadas en fenómenos de

migración, invasión vascular y angiogénesis (184-188), favoreciendo las metástasis a distancia y la resiembra de las CTCs en el sitio original.

1.2.3 Transición Epitelial Mesenquimal (EMT) y Células *Stem Cell* Circulantes (CSCs)

Durante el proceso “EMT”, las células, además de perder el marcador epitelial EpCAM, adquieren características morfológicas y fenotípicas de las células mesenquimales (161,189,190), como la expresión de vimentina, el aumento de la translocación nuclear de factores de transcripción, como SNAIL, Zeb1, SLUG y Twist (97,191) y adquieren propiedades de células madre (Stem cell o CSCs) (192,193), caracterizadas por la desdiferenciación, ganancia de motilidad e invasividad, pérdida de adhesión celular, capacidad de auto-regeneración y por ser resistentes al tratamiento quimioterápico y radioterápico. Las CSCs, aunque son escasas en número, son responsables de la oncogénesis, la progresión, la invasión y constituyen una fuente de recurrencia y metástasis (191,194). Sin embargo, las CSCs no son equivalentes a CTCs, debido al hecho de que no todas las CTCs son capaces de formar metástasis ectópica (97). Por lo tanto, sólo los CTC que forman metástasis ectópicas tienen las características de CSCs (figura 7). Se cree que únicamente cuando las CSCs son erradicadas en un tumor primario, puede detenerse la metástasis tumoral y la recurrencia, y realmente mejorar el resultado terapéutico.

Para los tumores no epiteliales que no expresan EpCAM, la búsqueda de otros marcadores característicos de CSCs, como CD24/44, CD26, CD146, vimentina, y SNAIL/SLUG, es un esfuerzo continuo (123,195,196). Entre estos marcadores, la vimentina es un filamento intermedio que se expresa en células mesenquimales, mientras que SNAIL y SLUG son factores de transcripción que controlan el proceso “EMT”, y existen tanto en el citoplasma como en los núcleos, por ello pueden no ser moléculas de superficie adecuados para el aislamiento.

Algunos estudios han demostrado que los marcadores de CSCs son frecuentemente sobreexpresados en CTCs de cáncer de mama metastásico (197). En el CHC, varios estudios han demostrado la existencia de CSCs (128,191,198-200), y las CTCs pueden ser una subclase o derivación de las CSCs (97).

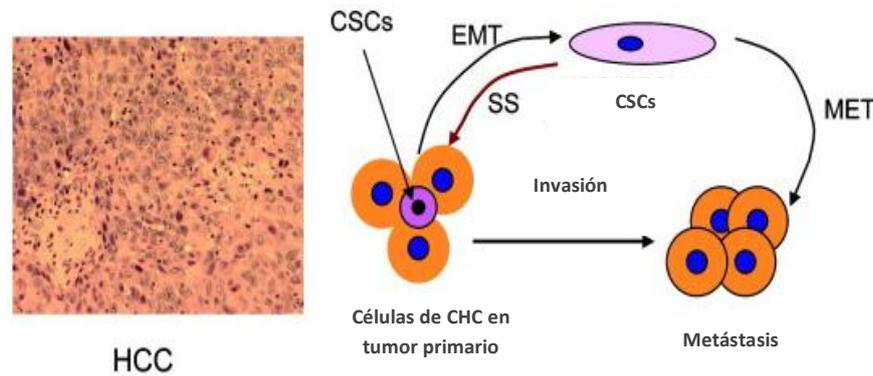


Figura 7. Ilustración esquemática de CTCs y CSCs en CHC. Las CSCs son capaces de originar metástasis a distancia y recidiva local. CHC: hepatocarcinoma; CSCs: células madre o Stem cell; CTCs: células tumorales circulantes; EMT: transición epitelial mesenquimal; MET: transición mesenquimal-epitelial; SS: “self-seeding”.

En el hígado sano, la mayoría de hepatocitos no expresan EpCAM, sólo las células de los conductos biliares son EpCAM+. Varios estudios demuestran que EpCAM se expresa aproximadamente entre el 35-60% de los casos de CHC (201-205). Acorde a estos resultados, podríamos pensar que las técnicas de aislamiento de CTCs de CHC basadas en la detección de la molécula EpCAM podrían no ser apropiadas. Sin embargo, curiosamente, se ha visto que EpCAM es un marcador potencial de CSCs hepáticas (206), al contrario de lo que ocurre en otros tipos de cánceres epiteliales (207), en los que se da el proceso “EMT”. Estas CSCs hepáticas EpCAM+, con características de células progenitoras *StemCell*, son más invasivas y tumorigénicas, tal y como se demostró en el estudio de Yamashita y cols. (206). Además se caracterizan por ser altamente resistentes al tratamiento quimioterápico y radioterápico (208), y están asociadas a la aparición de metástasis (209). En 2013, Sun y cols., observaron que las CTCs EpCAM+ mostraban características de células madre, con expresión de CD133 y ABCG2, activación de la vía “Wnt- β -catenina”, acumulación de vimentina, mayor capacidad tumorigénica e inhibición de la apoptosis (178).

Así, las técnicas de aislamiento de CTCs basadas en la detección de EpCAM cobran importancia en pacientes con CHC. Estudios recientes sugieren que la función de esta molécula no se limita a la adhesión celular, sino que también está implicada en procesos de señalización, migración, proliferación y diferenciación celular (210-212), por lo que estas células EpCAM+ podrían ser las responsables de la progresión de la enfermedad post-trasplante.

A su vez, existe una gran heterogeneidad fenotípica de las CSCs (202,213,214). Se ha visto que las CSCs expresan diferentes marcadores de células madre, pero ninguno de ellos exclusivo de CSCs hepáticas.

Existen estudios que sugieren que CD13, CD133 y EpCAM son los marcadores de superficie de CSCs hepáticas (191,199,206,214).

Li y cols. en 2013, demostraron que la mayoría de CTCs aisladas de pacientes con CHC, expresaban marcadores “EMT” como Vimentina y Twist, y correlacionaban con la presencia de trombosis de la vena porta, con el estadio y el tamaño del tumor (200).

En otros estudios, se detectaron además, células circulantes CD45-CD90+ (201) y células CD45-CD90+CD44+ (128,215) en CHC, descritos previamente como marcadores potenciales de CSCs en glioblastoma y en cáncer de próstata (216,217), y que se han asociado a recurrencias de CHC tras la hepatectomía y a menores tasas de SLE (172). Uno de estos estudios, sugiere que algunas CSCs expresan CD133, ESA, CXCR4, CD24, KDR y CD44 concomitantemente con CD90 (215).

Yang y cols., encontraron que las células CD45-/CD90+ podrían ser detectadas en muestras de tumor y de sangre de todos los pacientes con CHC, mientras que eran indetectables en los tejidos del hígado o muestras de sangre del grupo control o en pacientes con cirrosis hepática (128,215).

1.3 OTROS BIOMARCADORES EN ESTUDIO EN EL CHC

La hepatocarcinogénesis es un proceso que ocurre en múltiples etapas, en las que se dan diferentes alteraciones genéticas, que conllevan una transformación de los hepatocitos.

Durante la cascada metastásica del CHC, en primer lugar, a partir del tumor primario se forman nuevos vasos sanguíneos, con el consecuente aumento del aporte de nutrientes a las células tumorales y aumento de la proliferación celular (angiogénesis). A continuación, algunas de las células neoplásicas, se desprenden de la masa tumoral e invaden la matriz extracelular subyacente al tumor, degradando los componentes de ésta (invasión). En la siguiente etapa, las células neoplásicas se introducen en los vasos sanguíneos (intravasación), donde tienen que sobrevivir y evadir al sistema inmune. En último lugar, mediante su adherencia a células endoteliales, las células tumorales se

extravasan, llegando a nuevos tejidos y órganos donde se asientan y producen micro y macrometástasis.

Los CHC son tumores heterogéneos tanto genóticamente como fenotípicamente, reflejo, en parte, de la heterogeneidad de factores causantes. El microambiente tumoral está formado por componentes del estroma, factores de crecimiento, enzimas proteolíticas, y citoquinas inflamatorias (218). Todos estos elementos juegan un importante papel en la proliferación y supervivencia celular, así como en la angiogénesis y metástasis.

Debido a la heterogeneidad del CHC, es difícil encontrar un único biomarcador con 100% de sensibilidad y especificidad. La solución para aumentar la precisión diagnóstica podría ser la combinación de diferentes biomarcadores.

Hoy en día, existe una gran variedad de biomarcadores que están orientados a complementar o a sustituir a AFP, para mejorar la sensibilidad y la especificidad en el diagnóstico del CHC. La AFP se considera el biomarcador más utilizado en la monitorización de los pacientes con CHC (219). No obstante, la baja sensibilidad y especificidad de ésta, limita su uso clínico. Para mejorar el diagnóstico de CHC, se recomienda el uso combinado de AFP con otros biomarcadores, tal y como demuestran algunos estudios (220-222). Actualmente existen varios marcadores que se consideran efectivos para la detección temprana del CHC (50), así como para establecer su pronóstico y estadificación de la enfermedad tumoral (223).

1.3.1 Metaloproteasas de matriz (MMPs)

Las MMPs, descubiertas por primera vez en 1962 (224), son una familia de endopeptidasas dependientes de calcio y de zinc (225,226). Presentan un papel crucial en diversos procesos fisiológicos, incluyendo la remodelación de tejidos y desarrollo de órganos (227), la regulación de procesos inflamatorios (228) y presentan una participación compleja en el proceso metastásico (184). Favorecen la proliferación y diferenciación celular, apoptosis, migración celular, angiogénesis y la evasión de la respuesta inmune, a través de la proteólisis de los componentes de la matriz extracelular (ME), favoreciendo así la movilidad de las células neoplásicas a través de la matriz modificada (229,230).

Existen 23 variantes en humanos, clasificadas según el sustrato que degradan (colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas y MMPs asociadas a membrana). Son sintetizadas como preproenzimas, con un péptido señal aminoterminal que interactúa con el zinc del sitio catalítico, manteniendo a la enzima inactiva (figura 8). La pérdida de este péptido durante la traducción, permite un cambio conformacional y la activación completa de la proteína (231). Los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) regulan la actividad de estas enzimas (232,233), inhibiendo o favoreciendo su activación. Así pues, la actividad de las MMPs puede regularse a varios niveles: a nivel de su expresión génica, a nivel de la conversión de zimógeno a enzima activa y, finalmente, con la presencia de inhibidores específicos. Esta regulación compleja de la actividad de MMPs es necesaria, dado que la actividad proteolítica descontrolada conduciría al daño tisular y a la perpetuación de la respuesta inflamatoria en enfermedades inflamatorias crónicas y cáncer (228).

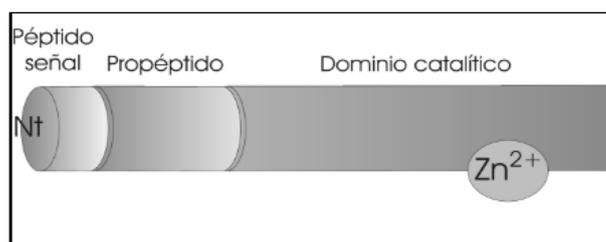


Figura 8. Estructura básica de MMPs.

La expresión de las MMPs está asociada con varias etapas específicas durante la progresión del cáncer:

- Etapas de invasión del tumor: las MMPs presentan actividad proteolítica de la ME. Son secretadas por células neoplásicas y por células del estroma en la zona de invasión del tumor (234). La unión de las MMPs con TIMPs y con diferentes integrinas en la zona de invasión, permiten su activación (235-238).
- Etapas de angiogénesis: las MMPs propician el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos al degradar los componentes de la ME. La degradación de los diferentes sustratos por las MMPs, originan la liberación, la activación o la generación de distintas moléculas inductoras de la angiogénesis (239), como el VEGF. Éste, estimula el crecimiento, la migración y la supervivencia de las células endoteliales, aumenta la permeabilidad vascular, e induce la

movilización de las células precursoras de las células endoteliales desde médula ósea hasta la circulación (240). La biodisponibilidad de VEGF por las MMPs también puede afectar a la linfangiogénesis (241), aunque se necesitan estudios futuros para aclarar las vías específicas por las que las MMPs regulan este proceso.

Se atribuye un papel especial a las MMPs suministrada por neutrófilos. Estas pueden activar la vía del Factor básico de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) (242), adquiriendo un papel importante los efectos pro-angiogénicos desencadenados por neutrófilos que infiltran tumores.

- Etapa de apoptosis: existen algunas MMPs que protegen a las células neoplásicas, inhibiendo la apoptosis de estas (243). Por otro lado, las MMPs pueden activar la apoptosis, activando proteolíticamente al Factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el cual tiene efecto supresor de tumor. Sin embargo, a medida que el tumor avanza en la progresión maligna, el genoma a menudo acumula mutaciones en el sistema del receptor TGF- β que hacen que las células cancerosas no respondan a TGF- β , por lo que la activación proteolítica de TGF- β por MMPs puede tener efectos promotores de tumores (244). También se ha visto que las MMPs pueden bloquear la apoptosis transmitida por receptor separando el ligando Fas de la superficie de las células cancerosas (245).
- Etapa de intravasación: la entrada al torrente sanguíneo de las células tumorales, es un paso limitante en el proceso de metástasis. De hecho, no todas las células tumorales son capaces de formar metástasis. Las que no son capaces, entran en apoptosis en el intento de entrar en la circulación (246). Las MMPs participan en la degradación de la membrana basal del endotelio, para permitir el paso de las células (247).
- Etapa de supervivencia en la circulación: las células tumorales pueden viajar en la sangre, solas o formando agregados con células endoteliales o con plaquetas. Se ha visto que la unión con estas últimas depende de las MMPs (243), aumentando su supervivencia. Además, las MMPs presentan un efecto inmunosupresor, inhibiendo la proliferación de las células T y la acción citotóxica de las células NK (248,249), aumentando su supervivencia al evadir la respuesta inmune.

- Etapa de extravasación: las células tumorales atraviesan las células del endotelio y membrana basal, mediante su unión específica a selectinas e integrinas. Las MMPs son responsables de un aumento de la permeabilidad vascular a través de su acción sobre VEGF (250,251). Existen estudios que demuestran que las MMPs en este caso, son secretadas por neutrófilos y macrófagos provenientes de la respuesta inmune que acompaña a la progresión del cáncer (243).
- Etapa de establecimiento de la colonia metastásica: las MMPs participan en la creación de un microambiente donde las células neoplásicas, una vez que salen del torrente sanguíneo, pueden permanecer como células solitarias, proliferar como micrometástasis o metástasis macroscópicas (252).

La sobreexpresión de varias MMPs, da lugar a la formación de carcinoma (184). Este hecho fue demostrado en un experimento realizado en células epiteliales mamarias cultivadas, donde se mostró que la sobreexpresión de MMPs, provocaba el proceso “EMT” e inducía inestabilidad genómica en estas células, conduciendo a la progresión neoplásica, transformación maligna y a la aparición de carcinomas mamarios en ratones transgénicos (253,254).

1.3.1.1 Metaloproteasa-1 (MMP-1)

La MMP-1 (también denominada Colagenasa Intersticial-1), es la más ubicua de todas las MMPs (255). Es una proteína transmembrana cuya función es la de regular la remodelación y desarrollo de tejidos, manteniendo la homeostasis de la ME (256,257). En condiciones normales, se encuentra reprimida por TIMP-1 (258,259).

MMP-1 está expresada en varios tipos de células como los macrófagos, células epiteliales y en diferentes tipos de cánceres (260). Huntington y cols., encontraron que la activación de la vía Ras/Raf/MEK/ERK por la sobreexpresión de MMP-1, podría ser la causa de la aparición de cáncer (261). MMP-1, favorece el proceso metastásico, a través de la degradación de los componentes de la ME (262-264), concretamente, se ha visto que está involucrada en el proceso de intravasación (265). Además, la expresión aumentada de MMP-1 está relacionada con la invasión linfática y las metástasis de los ganglios linfáticos (266).

La sobreexpresión de esta proteína se ha visto en varios tipos de tumores como el cáncer colorrectal, esofágico y gástrico, asociándose a un mal pronóstico en estos

pacientes (267-271). Así también, se ha evidenciado en otros tumores sólidos como el cáncer de mama, ovario, y oral (272-275).

Chen y cols., en 2016, establecieron que MMP-1 era un marcador útil para establecer el pronóstico en el carcinoma de esófago, considerándolo como un factor predictor independiente de supervivencia (276). En este estudio se vio que los pacientes con cáncer de esófago presentaban niveles plasmáticos de MMP-1 superiores a los controles sanos. Además, valores elevados, suponían un mayor riesgo de cáncer y menor supervivencia.

MMP-1 es una enzima versátil que contribuye a la invasión y la metástasis a través de numerosos mecanismos (184). MMP-1 inicia la degradación del colágeno tipo I, el cual es muy abundante en la ME y es esencial para la migración de queratinocitos. Varios autores consideran que este mecanismo facilita la invasión tumoral (277).

Además, se ha visto que MMP-1 activa de forma proteolítica ciertos ligandos, dando como resultado la activación de la vía RANKL, que a su vez promueve osteólisis y metástasis en el hueso, uno de los sitios más comunes para las metástasis, conduciendo a menudo a la mortalidad (278).

MMP-1 es producida tanto por células tumorales como por células del estroma tumoral. De cualquier forma, su presencia está asociada generalmente a la zona de mayor actividad tumoral. MMP-1 derivada de células estromales, tiene un papel importante en la progresión de la tumorigénesis, llevada a cabo por transducción de señal específica sobre células cancerosas. MMP-1 parece estar implicada en la escisión de PAR-1, un receptor activado por proteinasas, acoplado a una proteína G. La expresión de PAR-1 se incrementa en un número de cánceres incluyendo mama, colon y pulmón. Este hecho puede afectar a la invasión tumoral induciendo la migración de células cancerígenas tras la escisión proteolítica de este receptor (273,277).

1.3.1.2 MMP-1 en CHC

En la literatura, se ha descrito la MMP-1 junto con la MMP-2, -9 y -13 y sus reguladores TIMP-1 y -2, como proteínas involucradas en los procesos de fibrosis hepática (279-281). Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre la contribución de la MMP-1 en el proceso de carcinogénesis del CHC, y sus resultados son controvertidos.

Algunos estudios han puesto de manifiesto una elevada expresión génica de estas proteasas en líneas celulares tumorales de hígado y en tejidos con CHC, estando ausente en tejidos sanos (277,282).

Ip y cols., en 2005, demostraron en ratones inmunodeprimidos implantados con células de CHC transfectadas con el gen de MMP-1, que un aumento en la expresión génica de MMP-1 promovía la tumorigenicidad y metástasis intrahepáticas con aumento del crecimiento tumoral y de la capacidad de invasión. Además, la sobreexpresión de MMP-1, producía un aumento de la supervivencia celular, protegiendo a las células malignas de la apoptosis (283).

Estudios posteriores, demostraron que la sobreexpresión tisular de MMP-1 en pacientes con CHC, se asociaba a la presencia de invasión, a una mayor capacidad metastásica de las células tumorales, a una corta supervivencia y, por lo tanto, a un mal pronóstico de estos pacientes (277,284).

Todos estos estudios nos sugieren que, MMP-1 podría ser un nuevo marcador útil para la detección de recurrencia y metástasis en el CHC.

1.3.2 Glipicano-3 (GPC3)

GPC3, aislado por primera vez por Filmus y cols. en 1988 en una línea celular de intestino de rata (285), es un proteoglicano de heparán-sulfato ligado a la membrana a través de un anclaje de glicosil-fosfatidilinositol (286,287) (figura 9). Durante el desarrollo fetal, GPC3 puede encontrarse en hígado, pulmones y riñones. En tejidos adultos, se pueden encontrar pequeñas trazas en riñón mientras que es indetectable en el hígado adulto (288,289) y en el resto de tejidos. Sin embargo, se ha visto que GPC3 puede expresarse en algún tipo de neoplasias, como en cáncer de mama, hígado, tiroides y ovario (289-292), lo que sugiere que esta proteína oncofetal puede actuar como un potente biomarcador.

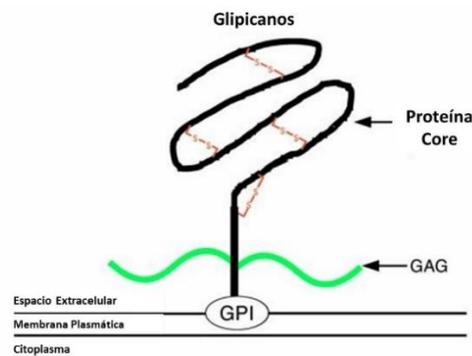


Figura 9. Esquema de GPC3. GAG: cadenas de glucosaminoglicanos; GPI: anclaje de glicosil-fosfatidilinositol. Figura modificada de Filmus y cols., 2001 (293).

Aunque se desconoce la función exacta de los glipicanos, se cree que son reguladores de la morfogénesis y del crecimiento mediante su interacción con varios factores de crecimiento (288,293). A través de sus cadenas de heparán-sulfato pueden interaccionar con los denominados “Factores de crecimiento vinculantes a la heparina”(294). Entre estos factores se incluyen, entre otros: Wnt, Factor de crecimiento de fibroblastos, Factor de Crecimiento Epidérmico de unión a heparina, Factor de Crecimiento de Hepatocitos y VEGF.

1.3.2.1 GPC3 en CHC

Varios estudios demuestran que GPC3 está sobreexpresado en CHC, en comparación con pacientes sin cáncer, en los que su expresión es insignificante (295-297). Además, se ha encontrado una estrecha correlación entre el nivel de expresión de GPC3 y una concentración elevada de AFP sérica en pacientes con CHC (295).

Es considerado un potente marcador de malignidad, con una sensibilidad del 77% y una especificidad del 96% en la detección de pequeños nódulos tumorales (<2cm). Capurro y cols. encontraron que la expresión génica de GPC3 fue mayor en tumores pequeños (<3 cm) a diferencia de AFP (289). Por lo que estos autores concluyeron que GPC3 podría ser un buen marcador en el diagnóstico temprano de CHC.

La sobreexpresión de este marcador en pacientes con CHC implica una corta supervivencia de estos pacientes (296,298,299).

Se cree que GPC3 tiene un papel directo en el desarrollo de CHC. Por un lado, GPC3 forma un complejo con “Wnt”, estimulando la vía de señalización intracelular

Wnt/ β -catenina en las células de CHC (300). Por otro lado, GPC3 puede actuar como un activador de factores de crecimiento implicados en el crecimiento invasivo del CHC (301,302). Además, un estudio muestra que el aumento en los niveles de GPC3 promueve el fenómeno “EMT” (303), implicado en el proceso metastásico y la resistencia a fármacos.

Hasta ahora, la técnica comúnmente utilizada para la detección de los niveles séricos de GPC3 es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Existen diferencias considerables entre los valores aportados por los distintos estudios, lo que puede deberse principalmente a los diferentes anticuerpos empleados que reconocen diferentes epítomos, o a las distintas formas moleculares de la molécula. Capurro y cols., a través de esta técnica, encontraron que los niveles séricos de GPC3 estaban elevados en el 53% de los pacientes con CHC, mientras que eran indetectables en individuos sanos o con hepatitis (289).

Varios estudios sugieren que los niveles séricos de GPC3 son más elevados en pacientes con CHC que en sujetos normales (304,305). Además, en aquellos pacientes sometidos a resección, se observaron valores más elevados antes de la resección, y se normalizaban tras ella. Así mismo, se asociaron los niveles séricos elevados preoperatorios de GPC3 con menor SG y SLE tras la cirugía (304).

Se han utilizado varios puntos de corte de GPC3 para correlacionar sus niveles séricos con el diagnóstico de CHC. Sin embargo, todavía no existe consenso con un punto de corte estándar que maximice la sensibilidad y la especificidad. En la actualidad, los valores de corte utilizados varían entre 3,9 pg/mL y 300 ng/mL (306), con sensibilidades y especificidades que varían entre el 36-65% y 65-100% respectivamente (287,307). No obstante, GPC3 promete ser mejor biomarcador para el diagnóstico de CHC comparado con la AFP sérica, con mejor sensibilidad y especificidad.

Se ha visto que el uso combinado de GPC3 junto a AFP, incrementa la sensibilidad de AFP del 50% hasta el 72% sin afectar a la especificidad, ya que GPC3 no se eleva en hepatopatía crónica ni en individuos sanos (289,308).

Todos estos estudios sugieren que GPC3 parece ser un marcador tumoral prometedor en CHC, así como una importante diana para el desarrollo de nuevas terapias para el CHC. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones futuras para determinar la importancia de GPC3 como un reemplazo o suplemento de la AFP en el diagnóstico de CHC.

1.3.3 Osteopontina (OPN)

La OPN o “Sialoproteína I Ósea”, es una glicoproteína rica en ácido siálico, descrita por primera vez por en 1979 (309). Aunque su localización principal es la matriz ósea, también está presente en fluidos corporales, tales como, suero, plasma, leche y orina.

La estructura molecular de la OPN humana consiste en una cadena polipeptídica, con peso molecular de 35,4 Kda, rica en aminoácidos ácidos (Aspártico y Glutámico) (310). Es miembro de la familia de las “Glicoproteínas de unión a pequeñas integrinas” (SIBLING). Es una proteína de adhesión (311), cuya función principal en hueso es unir células (osteoblastos y osteoclastos) a los minerales de la matriz ósea a través de sus dominios “RGD”(Arginina-Glicina-Aspártico) de unión a integrinas (312).

A su vez, la OPN, es una glicoproteína expresada por diferentes células y es multifuncional. Participa tanto en procesos fisiológicos normales, como en fenómenos de patogénesis de varios estados de enfermedad. Entre sus funciones, destacamos (310):

- Participa en el remodelado óseo: OPN regula la normal resorción ósea. Inhibe la cristalización inhibiendo la formación de hidroxapatita (313) e inhibe la calcificación uniendo calcio.
- Tiene un importante papel en procesos de inflamación aguda y crónica. Interviene en la inmunidad celular, regulando a las células del sistema inmune. Además, tiene función de citoquina tipo Th1, estimulando la quimiotaxis celular.
- Está altamente expresada en diferentes cánceres. OPN participa en procesos de invasión tumoral y metástasis.
- Aumenta en placas ateroscleróticas arteriales (314).
- OPN es un marcador de enfermedad coronaria: aumenta en casos de estenosis valvular, infarto agudo de miocardio y artritis reumática. Presenta efectos anticalcificantes, evitando la mineralización patológica cardiovascular (315).
- Presenta una importante función en la reparación de tejidos, estimulando la proliferación celular y la fibrosis.
- Aumenta su concentración en sobrepeso y obesidad (316).

1.3.3.1 Papel de OPN en el cáncer

Se sabe que la OPN es secretada por las células tumorales y es mediadora de la tumorigénesis y de la progresión tumoral (317,318). Se ha demostrado el aumento de concentración sérica de esta proteína en cáncer de mama, próstata, pulmón, colon, páncreas y ovario, así como en carcinomas metastásicos (319).

La presencia de OPN ha sido fuertemente correlacionada en varios tipos de tumores con el estadio tumoral, sugiriendo que tiene un importante papel en la invasión y metástasis (320).

Se considera un marcador útil en la predicción bioquímica de recurrencia, demostrándose en cáncer de próstata (321). Además, la concentración de OPN en cáncer de células no pequeñas de pulmón, correlaciona con la respuesta terapéutica y la supervivencia (322). En este estudio, los autores concluyeron que la OPN podría ser un biomarcador útil de enfermedad en los estadios iniciales de este tumor.

1.3.3.2 OPN en CHC

OPN, además de estar involucrada en numerosas enfermedades hepáticas no malignas (323-327), se ha encontrado en plasma de pacientes con CHC y se considera un marcador, mejor incluso que la AFP, para el diagnóstico temprano de CHC (328,329).

Muchos estudios han puesto de manifiesto que OPN es un potente biomarcador para distinguir CHC de otras enfermedades hepáticas como la cirrosis y enfermedades crónicas (327,330-332). En 2015, Chimparlee y cols., observaron que los valores séricos de OPN eran mayores en pacientes con CHC que en controles sanos o con enfermedad hepática crónica (333).

OPN puede ser considerado como un marcador de mal pronóstico de la enfermedad tumoral (334-336) y de recurrencia temprana tras la cirugía hepática (337,338). Duarte-Salles y cols., en 2016, corroboraron que la presencia de OPN está asociada positivamente a un mayor riesgo de CHC. Además, los autores concluyeron que OPN era un buen marcador bioquímico predictor de CHC en aquellos grupos de riesgo (339).

El mecanismo molecular mediante el cual OPN induce migración celular, invasión y metástasis en CHC, consiste en su interacción con moléculas celulares como integrinas,

CD44 y vimentina (340-342). Estas moléculas, tras su unión con OPN, estimulan el proceso “EMT” en las células de CHC. Wang y cols., mediante estudios “in vitro” e “in vivo” mostraron que la expresión génica de OPN era inducida por IL-6 (334). Ésta es una citoquina inflamatoria producida por macrófagos durante un estado de inflamación, típico tras la cirugía hepática, por lo que la IL-6 podría aumentar la metástasis de CTCs y la recurrencia del CHC post-operatoria a través de la inducción de OPN.

Varios autores concluyeron que el rendimiento diagnóstico de la OPN era similar a la AFP, con sensibilidades y especificidades para el diagnóstico de CHC muy similares, por lo que OPN puede ser considerado un buen marcador para el diagnóstico del CHC (343-345). Sin embargo, otros autores mostraron que AFP parecía ser mejor marcador para la predicción de CHC que la OPN (330). Otros estudios, mostraron que la OPN resultaba ser mejor marcador que la AFP para establecer el pronóstico de CHC (346,347).

Además, según algunos autores, la combinación de OPN y AFP era mejor que el empleo de cada uno de ellos por separado, ya que la sensibilidad y especificidad de OPN para el diagnóstico de CHC mejoraba en combinación con AFP (339,347). Otros sin embargo, concluyeron que la combinación de ambos, no parecía mejorar el modelo de predicción de CHC (330).

1.3.4 Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)

VEGF es un factor estimulador de la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis. Muchos estudios han demostrado su asociación con enfermedad avanzada y un mal pronóstico en varios cánceres.

1.3.4.1 VEGF en CHC

VEGF, presenta un importante papel en el desarrollo de CHC, promoviendo la supervivencia de las células tumorales y la angiogénesis (348,349). Se ha demostrado que los niveles de VEGF, junto a otras citoquinas inflamatorias y pro-angiogénicas, son mayores en pacientes con CHC que en pacientes sanos (350).

Se sabe que la sobreexpresión de VEGF se asocia a proliferación, trombosis portal, agresividad tumoral y se considera un factor pronóstico independiente de elevada recurrencia y mal pronóstico en CHC (351,352). Varios estudios han demostrado que valores elevados de VEGF pueden predecir un mal pronóstico tras resección hepática (353), trasplante hepático (354), ablación por radiofrecuencia (355), tratamiento con TACE (350,356,357), o tratamiento con quimioterapia (358).

Elevados niveles de VEGF, se han correlacionado con características clínicopatológicas como, la presencia de metástasis intrahepáticas y a distancia, invasión vascular y estadios avanzados de la enfermedad, pudiendo ser un marcador útil de invasividad tumoral y predictor de la supervivencia en estos pacientes (353,359-361).

1.3.4.2 Factor de Crecimiento Endotelial Vascular C (VEGF-C)

VEGF-C es miembro de las citoquinas VEGF. Esta molécula ha demostrado poseer actividades angiogénicas y linfangiogénicas. Está involucrada en el desarrollo y crecimiento del sistema vascular endotelial y a través de su receptor VEGFR3, regula las células endoteliales linfáticas, actuando así, como mitógeno de estas células.

La expresión de VEGF-C está asociada con cáncer hematológico. Actúa como un factor de supervivencia en la leucemia. Junto a la expresión de sus receptores, VEGF y VEGF-C, generan una respuesta autocrina, favoreciendo la supervivencia de las células cancerígenas y su proliferación.

Además, la expresión de VEGF-C se ha puesto de manifiesto en tumores del tracto gastrointestinal, el cual parece correlacionar con la invasión linfática por el tumor, metástasis ganglionares y una corta supervivencia. Xiang y cols., en 2009, demostraron que una elevada expresión de VEGF-C en tejidos de pacientes con CHC correlacionaba de forma positiva con metástasis ganglionar y una corta supervivencia en estos pacientes, concuyendo que VEGF-C se podía considerar como un factor de riesgo y mal pronóstico independiente en el CHC (362).

1.3.5 Interleucina 8 (IL-8)

IL-8, también conocida como CXCL8, es un pequeño péptido soluble de 8-10 KDa. Es una interleucina multifuncional perteneciente a la familia de las quimiocinas CXC y es una de las principales implicadas en la quimiotaxis de neutrófilos y en las respuestas inflamatorias. Además, se considera un potente factor angiogénico tanto “in vivo” como “in vitro” (363). Varios estudios han demostrado que la expresión de IL-8 está correlacionada con una mayor invasividad de las células tumorales, angiogénesis y metástasis en varios tumores sólidos, incluyendo el de ovario, colon, próstata y glioma (364-367).

1.3.5.1 IL-8 en CHC

Recientemente, varias investigaciones han determinado que las respuestas inflamatorias o inmunitarias que ocurren dentro del microambiente del CHC contribuyen al desarrollo general de CHC y se asocian al pronóstico después del tratamiento (368).

IL-8, está expresada tanto en los tumores como en el suero de pacientes con CHC. Akiba y cols., en 2001, demostraron que el 100% de casos de CHC expresaron IL-8. En el estudio de Welling y cols., en 2012, se mostraron niveles superiores de IL-8 en pacientes con CHC en comparación con pacientes con cirrosis. De forma semejante, en el estudio de Yahida y cols., 2013, se encontraron niveles séricos de IL-8 significativamente superiores en pacientes con CHC (con y sin cirrosis) junto a niveles disminuidos de antioxidantes, en comparación con individuos sanos (369).

Niveles elevados de esta molécula en suero, correlacionan con la progresión de la enfermedad hepática avanzada por CHC y con la aparición de metástasis a distancia (370), aunque el mecanismo no está del todo esclarecido.

IL-8 está expresada por diferentes tipos celulares: células tumorales del CHC, células endoteliales, macrófagos y, recientemente, un estudio ha puesto de manifiesto que IL-8 está expresada principalmente por las células estelares hepáticas, el principal componente celular del estroma hepático (371). Estas células se activan por células tumorales, citoquinas inflamatorias y factores derivados del tumor, y promueven la invasión del CHC mediante la secreción de factores como la IL-8 y otros (371,372). Los

macrófagos son el componente principal en el infiltrado leucocitario de tumores (373). En el estudio de Fu y cols., se demostró que los macrófagos que infiltran en el CHC son capaces de inducir “EMT” en células de CHC, a través de la producción de IL-8 (374). Ésta, promueve la migración e invasión de células tumorales, a través de la activación de la vía de señalización JAK2/STAT3/Snail (374), asociada en estudio previos esta vía al proceso “EMT” en distintos cánceres (375,376). Fernando y cols., concluyeron que IL-8 tenía un papel esencial en la adquisición de características mesenquimatosas e invasivas de las células de CHC (377).

De foma reciente, se ha demostrado que el suministro “in vitro” de fármacos anticancerosos (doxorrubicina y paclitaxel) a líneas celulares de cáncer hepático, produce un aumento de la expresión de IL-8. Como consecuencia, IL-8 produce un aumento del tamaño tumoral e induce una mayor resistencia a estos fármacos, a través de la regulación de ciertos genes de resistencia. Por otro lado, el silenciamiento del gen de la IL-8, tiene como resultado un incremento del efecto del fármaco anticancerígeno y una reducción del tamaño de CHC en modelos de ratón xenotransplantados (378).

Todos estos resultados sugieren que IL-8 está estrechamente relacionada con pobres respuestas terapéuticas y podría ser una diana terapéutica potencialmente útil, así como un indicador pronóstico en el tratamiento del CHC.

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

El CHC ya es el segundo cáncer más mortal en el mundo (1), por lo que un pronto diagnóstico y tratamiento puede bloquear la progresión tumoral y mejorar el pronóstico de estos pacientes. A pesar de que el TOH se considera el tratamiento curativo de elección, los trasplantes son escasos, debido a que están indicados únicamente en pacientes que cumplen los Criterios de Milán (77), y existe una escasez de donantes, por lo que, aumenta el tiempo en lista de espera durante el cual la enfermedad puede progresar. Además, más de un 10% de receptores de hígado, presentan recurrencias dentro del primer año tras la cirugía, lo que conduce a la muerte de la mayoría de pacientes (170). Este hecho nos sugiere que las CTCs, son una fuente importante de metástasis y recurrencia en el CHC (135,171,172), por lo que la búsqueda de nuevas estrategias es necesaria para evitar las recidivas, o poder detectarlas lo antes posible.

La utilidad clínica de la detección de las CTCs ha sido demostrada en el cáncer de mama (105,379), el cáncer colorrectal y de próstata metastásicos (380,381). Así como en el cáncer pancreático, gástrico, de vejiga y de pulmón entre otros (382-385). Pese a que se cree que la detección de dichas células en sangre periférica podría tener un gran interés con respecto a una pronta predicción de recidivas (386-388), incluso superando los resultados obtenidos con los marcadores tumorales séricos clásicos (389,390), actualmente los estudios de CTCs en pacientes con CHC son escasos, debido probablemente a la falta de métodos comerciales para la detección de células malignas de este tipo de cáncer.

Además, actualmente, el único marcador serológico empleado en el manejo del CHC es la AFP, pero su sensibilidad es limitada (36). Existe una urgente necesidad de hallar biomarcadores útiles en la detección temprana del cáncer, su estadificación, predicción de la respuesta al tratamiento y monitorización de la progresión de la enfermedad (391).

Los objetivos que planteamos a continuación podrían ser de gran utilidad en pacientes con CHC en lista de espera para trasplante, con la finalidad de poder incluir la detección de CTCs y otros biomarcadores serológicos estudiados (MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 e IL-8) como una prueba más de rutina a modo de biopsia líquida para monitorizar la respuesta al tratamiento, pudiendo interrumpir rápidamente terapias ineficaces y predecir el riesgo de enfermedad metastásica, planteando la siguiente **HIPÓTESIS DE TRABAJO:** elevadas concentraciones de CTCs y de otros biomarcadores serológicos en sangre periférica de pacientes con CHC incluidos en lista

de espera de trasplante hepático y sometidos a posterior trasplante, se asocian a la progresión tumoral y a una supervivencia libre de recidiva más corta tras la cirugía.

3. OBJETIVOS

El **OBJETIVO PRINCIPAL** de este trabajo es analizar las concentraciones de CTCs en sangre periférica, junto a otros biomarcadores, en pacientes con CHC sometidos a trasplante hepático, y establecer su relación con la progresión de la enfermedad y con la supervivencia tras el trasplante hepático, con los siguientes

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Realizar una descripción de las distintas variables: CTCs, parámetros bioquímicos (hepáticos, inflamatorios y tumorales), hematológicos y de coagulación, antes y después del trasplante, y de las variables clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el estudio.

2. Comparar los métodos CellSearch[®] e Isoflux[®], para la determinación de CTCs en pacientes con CHC candidatos a trasplante hepático.

3. Establecer la relación entre las CTCs y los distintos parámetros bioquímicos (hepáticos, inflamatorios y tumorales clásicos), hematológicos y de coagulación pre-trasplante, indicadores de progresión de enfermedad en pacientes con CHC en lista de espera de trasplante hepático.

4. Evaluar la asociación entre el número de CTCs pre-trasplante y parámetros demográficos (edad) y clínicos (tiempo de inclusión en lista de espera para el trasplante hepático y tiempo transcurrido desde el diagnóstico, número de nódulos tumorales, presencia/ausencia de invasión vascular y necrosis tumoral, etiología del CHC, número de TACEs pretrasplante, presencia/ausencia de metástasis post-trasplante, exitus post-trasplante), en pacientes con CHC.

5. Estudiar la asociación de las concentraciones de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 e IL-8, con respecto a los niveles de CTCs y marcadores tumorales clásicos del CHC, antes y después del trasplante. También con respecto a los parámetros clínicos pre-trasplante.

6. Comparar las concentraciones de CTCs y otros marcadores tumorales (AFP, MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 e IL-8) entre los pacientes pre- y post-

trasplantados. Así mismo, comparar los niveles de estos marcadores antes y después del trasplante, en pacientes con y sin invasión vascular tumoral.

7. Determinar el punto de corte del número de CTCs pre-trasplante con mejor sensibilidad y especificidad, para predecir recidiva post-trasplante, así como comparar su eficacia de predicción de recidiva, con la eficacia de predicción de la determinación de AFP y MMP-1.

8. Establecer la relación entre el número de CTCs pre-trasplante, con el Tiempo de SG y el Tiempo de SLE tras el trasplante.

9. Analizar la SG y Supervivencia Libre de Metástasis o Recidiva tras el Trasplante Hepático. Comparar las curvas de supervivencia entre grupos de pacientes con diferentes características clínicas y analíticas.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 PACIENTES Y ÁMBITO DE ESTUDIO

El estudio se ha realizado en la Unidad de Trasplantes del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia, España) y en la Unidad de Células TumORAles Circulantes del Servicio de Oncología Médica del Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (Madrid, España).

Éste ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia, España) (anexo I).

La población incluida son pacientes con el diagnóstico de CHC, dentro de los criterios de Milán, en estadio inicial A o intermedio B según el sistema de estadificación BCLC, candidatos a trasplante hepático en los que, en la mayoría, en espera del mismo, se realiza como terapia puente una quimioembolización transarterial, desde septiembre de 2014 (fecha en la que se extrajo la primera muestra del primer paciente incluido en el estudio) hasta octubre de 2017 (38 meses). En este periodo se han incluido a 31 pacientes, con edades comprendidas entre 47 y 76 años, con diagnóstico de CHC, con un total de 27 trasplantes hepáticos en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Uno de los pacientes no llegó a ser trasplantado por exclusión de la lista de espera y posterior fallecimiento, mientras que tres de los pacientes no fueron trasplantados por fallecimiento anterior al trasplante.

La tabla 8 recoge las principales características clínico-demográficas de todos los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 8. Principales características clínico-demográficas de la cohorte de estudio. (VHC: virus Hepatitis C; VHB: virus Hepatitis B; ALCH: enolismo; EHNA: esteatosis no Alcohólica; HEMO: hemocromatosis; GLUCOG: glucogenosis tipo III; CRIPTO: criptogénica; Fe: sobrecarga férrica; LOES: lesiones ocupantes de espacio; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

Sexo (n=31)	N (%)
Hombre	29 (93,5)
Mujer	2 (6,5)
Edad (n=31)	N (%)
<55 (años)	9 (29)
≥55 (años)	22 (71)
Candidatos a trasplante (n=31)	N (%)
No trasplantados	4 (13)
Sí trasplantados	27 (87)
LOES (n=31)	N (%)
Única	15 (48,4)
Múltiples	16 (51,6)
Etiología cirrosis (n=31)	N (%)
VHC	10 (32,3)
ALCH	6 (19,4)
VHC+ALCH	6 (19,4)
CRIPTO	3 (9,7)
EHNA	1 (3,2)
VHB	1 (3,2)
HEMO	1 (3,2)
VHB+VHC	1 (3,2)
VHC+ALCH+FE	1 (3,2)
GLUCOG	1 (3,2)
TACES (n=31)	N (%)
Ninguna	6 (19,4)
1 o más	25 (80,6)
Días en Lista de Espera (n=31)	
Media: 150,25±152,91	
Mediana: 99 (RI: 42-210)	

4.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se ha desarrollado un estudio analítico observacional de cohortes dinámicas prospectivas, en el que se han analizado los datos obtenidos de una cohorte de pacientes trasplantados hepáticos por CHC entre septiembre de 2014 y octubre de 2017, dentro del programa de Trasplante Hepático del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).

Se ha realizado un seguimiento de la cohorte de pacientes, siguiendo una serie temporal, con la siguiente periodicidad:

1. Muestras Pre-trasplante.
2. Muestras post-trasplante:
 - Al mes después del trasplante.
 - A los 6 meses después del trasplante.
 - Al año post-trasplante.
 - A los 2 años después del trasplante

En total 31 pacientes han sido analizados en el presente estudio, con un tiempo mediano de seguimiento de 24 meses (RI: 13-35), un tiempo mínimo de seguimiento de 2 meses y un tiempo máximo de seguimiento de 37 meses, teniendo en cuenta como fecha inicial la primera extracción sanguínea pre-trasplante de cada uno de los pacientes y la fecha final de seguimiento, la fecha de cierre de la base de datos (octubre de 2017) o en su caso, la fecha de fallecimiento.

De los 27 pacientes sometidos a trasplante, a 21 pacientes se les extrajo muestras sanguíneas hasta el año, y a 15 de ellos se les extrajo hasta los 2 años post-trasplante. A 6 pacientes de los 27 trasplantados, se les extrajo muestras hasta los 6 meses o menos tras el trasplante.

Un total de 31 muestras sanguíneas pre-trasplante, 25 muestras al mes post-trasplante, 18 muestras a los 6 meses post-trasplante, 21 muestras al año post-trasplante y 15 muestras a los 2 años post-trasplante, se recogieron en el presente estudio (tabla 9).

Tabla 9. Muestras extraídas a cada paciente incluido en el estudio.

Paciente	Pre-Trasplante	1 mes post-trasplante	6 meses post-trasplante	1 año post-trasplante	2 años post-trasplante	Exitus
1	•					♦
2	•	•	•	•	•	
3	•	•	•	•	•	
4	•	•	•			♦
5	•					♦
6	•	•		•	•	
7	•	•	•	•	•	
8	•	•	•			♦
9	•	•	•	•	•	
10	•	•	•			♦
11	•	•		•	•	
12	•	•	•	•	•	
13	•	•		•	•	
14	•	•		•	•	
15	•	•		•	•	
16	•	•	•	•		♦
17	•	•	•	•	•	
18	•	•		•	•	
19	•	•		•	•	
20	•	•	•	•		
21	•	•	•	•	•	
22	•					♦
23	•	•				
24	•	•	•	•	•	
25	•		•	•		
26	•		•	•		
27	•	•	•			
28	•	•	•	•		
29	•	•		•		
30	•					♦
31	•	•	•			♦

4.3 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

4.3.1 Criterios de Inclusión

Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes cuya edad estuviese comprendida entre 18-80 años. Candidatos a trasplante hepático con el diagnóstico de CHC cumplidores de los criterios de Milán (tumor único menor o igual a 5 centímetros o no más de 3 nódulos, no superando el mayor los 3 centímetros). El diagnóstico de CHC fue realizado de acuerdo a criterios clínicos, biológicos y radiológicos. Se estableció en base a la presencia de al menos dos exploraciones de imagen compatibles o la existencia de un diagnóstico histológico compatible. Los pacientes entraron a formar parte de la lista de espera tras haber sido evaluados en la Comisión de Trasplantes. Todos ellos o sus familiares, en caso de imposibilidad por parte del paciente, firmaron un Consentimiento Informado Específico para acceder a la lista previa al trasplante. Además, todos ellos firmaron debidamente el Consentimiento Informado Específico para formar parte del estudio (anexo II).

4.3.2 Criterios de exclusión

Se desestimaron aquellos pacientes diagnosticados de CHC fuera de los criterios de Milán, y aquellos que presentaron CHC metastásico.

4.4 MUESTREO

La selección de la muestra se realizó de forma no randomizada y consecutiva, siempre y cuando los pacientes cumplieron los criterios de inclusión anteriormente expuestos.

4.5 VARIABLES DEL ESTUDIO

4.5.1 Datos demográficos

- **Edad:** se expresó en años, en el momento de la inclusión en lista de espera para trasplante hepático.

4.5.2 Parámetros analíticos pre y post-trasplante

4.5.2.1 CTCs en sangre

- **CTCs Isoflux[®]:** niveles de Células Tumorales Circulantes en sangre periférica, medidos por el sistema Isoflux[®]. CTCs/10 mL de sangre.
- **CTCs CellSearch[®]:** niveles de Células Tumorales Circulantes en sangre periférica, medidos por el sistema CellSearch[®]. CTCs/7,5 mL de sangre.

4.5.2.2 Parámetros bioquímicos

- **Glucosa sérica:** el rango de referencia se encuentra entre 82-115 mg/dL.
- **Albúmina sérica:** el rango de referencia se encuentra entre 3,5-5,2 g/dL.
- **Ferritina sérica:** el rango de referencia se encuentra entre 30-400 ng/mL.
- **TG:** triglicéridos en suero. El rango de referencia es inferior a 150 mg/dL.
- **Colesterol total:** el rango de referencia es inferior a 190 mg/dL.
- **LDH:** lactato deshidrogenasa. El rango de referencia se encuentra entre 135-225 U/L.
- **BT:** bilirrubina total en suero. El rango de referencia se encuentra entre 0,05-1,20 mg/dL.
- **GOT:** transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) o aspartato aminotransferasa (AST). El rango de referencia se encuentra entre 5-40 U/L.

- **GPT:** transaminasa glutamicopirúvica (GPT) o alanina aminotransferasa (ALT). El rango de referencia se encuentra entre 5-41 U/L.
- **GGT:** gamma glutamil aminotrasferasa. El rango de referencia se encuentra entre 10-71 U/L.
- **ALP:** fosfatasa alcalina. El rango de referencia se encuentra entre 40-130 U/L.
- **PCR:** proteína C reactiva. El rango de referencia se encuentra entre 0-0,50 mg/dL.

4.5.2.3 Marcadores tumorales clásicos

- **AFP sérica:** alfa-fetoproteína. El rango de referencia se encuentra entre 0-11 ng/mL.
- **CEA sérico:** antígeno carcinoembrionario. El rango de referencia se encuentra entre 0-5 ng/mL.

4.5.2.4 Otros marcadores tumorales

- **GPC3 sérico:** glipicano 3, medido en ng/mL.
- **MMP-1 sérica:** metaloproteasa de Matriz 1. Medida en ng/mL.
- **VEGF-C en suero:** factor de crecimiento endotelial vascular C. Medido en ng/mL.
- **OPN plasmática:** osteopontina humana, medida en ng/mL.
- **IL-8 plasmática:** interleucina 8, medida en pg/mL.

4.5.2.5 Parámetros hematológicos

- **Plaquetas en sangre:** el rango de referencia se encuentra entre 150-350 $\times 10^3/\mu\text{L}$.
- **Leucocitos Totales en sangre:** el rango de referencia se encuentra entre 4,5-11 $\times 10^3/\mu\text{L}$.

- **RNL:** ratio Neutrófilos-Linfocitos.

4.5.2.6 Parámetros de coagulación

- **TP:** tiempo de protrombina, medido en segundos. El rango de referencia se encuentra entre 9,4-12,5 segundos.

4.5.3 **Variables clínicas**

- **Etiología cirrosis:** origen de la enfermedad hepática subyacente al CHC. Especificamos 10 etiologías diferentes: enolismo (ALCH), infección por virus Hepatitis C (VHC), infección por virus Hepatitis B (VHB), esteatosis no alcohólica (EHNA), hemocromatosis (HEMO), glucogenosis III (GLUCOG), criptogénica (CRIPTO), infección por virus Hepatitis C+B (VHC+VHB), infección por virus Hepatitis C+enolismo (VHC+ALCH), infección por virus Hepatitis C+enolismo+sobrecarga férrica (VHC+ALCH+Fe).
- **TACES:** número de quimioembolizaciones transarteriales realizadas antes del trasplante.
- **Invasión:** presencia o ausencia de invasión vascular por el tumor hepático determinada por biopsia del hígado afecto trasplantado.
- **Necrosis:** presencia o ausencia de necrosis del tejido tumoral determinada por biopsia del hígado afecto trasplantado.
- **LOES:** número de lesiones ocupantes de espacio o nódulos tumorales presentes, determinadas por biopsia del hígado afecto trasplantado, o en su defecto, por pruebas de imagen pre-trasplante.
- **Tiempo en lista:** días que el paciente está en lista de espera de trasplante hepático, desde que firma el Consentimiento Informado para ser incluido en ella, hasta la extracción de la primera muestra pre-trasplante.
- **Tiempo desde el diagnóstico:** meses transcurridos desde el diagnóstico de CHC hasta la extracción de la primera muestra pre-trasplante.
- **Éxito:** fallecimiento o supervivencia del paciente durante el periodo de estudio.

- **Metástasis/Recidiva:** presencia o ausencia de metástasis o recidiva tumoral tras el trasplante hepático, durante el periodo de estudio.
- **SG desde el diagnóstico:** supervivencia general desde el diagnóstico, medido en meses, se calcula teniendo en cuenta el periodo de tiempo comprendido entre la fecha del diagnóstico y el éxitus, si lo hubiera. Si el paciente no ha fallecido, se considera la supervivencia del paciente hasta el cierre de la base de datos.
- **SG desde el trasplante:** supervivencia general desde el trasplante, medido en meses, se calcula teniendo en cuenta el periodo de tiempo comprendido entre la fecha de realización del trasplante y la fecha del éxitus, si lo hubiera. Si el paciente no ha fallecido, se considera la supervivencia del paciente hasta el cierre de la base de datos.
- **Supervivencia Libre de Enfermedad:** medido en meses, se calcula teniendo en cuenta el período de tiempo comprendido entre la fecha de realización del trasplante y la fecha de la recidiva o metástasis, si la hubiera. Si el paciente no ha recidivado, se considera la supervivencia del paciente hasta el cierre de la base de datos.
- **Tiempo de seguimiento:** medido en meses, se calcula teniendo en cuenta el período de tiempo comprendido entre la fecha de la primera extracción y la fecha de cierre de la base de datos, o fecha de fallecimiento si lo hubiera.

4.6 RECOGIDA DE VARIABLES

Para la determinación de CTCs por el sistema Isoflux[®] se obtuvieron muestras de sangre total en tubos con ácido etilendiaminotetraacético o EDTA (BD Vacutainer[®]) de 10 mL de cada uno de los pacientes. Para la determinación de CTCs por el método CellSearch[®], se recolectó muestras de sangre total en tubos CellSave (Janssen Diagnostics, LLC) de 10 mL.

Además, a cada uno de los pacientes se les extrajo una muestra de sangre total en tubo EDTA (BD Vacutainer[®]) para la determinación de los parámetros hematológicos, una muestra de suero en tubo de suero sin anticoagulante (BD Vacutainer[®]) para la determinación de los parámetros bioquímicos y tumorales clásicos y una muestra de

coagulación en tubo de citrato sódico (BD Vacutainer®) para la determinación de los parámetros de coagulación.

También, a cada uno de los pacientes, se le extrajo un segundo tubo de suero sin anticoagulante (BD Vacutainer®) y un segundo tubo de sangre total EDTA (BD Vacutainer®), los cuales fueron centrifugados, alicuotados y congelados a -20°C, para la determinación posterior de otros marcadores tumorales de CHC en suero y plasma (figura 10).

De todos estos tubos, los destinados a la determinación de CTCs fueron los últimos en extraerse. De esta manera, descartamos la primera fracción sanguínea, evitando la presencia de células epiteliales no tumorales procedentes de la punción, que podrían causar resultados falsos positivos de CTCs.

Tanto la determinación de CTCs, como la determinación de los parámetros bioquímicos, hematológicos y de coagulación se llevó a cabo repetidamente en distintos periodos de tiempo: una vez incluidos los pacientes en lista de espera de trasplante hepático (muestras pre-TOH). Las siguientes extracciones se realizaron al mes, 6 meses, 1 año y a los 2 años después del trasplante (muestras post-TOH).

Las variables demográficas y clínicas, se obtuvieron a partir de la historia clínica de cada paciente.

Los datos fueron recogidos en una base de datos prospectiva construida al inicio del estudio, en la que quedaron reflejadas todas las variables previamente expuestas.

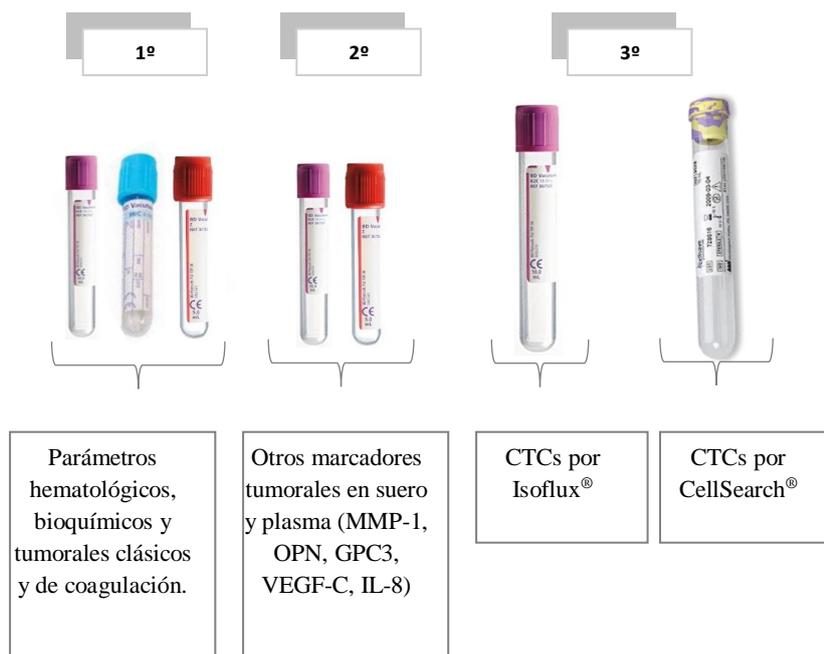


Figura 10. Secuencia de tubos de sangre extraídos a cada paciente en cada extracción.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Aislamiento y detección de CTCs por el sistema Isoflux® (Fluxion Biosciences Inc, South San Francisco, CA)

Una vez obtenidas las muestras sanguíneas, fueron mantenidas a temperatura ambiente y procesadas dentro de las primeras 36 horas tras la extracción.

- Enriquecimiento de CTCs:

Para el aislamiento inmunomagnético de las CTCs, en primer lugar, se realizó una separación celular en gradiente en tubos *Leucosep*TM de 50 mL (Greiner Bio-One, Monroe, NC), preparados con 15 mL de Ficoll (*Ficoll-Paque*^{TM Plus}) (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) y 5 mL de Tampón fosfato salino sin calcio ni magnesio (PBS-CMF), para recuperar la fracción de células mononucleadas de la sangre, tras la centrifugación a 800xg durante 15 minutos, sin freno.

Posteriormente, se decantó el sobrenadante (20 mL) a un tubo cónico de 50 mL, el cual se centrifugó a 280xg durante 10 minutos.

Seguidamente, se aspiró el sobrenadante, dejando el pellet celular (500 µL), que se resuspendió en *Binding buffer* y se transfirió a un tubo de 2 mL, adquiriendo un volumen final de muestra de 1 mL, mantenido en hielo.

La fracción de células mononucleadas recuperada, se mezcló con 40µL de *Fc blocker reagent* y se incubó durante 5 minutos.

La muestra celular se incubó, posteriormente, con una suspensión de 40 µL de partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos anti-EpCAM, durante 2 h a 4°C en rotación suave, con el Kit *IsoFlux Circulating Tumor Cell Enrichment* de Fluxion Biosciences (South San Francisco, CA).

- Aislamiento de CTCs:

Tras la incubación, se procedió al paso de la muestra a través de un canal microfluídico y posterior selección magnética en el Sistema IsoFlux® (Fluxion Biosciences Inc, South San Francisco, CA).

El sistema Isoflux[®] emplea unos cartuchos que contienen cuatro depósitos: entrada de la muestra, zona de lavado, zona de aislamiento (*CellSpot*), y depósito de residuos. Todos están conectados por un canal de flujo de microfluidos en la parte inferior del dispositivo. Las muestras se cargaron en el pocillo de entrada del cartucho microfluídico. Aplicando una presión (2 psi) en la zona de entrada de la muestra, las muestras alcanzaron un caudal de 20 μL por minuto, atravesando el canal en menos de 45 minutos. Las células EpCAM+ unidas a las partículas inmunomagnéticas, quedaron retenidas en la membrana de la zona de aislamiento del cartucho (disco polimérico), en presencia de un campo magnético externo. Las células restantes se recogieron en el pocillo de desechos. Las células diana aisladas, se recuperaron del disco *CellSpot*, donde quedaron retenidas en su superficie, a través de su desacoplamiento, pipeteado y dispensado en un tubo de microcentrífuga, con 200 μL de *Binding buffer* para su posterior procesamiento (figura 11).

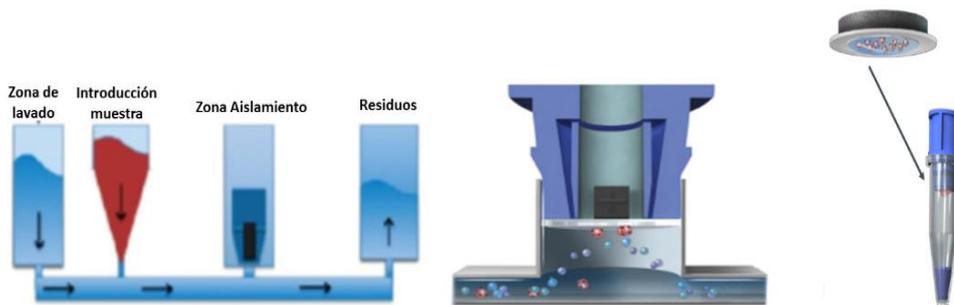


Figura 11. Sistema Isoflux[®]. Cartucho de Isoflux[®], con sus cuatro depósitos: entrada de la muestra, depósito de lavado, zona de aislamiento, y depósito de residuos. Procesamiento de la muestra a través del canal microfluídico, aislamiento de CTCs en presencia de un campo magnético y transferencia de CTCs a un tubo de microcentrífuga.

- Contaje de CTCs:

A continuación, se procedió a la tinción inmunofluorescente de las muestras utilizando el *Circulating Tumor Cell Enumeration Kit* (Fluxion Biosciences Inc, South San Francisco, CA). La tinción se realizó sobre un portaobjetos empleando los siguientes anticuerpos marcados:

- Anticuerpo anti-CD45 marcado con cianina CyTM3, específico de leucocitos (las células se tiñeron primero con 25 μL de anticuerpo anti-CD45 humano policlonal de

conejo, 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de su lavado e incubación con anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con Cy3, 15 minutos en oscuridad).

- Anticuerpo anti-CK marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), 1 hora a temperatura ambiente, específico de la CK intracelular característica de la célula epitelial (previa permeabilización celular con 25 µL de tampón con Triton X-100 al 0,2%, 10 minutos a temperatura ambiente).
- 5 µL de medio de montaje con Hoechst 33342 para la tinción del núcleo.

Las CTCs teñidas se montaron en placas de vidrio multipocillo Sensoplate™ (Greiner Bio-One). Se cubrieron y se almacenaron a 4°C hasta su visualización.

Posteriormente se procedió a la observación bajo microscopio de fluorescencia con filtros de excitación/emisión para FITC (495nm/521nm), Cy™3 (550nm/570nm) y Hoechst (361nm/497nm), con objetivos de 100x y 400x y con software de imágenes (BioFlux Montage, Fluxion Biosciences Inc).

Las CTCs fueron consideradas células morfológicamente intactas, nucleadas, CK positivas y CD45 negativas.

4.7.2 Aislamiento y detección de CTCs por el sistema CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems)

Igual que para el método Isoflux®, una vez obtenidas las muestras sanguíneas, fueron mantenidas a temperatura ambiente y procesadas dentro de las primeras 36 horas tras la extracción.

El aislamiento de CTCs se llevó a cabo por inmunomagnetismo, empleando anticuerpos anti-EpCAM unidos a partículas magnéticas. La identificación y el conteo de las CTCs fue llevada a cabo empleando el *CellSearch Epithelial Cell Kit*, con el sistema *Celltracks Autoprep® System* (Janssen Diagnostics, LLC) (figura 12). Este sistema permitió un aislamiento automático, así como la inmunotinción de las células aisladas con anticuerpos anti-CKs (CK8, 18, 19), anti-CD45, y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI):

- Anti-CK-ficoeritrina (PE): específico para la proteína CK intracelular, (CK8, CK18, CK19).

- DAPI: marcador que tiñe el núcleo de todas las células nucleadas. Por ello, marca tanto los leucocitos, como las células epiteliales.
- Anti-CD45-Alofococianina (APC): específico para marcar los leucocitos.

Tras la incubación de la muestra, se capturó una imagen a través del Sistema *Celltracks Analyzer II*[®] (Janssen Diagnostics, LLC), un sistema de microscopía semiautomático basado en fluorescencia que permite la reconstrucción computerizada de imágenes celulares (figura 12).

Las CTCs fueron definidas como células morfológicamente intactas, nucleadas, CK's positivas, y CD45 negativas.



Figura 12. Sistemas Celltracks Autoprep[®] y Celltracks Analyzer II[®]

4.7.3 Determinación de parámetros bioquímicos, hematológicos y de coagulación

Las determinaciones bioquímicas fueron llevadas a cabo por métodos enzimáticos, colorimétricos, e inmunturbidimétricos en el módulo analítico Cobas c711 (Roche Diagnostics, Switzerland). La determinación de los parámetros hematológicos fue llevada a cabo mediante citometría de flujo fluorescente por el sistema Sysmex XE5000, y de los de coagulación, determinados por ACLTOP 300 (Werfen).

4.7.4 Determinación de marcadores tumorales clásicos: AFP y CEA

Los niveles séricos de AFP y CEA fueron obtenidos a través de un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) en el en el módulo analítico Cobas e 601 del

analizador Cobas 8000 *Modular Analyzer series* (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

4.7.5 Determinación de otros marcadores tumorales

Se determinaron los niveles séricos de MMP-1, VEGF-C, GPC3 y los niveles plasmáticos de OPN e IL-8, mediante un ELISA en fase sólida, específico para cada uno de los marcadores (MyBiosource, Inc, San Diego, USA; Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY; Invitrogen™ Corporation, Frederick, MD), consistente en un enzimoimmunoensayo cuantitativo tipo sándwich, siguiendo las instrucciones de cada fabricante.

Los kits incorporan una placa de 96 pocillos, con anticuerpos monoclonales específicos de estas moléculas unidos en el fondo de cada pocillo. Tras la adición de la muestra y los estándares, un segundo anticuerpo policlonal conjugado, lavado y finalmente adición del sustrato, se produjo un cambio de color medido espectrofotométricamente, que fue proporcional a la concentración de cada marcador (tabla 10 y figura 13).

La lectura de las concentraciones de cada marcador se realizó a partir de la extrapolación de las absorbancias de cada una de las muestras en la recta patrón en la que se representaba la absorbancia frente a la concentración conocida de cada uno de los estándares.

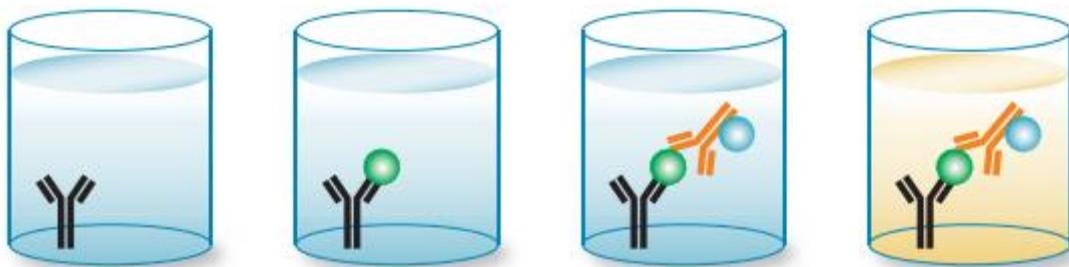


Figura 13. ELISA tipo sándwich. Tras el empleo de un anticuerpo 1° y un anticuerpo 2° conjugado a un enzima, específicos de la molécula en estudio y tras la adición de un sustrato, se genera un cambio de color en el medio que puede ser medido espectrofotométricamente.

Tabla 10. Anticuerpos, conjugados, sustratos y longitudes de onda, empleados en la medición espectrofotométrica de los diferentes marcadores estudiados.

Marcador	Anticuerpo 1°	Anticuerpo 2° o Conjugado	Sustrato	Longitud de onda
MMP-1 (MyBiosource, Inc.)	Anticuerpo monoclonal específico de MMP-1	Anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano	Sustrato de peroxidasa A y B	450 nm
OPN (Enzo Life Sciences Inc.)	Anticuerpo monoclonal biotinilado específico para OPN	Estreptavidina conjugada con Fosfatasa Alcalina	p-nitrofenil fosfato	405 nm
VEGF-C (Enzo Life Sciences Inc.)	Anticuerpo monoclonal biotinilado específico para VEGF-C	Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano	Tetrametil-benzidina	450 nm
GPC3 (MyBiosource, Inc.)	Anticuerpo monoclonal específico de GPC3	Anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano	Solución Cromógena A y B	450 nm
IL-8 (Invitrogen™ Corporation)	Anticuerpo monoclonal biotinilado específico para IL-8	Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano	Tetrametil-benzidina	450 nm

4.8 ANÁLISIS DE DATOS

1. Se realizó la estadística descriptiva de cada una de las variables consideradas, utilizándose para las variables cuantitativas, la media \pm la desviación estándar y mediana \pm rango intercuartílico. Para las variables cualitativas se utilizaron las frecuencias y sus porcentajes. Se realizó el test Shapiro-Wilk para comprobar la distribución de las distintas variables.

2. Para ver si existían diferencias entre el recuento de CTCs obtenido por los métodos CellSearch® e Isoflux®, se realizó el test U de Mann Whitney. Para evaluar la concordancia entre ambos métodos, se empleó el test de Bland-Altman.

3. Con el fin de conocer la posible correlación entre la concentración de CTCs y las variables bioquímicas, hematológicas y de coagulación necesarias para el manejo del CHC antes del trasplante, se llevó a cabo el test de correlación de Spearman. Además,

para conocer si había diferencias importantes en los niveles medianos de CTCs entre niveles patológicos y no patológicos de los parámetros bioquímicos, hematológicos y de coagulación, se empleó el test U de Mann Withney.

4. Para estudiar si existía asociación entre los niveles de CTCs pretrasplante y las diferentes variables clínicas y demográficas, se empleó el test de correlación de Spearman (cuando las variables eran cuantitativas) y los test U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis (cuando las variables eran cualitativas).

5. Para el estudio de la asociación de los diferentes marcadores tumorales (MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8) con los niveles de CTCs y AFP, antes y después del trasplante, se empleó el test de correlación de Spearman.

Así mismo, para estudiar la asociación de los niveles de estos marcadores pre-trasplante con los parámetros clínicos, se empleó el test de correlación de Spearman (para variables cuantitativas), y los test U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis (para variables cualitativas).

6. Para comparar los niveles medianos de CTCs y otros marcadores tumorales (AFP, MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8) entre pacientes pre-trasplantados y post-trasplantados empleamos el test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas.

7. Para la predicción de recidiva post-trasplante, se empleó el Análisis “*Receiver Operating Characteristic*” (ROC). Se estimó el Área Bajo la Curva (AUC) para comparar la eficacia de predicción de recidiva del conteo de CTCs pre-trasplante medidas por el sistema Isoflux[®], con la determinación de AFP y MMP-1. Así mismo, se determinó el punto de corte del número de CTCs y los otros dos marcadores, con mejor sensibilidad y especificidad, correspondiente al máximo índice Youden.

8. Para el estudio de la correlación de los niveles de CTCs pre-trasplante, con los tiempos de SG y SLE tras el trasplante, se empleó el test de correlación de Spearman.

9. El análisis de la SG y Supervivencia Libre de Metástasis o Recidiva tras el trasplante hepático se realizó con el método de Curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

La comparación de las curvas de supervivencia entre grupos de pacientes con CHC con diferentes características clínicas y analíticas, se llevó a cabo con el Log-Rank test (Mantel-Cox).

Los datos se analizaron con el software SPSS v. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL), y el software MedCalc 15.8.

En todas las situaciones, se consideró asociación estadística aquella en la que el valor de la p resultó ser inferior a 0.05.

5. RESULTADOS

5.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LAS VARIABLES

En la tabla 11 se muestran los niveles de CTCs determinados por el sistema Isoflux® en los 31 pacientes, antes y después del trasplante.

En la tabla 12 se muestran los valores de los parámetros bioquímicos pre-trasplante y en la tabla 13 se muestran los valores de los marcadores de inflamación, tumorales, hematológicos y de coagulación pre-trasplante obtenidos, de los 31 pacientes incluidos en el estudio.

En las tablas 14, 15, 16, 17, 18, y 19 se muestran los valores respectivos obtenidos de AFP, GPC3, MMP-1, VEGF-C, OPN e IL-8 pre y post-trasplante.

Del total de 31 pacientes incluidos, 9 de ellos (29%) fallecieron durante el estudio, de los cuales, 4 fallecieron antes de ser trasplantados y 5 después del trasplante. De estos últimos, 3 presentaron recidiva tumoral o metástasis extrahepáticas a los 6 meses tras la cirugía, uno de ellos (paciente 4), presentó metástasis ósea, pulmonar y hepática. Otro (paciente 10), metástasis suprarrenal bilateral y un tercero (paciente 16), metástasis óseas y hepáticas.

En las tablas 20, 21 y 22 se muestran las variables demográficas y clínicas de los 31 pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 11. Niveles de CTCs medidos por el sistema Isoflux® antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (CTCs: células tumorales circulantes; Tx: trasplante).

Paciente	CTCs/10mL Pre-tx	CTCs/10mL 1 mes post-tx	CTCs/10mL 6 meses post-tx	CTCs/10mL 1 año post-tx	CTCs/10mL 2 años post-tx
1	16	-	-	-	-
2	20	4	9	104	42
3	44	0	100	2	56
4	91	0	2	-	-
5	36	-	-	-	-
6	53	17	-	4	1
7	23	1150	15	2	1
8	8	204	0	-	-
9	102	0	214	1	90
10	9	1	1	-	-
11	539	70	-	0	7
12	165	131	11	1	0
13	448	3	-	9	3
14	13	6	-	0	1
15	181	9	-	0	2
16	1768	13	6	6	-
17	0	1	68	0	3
18	0	6	-	0	7
19	0	4	-	2	9
20	10	1	0	1	-
21	8	11	1	10	6
22	23	-	-	-	-
23	2	2	-	-	-
24	188	24	1	3	9
25	3	-	4	1	-
26	0	-	0	10	-
27	0	1	33	-	-
28	1	4	0	2	-
29	3	3	-	7	-
30	3	-	-	-	-
31	1	0	0	-	-
Shapiro-Wilk	0,398	0,311	0,549	0,346	0,631
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Media± SD	121,22±330,84	66±230,63	25,83±54,22	7,85±22,28	15,80±26,15
Mediana (RI)	13 (2-91)	4 (1-15)	3 (0-19,50)	2 (0,50-6,50)	6 (1-9)
Mínimo	0	0	0	0	0
Máximo	1768	1150	214	104	90

Tabla 12. Parámetros bioquímicos pre-trasplante. (Glu: glucosa; Alb: albúmina; Ferrit: ferritina; TG: triglicéridos; Colest: colesterol; GOT: transaminasa glutámico-oxalacética; GPT: transaminasa glutámicopirúvica; GGT: gamma glutamil aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; BT: bilirrubina total; ALP: fosfatasa alcalina).

Paciente	Glu mg/dL	Alb g/dL	Ferrit ng/mL	TG mg/dL	Colest mg/dL	GOT U/L	GPT U/L	GGT U/L	LDH U/L	BT mg/dL	ALP U/L
1	148	3,5	32	79	104	43	42	236	204	0,53	198
2	123	3,4	380	105	150	145	108	338	332	0,86	186
3	147	3,9	-	152	171	125	68	787	203	0,77	268
4	105	3,7	886	78	112	85	62	45	138	1,24	-
5	117	4,8	262	103	132	122	140	212	204	0,77	-
6	83	3	334	80	157	233	144	74	310	3,48	127
7	146	3,9	23	84	142	65	83	108	187	0,85	-
8	173	4	28	84	152	26	20	65	221	0,64	-
9	102	3,9	239	85	192	34	30	99	190	1,71	-
10	121	4,3	43	120	170	23	19	34	149	0,6	-
11	96	3,4	16	102	192	42	19	40	289	1,98	-
12	121	4,9	228	114	198	38	36	89	237	1,05	-
13	119	4,6	24	104	198	34	25	106	187	0,66	-
14	137	4,3	84	153	192	34	23	75	158	0,45	-
15	101	4,2	2536	169	169	101	120	60	199	1,37	-
16	88	4	102	112	173	50	21	100	223	0,87	-
17	95	4,3	1120	93	185	115	130	77	179	1,04	-
18	100	4,3	31	143	145	66	54	52	178	0,84	-
19	159	3,6	175	126	168	-	14	66	-	1,02	-
20	88	3,6	20	51	169	27	14	79	185	0,59	-
21	86	2,4	-	51	101	85	43	50	271	9,34	190

22	126	3,2	79	196	160	146	38	335	234	1,37	358
23	113	2,9	170	118	210	40	20	154	216	0,23	173
24	186	3,6	113	190	210	58	39	187	221	2,59	117
25	195	3	48	74	95	46	26	29	199	3,85	63
26	135	4,7	62	145	188	33	18	85	-	0,97	159
27	84	4,7	61	70	113	35	42	65	218	0,75	141
28	110	3,8	587	135	179	35	29	60	176	0,74	186
29	63	3,4	204	80	105	104	71	193	228	1,04	266
30	143	4,4	31	108	167	36	27	156	288	0,6	94
31	106	4	20	138	211	30	22	122	141	0,66	120
Shapiro- Wilk	0,961	0,979	0,530	0,960	0,931	0,804	0,793	0,618	0,937	0,529	0,938
p	0,308	0,774	<0,001	0,290	0,048	<0,001	<0,001	<0,001	0,084	<0,001	0,355
Media	119,87	3,86	273,72	111,03	161,61	68,53	49,90	134,77	212,58	1,40	176,40
SD	31,39	0,61	508,19	37,01	34,54	48,87	39,37	144,97	48,4	1,68	75,87
Mediana	117	3,90	84	105	169	44,50	36	85	204	0,86	173
RI	96-143	3,40-4,30	31-250,50	80-138	142-192	34-101,75	21-68	60-156	182-231	0,66-1,37	120-198

Tabla 13. Marcadores de inflamación, tumorales, hematológicos y de coagulación pre-trasplante. (PCR: proteína C reactiva; AFP: alfa fetoproteína; CEA: antígeno carcinoembrionario; PQ: plaquetas; RNL: ratio neutrófilos-linfocitos; TP: tiempo de protrombina).

Paciente	PCR mg/dL	AFP ng/mL	CEA ng/mL	PQ x10 ³	Leucocitos x10 ³	RNL	TP seg
1	2,33	1139	8,6	111	6,11	4,19	12,5
2	0,24	27	6,9	67	5,52	4,19	13,2
3	2,24	2	1,4	103	4,22	1,79	10,4
4	-	2	3,2	89,2	4,08	2,71	12,7
5	0,04	31	-	97,5	4,4	1,26	10,8
6	0,93	6	8,3	45,9	3,24	4,41	15,2
7	0,19	3	4,5	56,7	4,58	2,69	12,1
8	0,81	1	2,5	109	4,4	3,33	13
9	0,5	2	5,8	58,4	4,63	1,83	14,6
10	0,19	16	1,6	66,7	3,91	3,87	12,2
11	0,99	14	4	186	10,1	0,45	13,9
12	0,63	6	6,6	70,9	4,91	1,71	11,8
13	0,3	4	2,2	73,8	4,03	4,95	12,5
14	0,52	4	2,2	95,9	4,39	2,03	11,6
15	0,02	21	2,6	110	4,07	0,52	11,8
16	0,83	11	6,6	88,2	3,34	1,45	12,3
17	0,1	7	2,2	85,6	4,57	2,37	11,5
18	0,01	7	2,6	74,6	5,3	1,21	13
19	0,36	11	3,7	217	7,93	3,05	-
20	0,15	4	6,8	71,1	6,55	1,96	14,9
21	1,32	5	11,1	33	3,63	4,14	18,6
22	1,49	3638	5,2	224	10,73	2,45	13,2
23	1,99	4	5,6	200	8,35	2,29	11,3
24	0,57	5	4	50	3,06	2,60	15,8
25	0,24	25	5,9	42	3,9	8,32	23
26	0,19	7	5	65	4,7	1,91	11
27	0,06	3	2,8	121	3,93	1,96	12,1
28	0,45	6	2	63	4,57	2,03	14,3
29	0,49	6	6,5	156	7,18	5,57	17
30	0,48	4412	4	161	6,78	1,97	12,3
31	0,38	7	4,1	164	7,9	2,06	13,2
Shapiro-Wilk	0,813	0,330	0,938	0,887	0,845	0,877	0,802
p	<0,001	<0,001	0,080	0,004	<0,001	0,002	<0,001
Media	0,63	304,38	4,61	101,82	5,32	2,75	13,39
SD	0,64	1018,6	2,35	52,67	1,96	1,01	2,58
Mediana	0,46	6	4,05	88,20	4,57	2,28	12,60
RI	0,19-0,85	4-16	2,57-6,52	65-121	4,03-6,55	1,83-3,87	11,80-14,37

Tabla 14. Niveles de AFP antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (AFP: alfa-fetoproteína; Tx: trasplante).

Paciente	AFP (ng/mL) Pre-tx	AFP (ng/mL) 1 mes post-tx	AFP (ng/mL) 6 meses post-tx	AFP (ng/mL) 1 año post-tx	AFP (ng/mL) 2 años post-tx
1	1139	-	-	-	-
2	27	4	35	4	5
3	2	4	5	4	5
4	2	4	93	-	-
5	31	-	-	-	-
6	6	1	-	2	3
7	3	2	2	2	2
8	1	1	2	-	-
9	2	1	2	2	5
10	16	9	17	-	-
11	14	2	-	2	3
12	6	2	2	3	4
13	4	2	-	1	1
14	4	1	-	2	2
15	21	4	-	4	5
16	11	2	108	163	-
17	7	1	1	1	1
18	7	2	-	5	2
19	11	2	-	4	5
20	4	1	2	2	-
21	5	3	2	2	2
22	3638	-	-	-	-
23	4	2	-	-	-
24	5	2	2	1	2
25	25	-	2	1	-
26	7	-	2	2	-
27	3	3	4	-	-
28	6	1	1	2	-
29	6	3	-	2	-
30	4412	-	-	-	-
31	7	2	2	-	-
Shapiro- Wilk	0,330	0,717	0,511	0,254	0,839
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,012
Media±SD	304,38±1018,65	2,44±1,70	15,77±32,01	10,04±35,06	3,13±1,55
Mediana (RI)	6 (4-16)	2 (1-3)	2 (2-8)	2 (2-4)	3 (2-5)

Tabla 15. Niveles de GPC3 antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (GPC3: glicicano-3; Tx: trasplante).

Paciente	GPC3 (ng/mL) Pre-tx	GPC3 (ng/mL) 1 mes post-tx	GPC3 (ng/mL) 6 meses post-tx	GPC3 (ng/mL) 1 año post-tx	GPC3 (ng/mL) 2 años post-tx
1	3,78	-	-	-	-
2	1,83	7,59	10,32	6,10	9,71
3	17,77	25,84	26,91	26,24	10,52
4	1,26	3,33	4,14	-	-
5	12,10	-	-	-	-
6	3,65	7,05	-	3,30	3,57
7	13,05	9,46	16,28	7,25	3,98
8	13,83	5,81	7,43	-	-
9	13,56	14,82	17,75	11,71	13,86
10	4,72	6,95	6,12	-	-
11	18,13	22,55	-	20,50	-
12	23,45	21,98	25,43	37,05	31,18
13	5,75	13,72	-	7,42	1,15
14	4,86	6,03	-	4,46	6,24
15	1,30	10,55	-	7,15	3,21
16	5,29	10,89	9,24	5,40	-
17	6,21	11,18	5,92	7,76	9,50
18	34,57	13,49	-	11,76	5,00
19	16,77	19,46	-	8,59	-
20	8,82	6,85	8,42	6,95	-
21	4,49	5,57	5,53	2,77	-
22	2,86	-	-	-	-
23	1,74	-	-	-	-
24	2,07	9,71	10,36	11,79	-
25	23,73	-	22,46	23,59	-
26	44,59	-	42,65	43,13	-
27	31,89	7,65	0,86	-	-
28	40,03	15,78	18,64	-	-
29	6,51	2,33	-	-	-
30	5,92	-	-	-	-
31	3,40	7,40	-	-	-
Shapiro- Wilk	0,817	0,912	0,876	0,786	0,768
p	<0,001	0,038	0,022	0,001	0,004
Media± SD	12,19±11,98	11,08±6,25	13,74±10,42	13,31±11,52	8,90±8,31
Mediana (RI)	6,21 (3,6-17,7)	9,58 (6,8-14,5)	9,78 (6,0-19,5)	7,76 (6,1-20,5)	6,24 (3,5-10,5)

Tabla 16. Niveles de MMP-1 antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (MMP-1: metaloproteasa-1; Tx: trasplante).

Paciente	MMP-1 (ng/mL) Pre-tx	MMP-1 (ng/mL) 1 mes post-tx	MMP-1 (ng/mL) 6 meses post-tx	MMP-1 (ng/mL) 1 año post-tx	MMP-1 (ng/mL) 2 años post-tx
1	3,29	-	-	-	-
2	3,89	1,39	3,71	1,34	1,51
3	1,17	1,50	1,48	1,52	1,59
4	1,28	1,29	5,54	-	-
5	3,00	-	-	-	-
6	1,72	1,31	-	1,26	1,27
7	1,48	1,28	1,32	1,25	1,26
8	1,26	1,27	1,31	-	-
9	1,26	1,23	1,23	1,26	1,48
10	2,05	1,74	2,24	-	-
11	2,15	1,26	-	1,27	-
12	1,58	1,36	1,32	1,31	1,36
13	1,54	1,21	-	1,15	0,82
14	1,47	1,28	-	1,29	1,26
15	2,28	1,33	-	1,28	1,03
16	1,64	1,27	4,48	5,33	-
17	1,61	1,26	1,23	1,54	1,21
18	1,64	1,21	-	1,39	0,86
19	1,84	1,27	-	1,35	-
20	1,41	1,27	1,32	0,86	-
21	1,51	1,44	1,38	1,30	-
22	1,99	-	-	-	-
23	1,03	-	-	-	-
24	1,46	1,21	1,22	1,22	-
25	2,65	-	0,87	0,85	-
26	1,12	-	0,85	0,84	-
27	0,90	0,90	0,95	-	-
28	1,15	0,81	0,80	-	-
29	1,10	0,85	-	-	-
30	2,65	-	-	-	-
31	1,00	0,88	0,83	-	-
Shapiro- Wilk	0,865	0,871	0,677	0,420	0,933
p	0,001	0,006	<0,001	<0,001	0,443
Media± SD	1,74±0,71	1,24±0,20	1,78±1,36	1,45±0,95	1,24±0,25
Mediana (RI)	1,54 (1,2-2,0)	1,27 (1,2-1,3)	1,32 (0,9-1,6)	1,28 (1,2-1,3)	1,26 (1,0-1,4)

Tabla 17. Niveles de VEGF-C antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular C; Tx: trasplante).

Paciente	VEGF-C (ng/mL) Pre-tx	VEGF-C (ng/mL) 1 mes post-tx	VEGF-C (ng/mL) 6 meses post-tx	VEGF-C (ng/mL) 1 año post-tx	VEGF-C (ng/mL) 2 años post-tx
1	0,25	-	-	-	-
2	0,60	0,55	0,61	0,83	1,17
3	5,25	1,45	1,23	2,95	1,21
4	0,26	0,28	0,18	-	-
5	0,61	-	-	-	-
6	0,35	0,41	-	0,21	0,35
7	0,98	0,68	1,89	2,73	2,12
8	0,66	0,73	0,73	-	-
9	10,59	3,55	5,26	5,92	6,80
10	0,57	0,66	0,40	-	-
11	0,55	0,81	-	0,65	-
12	2,49	0,90	1,23	0,98	0,57
13	0,37	0,50	-	0,30	0,16
14	0,83	0,62	-	0,62	0,50
15	0,49	0,70	-	0,76	0,34
16	5,35	0,79	1,08	2,39	-
17	0,57	0,39	0,41	0,47	0,41
18	1,27	1,65	-	1,07	3,01
19	0,96	0,64	-	0,70	-
20	0,71	0,55	0,43	0,17	-
21	4,03	1,26	0,62	0,51	-
22	0,44	-	-	-	-
23	4,49	-	-	-	-
24	2,23	0,42	0,46	0,44	-
25	0,50	-	0,21	0,26	-
26	2,02	-	2,94	2,93	-
27	0,32	0,52	0,32	-	-
28	0,42	1,25	2,51	-	-
29	0,37	0,35	-	-	-
30	0,37	-	-	-	-
31	7,50	0,83	1,87	-	-
Shapiro- Wilk	0,662	0,662	0,765	0,727	0,694
p	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
Media± SD	1,81±2,46	0,85±0,67	1,24±1,29	1,30±1,46	1,51±1,96
Mediana (RI)	0,61 (0,4-2,2)	0,67 (0,5-0,8)	0,68 (0,4-1,8)	0,70 (0,4-2,3)	0,57 (0,3-2,1)

Tabla 18. Niveles de OPN antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (OPN: osteopontina; Tx: trasplante).

Paciente	OPN (ng/mL) Pre-tx	OPN (ng/mL) 1 mes post-tx	OPN (ng/mL) 6 meses post-tx	OPN (ng/mL) 1 año post-tx	OPN (ng/mL) 2 años post-tx
1	34,62	-	-	-	-
2	21,99	43,03	30,76	22,98	19,13
3	51,76	73,67	77,68	73,48	29,44
4	16,02	20,54	51,37	-	-
5	5,30	-	-	-	-
6	53,01	25,61	-	10,19	4,54
7	11,51	11,82	10,12	9,08	5,37
8	5,40	28,23	21,01	-	-
9	16,15	56,52	21,71	23,26	8,42
10	11,63	21,67	14,23	-	-
11	33,74	42,47	-	26,91	-
12	12,86	48,51	18,57	18,10	10,27
13	20,40	37,75	-	43,66	16,98
14	13,90	24,47	-	14,05	13,32
15	15,20	33,10	-	39,69	14,97
16	28,46	59,82	140,25	173,87	-
17	13,45	30,75	40,97	24,45	13,47
18	25,68	41,20	-	29,53	17,73
19	22,78	46,85	-	20,48	-
20	11,45	19,00	10,90	12,73	-
21	9,16	13,12	11,10	10,67	-
22	32,72	-	-	-	-
23	38,72	-	-	-	-
24	18,06	43,98	29,05	20,00	-
25	12,92	-	12,30	11,92	-
26	14,12	-	28,02	16,45	-
27	21,68	46,18	14,80	-	-
28	36,56	39,23	42,22	-	-
29	27,77	18,62	-	-	-
30	13,11	-	-	-	-
31	8,37	17,24	48,63	-	-
Shapiro- Wilk	0,898	0,959	0,725	0,558	0,944
p	0,006	0,422	<0,001	<0,001	0,569
Media±SD	21,24±12,43	35,14±15,87	34,64±31,90	31,65±37,67	13,96±7,05
Mediana (RI)	16,1 (12,8-28,4)	35,4 (20,8-45,6)	24,8 (13,7-43,8)	20,4 (12,7-29,5)	13,4 (8,4-17,7)

Tabla 19. Niveles medianos de IL-8 antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (IL-8: interleucina 8).

Paciente	IL-8 (pg/mL) Pre-tx	IL-8 (pg/mL) 1 mes post-tx	IL-8 (pg/mL) 6 meses post-tx	IL-8 (pg/mL) 1 año post-tx	IL-8 (pg/mL) 2 años post-tx
1	-	-	-	-	-
2	0,39	0,00	10,87	0,00	0,00
3	4,86	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,30	1,79	1,84	-	-
5	4,10	-	-	-	-
6	0,00	2,89	-	0,20	2,24
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,97
8	3,04	8,68	3,96	-	-
9	2,27	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,59	2,60	3,80	-	-
11	11,20	0,00	-	0,00	-
12	14,37	4,09	8,91	2,97	0,09
13	9,37	0,00	-	0,00	-
14	2,14	1,09	-	1,51	0,00
15	0,00	0,00	-	0,00	-
16	1,21	0,00	0,00	13,77	-
17	7,69	5,30	2,56	1,47	1,55
18	2,70	2,44	-	0,37	-
19	2,91	5,66	-	0,00	-
20	3,63	3,08	0,35	-	-
21	3,55	0,13	0,00	0,00	-
22	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
24	1,07	0,44	0,00	0,00	-
25	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-
Shapiro- Wilk	0,822	0,798	0,737	0,425	0,751
P	0,001	0,001	0,001	<0,001	0,008
Media±SD	3,59±3,95	1,90±2,45	2,48±3,62	1,26±3,43	0,60±0,88
Mediana (RI)	2,70 (0,4-4,4)	0,76 (0,0-3,0)	0,35 (0,0-3,8)	0,00 (0,0-1,1)	0,045 (0,0-1,4)

Tabla 20. Variables cuantitativas, tanto demográficas (edad) como clínicas (tiempo en lista de espera, tiempo desde el diagnóstico, nº de LOES, nº de TACES pre-trasplante, SG y SLE tras Tx). (LOES: lesiones ocupantes de espacio; TACES: quimioembolizaciones transarteriales; SG: supervivencia general; SLE: supervivencia libre de enfermedad; Tx: trasplante).

Paciente	Edad (años)	Tiempo en lista de espera (días)	Tiempo desde diagnóstico (meses)	Nº LOES	TACES pre-tx	SG tras Tx (meses)	SLE tras Tx (meses)	Tiempo seguimiento (meses)
1	51	112	5	1	1	NO TX	NO TX	2
2	54	631	27	4	2	37	37	37
3	64	231	28	1	2	30	30	37
4	55	469	15	4	5	14	7	17
5	64	84	5	2	0	NO TX	NO TX	9
6	56	210	5	1	2	28	28	36
7	60	210	9	1	1	34	34	35
8	60	180	10	2	1	12	12	12
9	48	357	13	1	1	30	30	35
10	56	42	2	1	1	8	4	24
11	62	508	18	3	1	27	27	35
12	63	113	13	1	3	34	34	35
13	60	201	6	3	0	27	27	35
14	65	98	5	1	1	28	28	34
15	57	14	4	4	0	26	26	34
16	60	24	4	7	6	14	6	23
17	67	35	10	1	2	29	29	31
18	60	28	7	4	1	26	26	31
19	58	14	3	1	1	26	26	29
20	47	49	8	2	1	14	14	27

21	60	143	6	3	2	24	24	25
22	63	150	3	3	4	NO TX	NO TX	3
23	54	214	3	1	2	3	3	24
24	54	52	10	2	2	24	24	24
25	53	8	4	1	0	21	21	22
26	60	35	12	1	0	21	21	22
27	54	117	11	1	0	13	13	13
28	65	99	5	1	1	12	12	13
29	51	78	41	2	2	12	12	13
30	76	62	7	2	1	NO TX	NO TX	3
31	68	90	5	2	1	9	9	10
Shapiro- Wilk	0,974	0,791	0,744	0,757	0,803	0,942	0,926	0,903
p	0,639	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,135	0,056	0,008
Media	58,87	150,25	9,80	2,06	1,51	21,59	20,88	23,54
SD	6,24	152,91	8,58	1,41	1,41	9,12	10,03	11,20
Mediana	60	99	7	2	1	24	24	24
RI	54-63	42-210	5-12	1-3	1-2	13-28	12-28	13-35

Tabla 21. Variables clínicas de los 31 pacientes: presencia/ausencia de invasión vascular, necrosis, metástasis y exitus post-trasplante. (TX: trasplante).

Paciente	Invasión	Necrosis	Recidiva Post-trasplante	Exitus Post-trasplante
1	NO TX	NO TX	NO TX	NO TX
2	NO	SI	NO	NO
3	NO	NO	NO	NO
4	NO	SI	SI	SI
5	NO TX	NO TX	NO TX	NO TX
6	NO	SI	NO	NO
7	NO	NO	NO	NO
8	NO	NO	NO	SI
9	NO	SI	NO	NO
10	NO	SI	SI	SI
11	SI	NO	NO	NO
12	NO	SI	NO	NO
13	SI	SI	NO	NO
14	NO	NO	NO	NO
15	NO	SI	NO	NO
16	SI	NO	SI	SI
17	NO	SI	NO	NO
18	NO	NO	NO	NO
19	NO	SI	NO	NO
20	NO	SI	NO	NO
21	NO	SI	NO	NO
22	NO TX	NO TX	NO TX	NO TX
23	NO	SI	NO	NO
24	NO	SI	NO	NO
25	NO	NO	NO	NO
26	NO	SI	NO	NO
27	NO	NO	NO	NO
28	NO	SI	NO	NO
29	NO	SI	NO	NO
30	NO TX	NO TX	NO TX	NO TX
31	NO	SI	NO	SI
No (%)	24 (88,9)	9 (33,3)	24 (88,9)	22 (81,5)
Sí (%)	3 (11,1)	18 (66,7)	3 (11,1)	5 (18,5)

Tabla 22. Variables clínicas: etiología de la cirrosis de los 31 pacientes y sus porcentajes (VHC: virus hepatitis C; ALCH: enolismo; FE: sobrecarga férrica; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; VHB: virus hepatitis B).

Paciente	Etiología
1	ALCH
2	VHC+ALCH+FE
3	CRIPTOGÉNICA
4	VHC
5	VHC
6	VHC
7	VHC+ALCH
8	VHC+ALCH
9	VHC
10	VHC
11	VHC+ALCH
12	ALCH
13	ALCH
14	CRIPTOGÉNICA
15	VHC
16	VHB+VHC
17	VHC
18	VHC
19	VHC
20	VHC+ALCH
21	HEMOCROMATOSIS
22	VHC+ALCH
23	VHC
24	CRIPTOGÉNICA
25	VHC+ALCH
26	ALCH
27	VHB
28	ALCH
29	GLUCOGENOSIS TIPO III
30	EHNA
31	ALCH
Etiología (%) (n=31)	
ALCH (%)	6 (19,4)
VHC (%)	10 (32,3)
VHB (%)	1 (3,2)
EHNA (%)	1 (3,2)
GLUCOGENOSIS (%)	1 (3,2)

CRIPTOGÉNICA (%)	3 (9,7)
HEMOCROMATOSIS (%)	1 (3,2)
MIXTA (%)	8 (25,8)

5.2 COMPARACIÓN DEL RECuento DE CTCs ENTRE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS CELLSEARCH® E ISOFLUX®

Se llevó a cabo la comparación de los métodos CellSearch® e Isoflux®, para la determinación de CTCs en pacientes diagnosticados de CHC candidatos a trasplante hepático.

Se realizó un total de 24 determinaciones de CTCs en sangre periférica, de forma paralela por ambos métodos, correspondiente a 20 pacientes. La mayoría de estas determinaciones fueron realizadas en muestras pre-trasplante (tabla 23). Los resultados de CTCs fueron calculados en base a un total de 7,5 mL para poder comparar ambos métodos.

Las CTCs fueron aisladas en 2 de las 24 determinaciones (8,3%) que se llevaron a cabo por el método CellSearch®, mientras que las CTCs determinadas por el método Isoflux®, estuvieron presentes en 20 de las 24 determinaciones (83,33%), existiendo claramente una diferencia significativa entre los niveles de CTCs obtenidas por ambos instrumentos de media ($p < 0,01$) (tabla 23).

La representación de las diferencias de las medidas entre los dos métodos frente a su media con el diagrama de Bland-Altman (figura 14), mostró que ambos métodos no son concordantes en cuanto a las concentraciones de CTCs obtenidas. Existe un error significativo entre ambos métodos, ya que los puntos están distribuidos por debajo de la línea correspondiente a la diferencia 0 entre ambos métodos. Es un error proporcional, debido a que la diferencia entre ambos métodos es lineal a lo largo del rango de medición.

Tabla 23. Niveles de CTCs determinados por los métodos CellSearch® e Isoflux®, y tipo de muestra analizada. Test U de Mann Whitney para la comparación de los niveles de CTCs por ambos métodos.

PACIENTE	MUESTRA	CTCs/7,5ml CELLSEARCH	CTCs/7,5ml ISOFLUX
1	Pre-trasplante	0	12
2	Pre-trasplante	0	15
2	1 mes post-trasplante	0	3
2	6 meses post-trasplante	0	7
3	Pre-trasplante	0	33
4	Pre-trasplante	0	68
4	1 mes post-trasplante	2	0
5	Pre-trasplante	0	27
6	Pre-trasplante	0	40
7	Pre-trasplante	0	17
8	Pre-trasplante	0	6
8	1 mes post-trasplante	0	153
9	Pre-trasplante	3	77
10	Pre-trasplante	0	7
11	Pre-trasplante	0	404
12	Pre-trasplante	0	124
13	Pre-trasplante	0	336
14	Pre-trasplante	0	10
15	Pre-trasplante	0	136
16	Pre-trasplante	0	1326
17	Pre-trasplante	0	0
18	Pre-trasplante	0	0
19	Pre-trasplante	0	0
20	Pre-trasplante	0	7,5
Media		0,20±0,72	117,02±278,03
Mediana		0 (RI:0-0)	16 (6,25-112,25)
Test Shapiro-Wilk		p<0,05	p<0,05
U de Mann Whitney		U=52,50	p<0,01

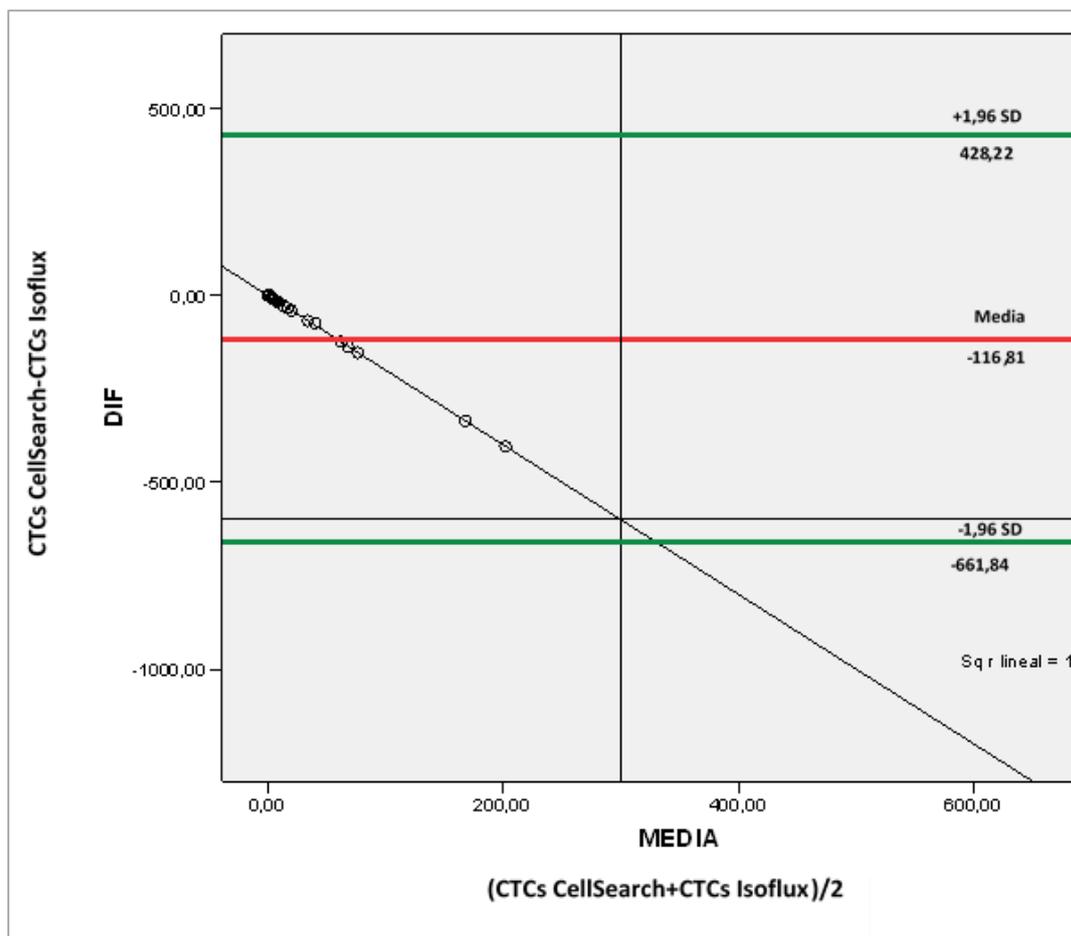


Figura 14. Diagrama de Bland-Altman. Representación de las diferencias de las medidas entre los métodos CellSearch® e Isoflux®, frente a su media.

5.3 RELACIÓN ENTRE LAS CTCs Y LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS Y DE COAGULACIÓN PRE-TRASPLANTE

Tras el estudio de la posible correlación entre la concentración de CTCs y los distintos parámetros bioquímicos (hepáticos, inflamatorios y tumorales clásicos), hematológicos y de coagulación, necesarios para el manejo del CHC antes del trasplante, el test de correlación de Spearman, no mostró ninguna correlación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) ente los niveles de CTCs pre-trasplante y los parámetros bioquímicos (niveles de glucosa, albúmina, ferritina, TG, colesterol, LDH, bilirrubina, transaminasas, ALP), de inflamación (niveles de PCR), parámetros

tumorales (niveles de AFP y CEA), hematológicos (RNL, niveles de leucocitos y plaquetas) ni de coagulación (TP) (tablas 24 y 25).

Cuando se compararon los niveles medianos de CTCs entre los pacientes con valores elevados (por encima del rango de referencia) y no elevados (dentro del rango de referencia) de los diferentes marcadores bioquímicos, hematológicos y de coagulación, empleando el test estadístico U de Mann Withney, se observó que había diferencias estadísticamente significativas en los niveles de CTCs entre los pacientes con niveles normales y elevados de bilirrubina total ($p < 0,05$), de manera que los pacientes con niveles de bilirrubina $\leq 1,20$ mg/dL, presentaron menores niveles de CTCs [8,50 CTCs/10 mL (RI:0,75-26,25)] que los pacientes con niveles de bilirrubina $> 1,20$ mg/dL [91 CTCs/ 10 mL (RI:15,50-184,50)]. De la misma forma, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de CTCs entre los pacientes con niveles normales y elevados de PCR ($p < 0,05$). Los pacientes con niveles de PCR $\leq 0,50$ mg/dL presentaron menores recuentos de CTCs [3 CTCs/10 mL (RI:0-26,25)] frente a los pacientes con niveles de PCR $> 0,50$ mg/dL [33,50 CTCs/10 mL (RI:9,25-182,25)] (tabla 26).

Tabla 24. Test de correlación Rho de Spearman de CTCs con parámetros bioquímicos pre-trasplante. (CTCs: células tumorales circulantes; Glu: glucosa; Alb: albúmina; Ferrit: ferritina; TG: triglicéridos; Colest: colesterol; GOT: transaminasa glutámico-oxalacética; GPT: transaminasa glutámopirúvica; GGT: gamma glutamil aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; BT: bilirrubina total; ALP: fosfatasa alcalina).

	Mediana	RI	Rho Spearman	P
CTCs/10mL	13	2-91		
Glu (mg/dL)	117	96-143	-0,010	0,959
Alb (g/dL)	3,90	3,40-4,30	-0,061	0,746
Ferrit (ng/mL)	84	31-250,50	0,076	0,695
TG (mg/dL)	105	80-138	0,047	0,803
Colest (mg/dL)	169	142-192	0,200	0,280
GOT (U/L)	44,50	34-101,75	0,225	0,231
GPT (U/L)	36	21-68	0,167	0,371
GGT (U/L)	85	60-156	0,173	0,353
LDH (U/L)	204	182-231	0,265	0,164
BT (mg/dL)	0,86	0,66-1,37	0,308	0,092
ALP (U/L)	173	120-198	0,213	0,446

Tabla 25. Test de correlación Rho de Spearman de CTCs con parámetros de inflamación, tumorales, hematológicos y de coagulación pre-trasplante. (CTCs: células tumorales circulantes; PCR: proteína C reactiva; AFP: alfa fetoproteína; CEA: antígeno carcinoembrionario; PQ: plaquetas; Leucos: leucocitos; RNL: ratio neutrófilos-linfocitos; TP: tiempo de protrombina).

	CTCs /10mL	PCR mg/dL	AFP ng/mL	CEA ng/mL	PQ x10³	Leucos x10³	RNL	TP seg
Mediana	13	0,46	6	4,05	88,20	4,57	2,28	12,60
RI	2-91	0,19-0,85	4-16	2,57-6,52	65-121	4,03-6,55	1,83-3,87	11,80-14,37
Rho Spearman		0,345	-0,062	0,158	-0,148	-0,300	-0,153	0,054
p		0,062	0,741	0,403	0,426	0,101	0,412	0,775

Tabla 26. Test U de Mann Whitney para la comparación de los niveles medianos de CTCs en pacientes con valores normales y elevados de marcadores bioquímicos, hematológicos y de coagulación.

Parámetro	Niveles	Nº pacientes	Niveles medianos de CTCs	U de Mann Whitney	p
Glucosa (mg/dL)	≤115	15	8 (RI:1-102)	107,50	0,620
	>115	16	18 (RI:4,25-42)		
Albúmina (g/dL)	≤5,2	31	13 (RI:2-91)	-	-
	>5,2	0	-		
Bilirrubina total (mg/dL)	≤1,20	22	8,50 (RI:0,75-26,25)	44	0,016
	>1,20	9	91 (RI:15,50-184,50)		
Ferritina (ng/mL)	≤400	25	13 (RI:2,50+77,50)	46,50	0,824
	>400	4	46 (RI:0,25-158,50)		
Triglicéridos (mg/dL)	≤150	26	8,50 (RI:1-62,50)	32,50	0,080
	>150	5	44 (RI:18-184,50)		
Colesterol (mg/dL)	≤190	23	9 (RI:1-36)	51,50	0,067
	>190	8	133,50 (RI:4,75-383)		
GOT (U/L)	≤40	13	8 (RI:1-57,50)	71,50	0,102
	>40	17	23 (RI:5,50-136)		
GPT (U/L)	≤41	18	9,50 (RI:1,75-170,75)	112	0,841
	>41	13	20 (RI:1,50-48,50)		
LDH (U/L)	≤225	21	13 (RI:1,50-96,50)	71	0,525
	>225	8	21,50 (RI:4,25-137)		
GGT (U/L)	≤71	11	8 (RI:0-91)	79,50	0,207
	>71	20	21,50 (RI:3-89,75)		
Fosfatasa Alcalina (U/L)	≤130	5	3 (RI:2-120,50)	18,50	0,423
	>130	10	5,50 (RI:0,75-20,75)		
PCR (mg/dL)	≤0,50	18	3 (RI:0-26,25)	52,50	0,018
	>0,50	12	33,50 (RI:9,25-182,25)		
AFP (ng/mL)	≤11	22	9 (RI:0,75-93,75)	76,50	0,326
	>11	9	20 (RI:6-108,50)		
CEA (ng/mL)	≤5	18	8,50 (RI:0-113,50)	83	0,288
	>5	12	18 (RI:4,25-89,75)		
Leucocitos (x10 ³)	<4,50	14	40 (RI:8-182,75)	70	0,051
	≥4,50	17	3 (RI:0,50-23)		
RNL	≤4	24	11,50 (RI:1-99,25)	76,50	0,722
	>4	7	16 (RI:3-53)		
Plaquetas (x10 ³)	≥150	7	3 (RI:1-23)	59	0,236
	<150	24	18 (RI:4,25-99,25)		
Tiempo protrombina (seg)	≤12,5	15	16 (RI:2-165)	109	0,884
	>12,5	15	10 (RI:3-91)		

5.4 ASOCIACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CTCs PRE-TRASPLANTE Y PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS

Tras aplicar el test de correlación de Spearman para evaluar la asociación entre los niveles de CTCs pre-trasplante y las variables demográficas y clínicas cuantitativas (edad, tiempo en lista de espera, tiempo desde el diagnóstico, número de LOES y número de TACES pre-trasplante), observamos que únicamente existió una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de CTCs pre-trasplante y los días transcurridos en lista de espera y el número de LOES hepáticas presentes en el hígado afecto ($p < 0,05$) (tabla 27).

Tabla 27. Test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación de CTCs pre-trasplante con variables cuantitativas, tanto demográficas (edad) como clínicas (tiempo en lista de espera, tiempo desde el diagnóstico, n° de LOES y n° de TACES pre-trasplante). (CTCs: células tumorales circulantes; LOES: lesiones ocupantes de espacio; TACES: quimioembolizaciones transarteriales).

Paciente	CTCs /10mL	Edad (años)	Tiempo en lista de espera (días)	Tiempo desde diagnóstico (meses)	N° LOES	TACES pre-trasplante
Mediana	13	60	99	7	2	1
RI	2-91	54-63	42-210	5-12	1-3	1-2
Rho Spearman		-0,088	0,366	0,128	0,370	0,257
p		0,640	0,043	0,494	0,040	0,163

Tras aplicar el test U de Mann Whitney para el estudio de la asociación de los niveles de CTCs pre-trasplante con las variables clínicas cualitativas dicotómicas (presencia/ausencia de invasión vascular, necrosis, metástasis y exitus post-trasplante) de los 31 pacientes, se observó que únicamente existía una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de CTCs pre-trasplante entre los pacientes con y sin invasión vascular ($p < 0,05$), siendo estos niveles significativamente superiores en pacientes con invasión vascular en comparación con los que no presentaron invasión vascular [539,00 CTCs/10 mL (RI:448,00-1768,00) vs. 8,50 CTCs/10 mL (RI:1,00-50,75)] (tabla 28).

Tabla 28. Test U de Mann Whitney para el estudio de la asociación de los niveles de CTCs pre-trasplante con variables clínicas cualitativas (presencia/ausencia de invasión vascular, necrosis, metástasis y exitus post-trasplante).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de CTCs	U de Mann Whitney	p
Invasión vascular	No	24	8,50 (RI:1,00-50,75)	0,000	0,005
	Sí	3	539,00 (RI:448,00-1768,00)		
Necrosis tumoral	No	9	13,00 (RI:1,50-291,50)	77	0,836
	Sí	18	9,50 (RI:1,00-117,75)		
Recidiva post-trasplante	No	24	9,00 (RI:1,00-89,75)	18	0,163
	Sí	3	91,00 (RI:9,00-1768,00)		
Exitus post-traplante	No	22	11,50 (RI:0,75-117,75)	47	0,616
	Sí	5	9,00 (RI:4,50-929,50)		

Tras aplicar el test de Kruskal Wallis para el estudio de la asociación de los niveles de CTCs pre-trasplante con variables clínicas cualitativas policotómicas (etiología) de los 31 pacientes, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en los niveles de CTCs pre-trasplante entre los diferentes grupos de pacientes ($p > 0,05$) (tabla 29).

Tabla 29. Test de Kruskal Wallis para el estudio de la asociación de los niveles de CTCs pre-trasplante con variables clínicas: etiología. (VHC: virus hepatitis C; ALCH: enolismo; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; VHB: virus hepatitis B; HEMO: hemocromatosis; GLUGOG: glucogenosis tipo III; CRIPTO: criptogénica).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de CTCs	χ^2	P
Etiología	VHC	10	22,50 (RI:0,00-93,75)	5,772	0,576
	ALCH	6	8,50 (RI:0,75-235,75)		
	EHNA	1	3,00		
	VHB	1	0,00		
	HEMO	1	8,00		
	GLUCOG	1	3,00		
	CRIPTO	3	44,00 (RI:13,00-188,00)		
	MIXTA	8	21,50 (RI:8,50-410,00)		

5.5 ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 E IL-8, CON LOS NIVELES DE CTCs Y AFP, ANTES Y DESPUÉS DEL TRASPLANTE, Y CON PARÁMETROS CLÍNICOS PRE-TRASPLANTE

Tras aplicar el test de correlación de Spearman para el estudio de la asociación de los niveles de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 e IL-8 con los niveles de CTCs, no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa entre ellos ($p > 0,05$), ni antes del trasplante (tabla 30), ni al mes (tabla 31), a los 6 meses (tabla 32), al año (tabla 33), ni a los 2 años tras el trasplante (tabla 34).

Tras aplicar el test de correlación de Spearman para el estudio de la asociación de los niveles de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 e IL-8 con los niveles de AFP, se encontró que únicamente existía una correlación positiva estadísticamente significativa ($p < 0,05$), entre los niveles de AFP y MMP-1 tanto antes del trasplante (tabla 30), como al mes post-trasplante (tabla 31), a los 6 meses post-trasplante (tabla 32), al año post-trasplante (tabla 33) y a los 2 años post-trasplante (tabla 34).

Además, se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de AFP y VEGF-C al año post-trasplante ($p < 0,05$) (tabla 33).

Tabla 30. Test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación de los niveles de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8, con niveles de CTCs y AFP pre-trasplante (CTCs: células tumorales circulantes; AFP: alfa-fetoproteína; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1; VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular C; OPN: osteopontina; IL-8: interleucina 8).

Paciente	CTCs /10mL	AFP (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)	VEGF-C (ng/mL)	OPN (ng/mL)	IL-8 (pg/mL)
Mediana	13	6	6,21	1,53	0,61	16,15	2,70
RI	2-91	4-16	3,64- 17,77	1,25-2,05	0,42-2,23	12,85-28,45	0,48-4,48
Rho Spearman con CTCs			-0,349	0,281	0,027	0,122	-0,029
p			0,054	0,125	0,887	0,514	0,900
Rho Spearman con AFP			-0,137	0,747	-0,255	0,128	-0,134
p			0,470	<0,001	0,174	0,502	0,574

Tabla 31. Test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación de los niveles de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8, con niveles de CTCs y AFP al mes post-trasplante (CTCs: células tumorales circulantes; AFP: alfa-fetoproteína; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1; VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular C; OPN: osteopontina; IL-8: interleucina 8).

Paciente	CTCs /10mL	AFP (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)	VEGF-C (ng/mL)	OPN (ng/mL)	IL-8 (pg/mL)
Mediana	4	2	9,58	1,27	0,67	35,42	0,76
RI	1-15	1-3	6,87- 14,54	1,20-1,32	0,50-0,88	20,81-45,62	0-3,03
Rho Spearman con CTCs			0,053	0,171	0,102	-0,008	0,050
p			0,806	0,424	0,636	0,969	0,836
Rho Spearman con AFP			-0,113	0,416	-0,063	0,011	-0,392
p			0,598	0,043	0,769	0,958	0,088

Tabla 32. Test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación de los niveles de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8, con niveles de CTCs y AFP a los 6 meses post-trasplante (CTCs: células tumorales circulantes; AFP: alfa-fetoproteína; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1; VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular C; OPN: osteopontina; IL-8: interleucina 8).

Paciente	CTCs /10mL	AFP (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)	VEGF-C (ng/mL)	OPN (ng/mL)	IL-8 (pg/mL)
Mediana	3	2	9,77	1,31	0,67	24,86	0,35
RI	0-19,50	2-8	6,07- 19,59	0,92-1,67	0,40-1,87	13,74-43,82	0-3,88
Rho Spearman con CTCs			0,068	0,263	-0,032	0,074	-0,210
p			0,789	0,291	0,898	0,770	0,492
Rho Spearman con AFP			-0,222	0,727	-0,334	0,272	0,050
p			0,376	0,001	0,174	0,275	0,870

Tabla 33. Test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación de los niveles de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8, con niveles de CTCs y AFP al año post-trasplante (CTCs: células tumorales circulantes; AFP: alfa-fetoproteína; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1; VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular C; OPN: osteopontina; IL-8: interleucina 8).

Paciente	CTCs /10mL	AFP (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)	VEGF-C (ng/mL)	OPN (ng/mL)	IL-8 (pg/mL)
Mediana	2	2	7,76	1,28	0,70	20,48	0
RI	0,50- 6,50	2-4	6,09- 20,50	1,22-1,34	0,44-2,39	12,72-29,52	0-1,19
Rho Spearman con CTCs			-0,198	-0,154	0,050	-0,152	-0,263
p			0,417	0,530	0,839	0,533	0,326
Rho Spearman con AFP			-0,097	0,632	0,576	0,405	0,205
p			0,694	0,004	0,010	0,086	0,446

Tabla 34. Test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación de los niveles de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8, con niveles de CTCs y AFP a los 2 años post-trasplante (CTCs: células tumorales circulantes; AFP: alfa-fetoproteína; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1; VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular C; OPN: osteopontina; IL-8: interleucina 8).

Paciente	CTCs /10mL	AFP (ng/mL)	GPC3 (ng/mL)	MMP-1 (ng/mL)	VEGF-C (ng/mL)	OPN (ng/mL)	IL-8 (pg/mL)
Mediana	6	3	6,23	1,26	0,57	13,47	0,04
RI	1-9	2-5	3,57- 10,52	1,02-1,48	0,34-2,11	8,42-17,72	0-1,40
Rho Spearman con CTCs			0,257	0,262	0,437	0,579	-0,520
p			0,445	0,436	0,179	0,062	0,187
Rho Spearman con AFP			0,438	0,706	0,315	0,165	-0,634
p			0,178	0,015	0,345	0,628	0,091

Tras aplicar el test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación de los niveles de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8 pre-trasplante con las variables clínicas: tiempo en lista de espera, tiempo desde el diagnóstico, nº de TACES, nº LOES, SG y SLE desde el trasplante, únicamente se encontró una correlación negativa estadísticamente significativa entre el nº de TACES pre-trasplante y los niveles de GPC3 ($p < 0,05$) (tabla 35).

Tabla 35. Test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación de los niveles de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8 pre-trasplante, con variables clínicas: tiempo en lista de espera, tiempo desde el diagnóstico, nº de TACES pre-trasplante, nº LOES, SG y SLE desde el trasplante. (TACES: quimioembolizaciones transarteriales; GPC3: glipicano-3; MMP-1: metaloproteasa-1; VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular C; OPN: osteopontina; IL-8: interleucina 8; LOES: lesiones ocupantes de espacio; SG: supervivencia general; SLE: supervivencia libre de enfermedad; TX: trasplante).

	Tiempo en lista (días)	Tiempo desde diagnóstico (meses)	TACES	LOES	SG (meses)	SLE (meses)
GPC3 (ng/mL)	-0,194 p=0,295	0,273 p=0,138	-0,419 p=0,019	-0,385 p=0,096	0,077 p=0,702	0,151 p=0,454
MMP-1 (ng/mL)	-0,192 p=0,300	-0,315 p=0,084	-0,079 p=0,675	0,255 p=0,167	0,443 p=0,124	0,376 p=0,053
VEGF-C (ng/mL)	-0,053 p=0,779	0,029 p=0,875	0,190 0,305	-0,058 p=0,755	0,116 p=0,564	0,093 p=0,643
OPN (ng/mL)	0,259 p=0,159	0,007 p=0,971	0,318 0,082	-0,037 p=0,845	0,085 p=0,674	0,046 p=0,643
IL-8 (pg/mL)	0,020 p=0,933	0,285 p=0,211	-0,082 0,725	-0,136 p=0,557	0,093 p=0,696	0,125 p=0,600

Tras aplicar el test U de Mann Whitney para el estudio de la asociación de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 y IL-8 pre-trasplante, con la presencia de recidiva/metástasis post-trasplante y con la presencia/ausencia de invasión vascular y necrosis tumoral del hígado afecto trasplantado (tablas 36, 37, 38, 39 y 40), se observó únicamente una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de GPC3 pre-trasplante con la presencia/ausencia de necrosis tumoral del hígado afecto ($p < 0,05$), de manera, que aquellos pacientes que no presentaron necrosis hepática tenían mayores niveles

medianos de GPC3 [17,78 ng/mL (RI:9,17-27,81) vs 5,23 ng/mL (RI:2,01-14,36)] (tabla 39).

Tabla 36. Test U de Mann Whitney para el estudio de la asociación de los niveles de MMP1 pre-trasplante con variables clínicas (presencia/ausencia de invasión vascular, necrosis y recidiva post-trasplante).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de MMP-1 (ng/mL)	U de Mann Whitney	p
Invasión vascular	No	24	1,46 (RI:1,15-1,70)	19	0,190
	Sí	3	1,64 (RI:1,54-2,15)		
Necrosis tumoral	No	9	1,48 (RI:1,22-1,89)	81	0,825
	Sí	18	1,49 (RI:1,14-1,75)		
Recidiva post-trasplante	No	24	1,47 (RI:1,15-1,70)	26	0,440
	Sí	3	1,64 (RI:1,28-2,06)		

Tabla 37. Test U de Mann Whitney para el estudio de la asociación de los niveles de VEGF-C pre-trasplante con variables clínicas (presencia/ausencia de invasión vascular, necrosis y recidiva post-trasplante).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de VEGF-C (ng/mL)	U de Mann Whitney	p
Invasión vascular	No	24	0,77 (RI:0,49-2,42)	32	0,758
	Sí	3	0,55 (RI:0,37-5,35)		
Necrosis tumoral	No	9	0,83 (RI:0,52-3,26)	77	0,676
	Sí	18	0,65 (RI:0,40-2,87)		
Recidiva post-trasplante	No	24	0,77 (RI:0,49-2,42)	30,50	0,671
	Sí	3	0,57 (RI:0,26-5,35)		

Tabla 38. Test U de Mann Whitney para el estudio de la asociación de los niveles de OPN pre-trasplante con variables clínicas (presencia/ausencia de invasión vascular, necrosis y recidiva post-trasplante).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de OPN (ng/mL)	U de Mann Whitney	p
Invasión vascular	No	24	15,61 (RI:11,93-24,95)	17	0,143
	Sí	3	28,46 (RI:20,40-33,74)		
Necrosis tumoral	No	9	21,68 (RI:12,21-31,10)	82	0,863
	Sí	18	16,05 (RI:12,55-24,02)		
Recidiva post-trasplante	No	24	17,10 (RI:12,87-27,24)	35	0,939
	Sí	3	16,02 (RI:11,63-28,46)		

Tabla 39. Test U de Mann Whitney para el estudio de la asociación de los niveles de GPC3 pre-trasplante con variables clínicas (presencia/ausencia de invasión vascular, necrosis y recidiva post-trasplante).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de GPC3 (ng/mL)	U de Mann Whitney	p
Invasión vascular	No	24	7,66 (RI:3,46-22,03)	34	0,877
	Sí	3	5,75 (RI:5,29-18,13)		
Necrosis tumoral	No	9	17,78 (RI:9,17-27,81)	39	0,022
	Sí	18	5,23 (RI:2,01-14,36)		
Recidiva post-trasplante	No	24	10,93 (RI:3,86-22,12)	15	0,105
	Sí	3	4,72 (RI:1,26-5,29)		

Tabla 40. Test U de Mann Whitney para el estudio de la asociación de los niveles de IL-8 pre-trasplante con variables clínicas (presencia/ausencia de invasión vascular, necrosis y recidiva post-trasplante).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de IL-8 (pg/mL)	U de Mann Whitney	p
Invasión vascular	No	17	2,27 (RI:0,34-3,59)	12	0,152
	Sí	3	9,37 (RI:1,22-11,20)		
Necrosis tumoral	No	7	2,70 (RI:1,22-4,86)	41	0,721
	Sí	13	2,27 (RI:0,34-5,66)		
Recidiva post-trasplante	No	17	2,91 (RI:0,73-6,27)	12	0,152
	Sí	3	0,59 (RI:0,30-1,22)		

Tras aplicar el test Kruskal-Wallis para el estudio de la asociación de los niveles MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 y IL-8 pre-trasplante con la etiología de la cirrosis, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) (tablas 41, 42, 43, 44 y 45).

Tabla 41. Test de Kruskal Wallis para el estudio de la asociación de los niveles de MMP-1 pre-trasplante con etiología de la cirrosis. (MMP-1: metaloproteasa-1; VHC: virus hepatitis C; ALCH: enolismo; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; VHB: virus hepatitis B; HEMO: hemocromatosis; GLUGOG: glucogenosis tipo III; CRIPTO: criptogénica).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de MMP1 (ng/mL)	χ^2	p
Etiología	VHC	10	1,68 (RI:1,27-2,10)	9,86	0,197
	ALCH	6	1,34 (RI:1,09-2,00)		
	EHNA	1	2,65		
	VHB	1	0,90		
	HEMO	1	1,51		
	GLUCOG	1	1,10		
	CRIPTO	3	1,46 (RI:1,17-1,47)		
	MIXTA	8	1,81 (RI:1,42-2,52)		

Tabla 42. Test de Kruskal Wallis para el estudio de la asociación de los niveles de VEGF-C pre-trasplante con etiología de la cirrosis. (VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular-C; VHC: virus hepatitis C; ALCH: enolismo; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; VHB: virus hepatitis B; HEMO: hemocromatosis; GLUGOG: glucogenosis tipo III; CRIPTO: criptogénica).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de VEGF-C (ng/mL)	χ^2	p
Etiología	VHC	10	0,59 (RI:0,45-2,07)	7,87	0,344
	ALCH	6	1,22 (RI:0,34-3,74)		
	EHNA	1	0,37		
	VHB	1	0,32		
	HEMO	1	4,03		
	GLUCOG	1	0,37		
	CRIPTO	3	2,23 (RI:0,83-5,25)		
	MIXTA	8	0,63 (RI:0,51-0,91)		

Tabla 43. Test de Kruskal Wallis para el estudio de la asociación de los niveles de OPN pre-trasplante con la etiología de la cirrosis. (OPN: osteopontina; VHC: virus hepatitis C; ALCH: enolismo; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; VHB: virus hepatitis B; HEMO: hemocromatosis; GLUGOG: glucogenosis tipo III; CRIPTO: criptogénica).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de OPN (ng/mL)	χ^2	P
Etiología	VHC	10	16,08 (RI:12,99-28,94)	3,61	0,823
	ALCH	6	17,26 (RI:11,73-35,10)		
	EHNA	1	13,11		
	VHB	1	21,67		
	HEMO	1	9,15		
	GLUCOG	1	27,76		
	CRIPTO	3	18,06 (RI:13,90-51,76)		
	MIXTA	8	17,45 (RI:11,46-31,65)		

Tabla 44. Test de Kruskal Wallis para el estudio de la asociación de los niveles de GPC3 pre-trasplante con la etiología de la cirrosis. (GPC3: glipicano 3; VHC: virus hepatitis C; ALCH: enolismo; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; VHB: virus hepatitis B; HEMO: hemocromatosis; GLUGOG: glucogenosis tipo III; CRIPTO: criptogénica).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de GPC3 (ng/mL)	χ^2	p
Etiología	VHC	10	5,60 (RI:3,17-14,36)	4,24	0,751
	ALCH	6	14,60 (RI:3,68-41,17)		
	EHNA	1	5,92		
	VHB	1	31,88		
	HEMO	1	4,48		
	GLUCOG	1	6,50		
	CRIPTO	3	4,86 (RI:2,07-17,77)		
	MIXTA	8	10,93 (RI:3,46-17,05)		

Tabla 45. Test de Kruskal Wallis para el estudio de la asociación de los niveles de IL-8 pre-trasplante con la etiología de la cirrosis. (IL-8: interleucina 8; VHC: virus hepatitis C; ALCH: enolismo; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; VHB: virus hepatitis B; HEMO: hemocromatosis; GLUGOG: glucogenosis tipo III; CRIPTO: criptogénica).

Variable		Nº pacientes	Niveles medianos de IL-8 (pg/mL)	χ^2	p
Etiología	VHC	9	2,27 (RI:0,15-3,50)	5,43	0,246
	ALCH	2	11,87 (RI:9,37-14,37)		
	EHNA	0	-		
	VHB	0	-		
	HEMO	1	3,55		
	GLUGOG	0	-		
	CRIPTO	3	2,14 (RI:1,07-4,86)		
	MIXTA	6	2,12 (RI:0,29-5,52)		

5.6 COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE CTCs Y OTROS MARCADORES TUMORALES (AFP, MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3, IL-8) PRE Y POST-TRASPLANTE

Tras aplicar el test de Wilcoxon para la comparación de los niveles medianos de CTCs antes y después del trasplante, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de CTCs pre-trasplante y los niveles de CTCs al mes, al año y a los 2 años post-trasplante ($p < 0,05$) (tabla 46). Se observó que los niveles medianos de CTCs de los pacientes incluidos en el estudio, presentaron una tendencia descendente tras el trasplante hepático (figura 15).

Tabla 46. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas, para la comparación de los niveles medianos de CTCs antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (CTCs: células tumorales circulantes).

	CTCs /10mL Pre- trasplante	CTCs /10mL 1 mes post- trasplante	CTCs /10mL 6 meses post- trasplante	CTCs /10mL 1 año post- trasplante	CTCs /10mL 2 años post- trasplante
N	31	25	18	21	15
Mediana	13	4	3	2	6
RI	2-91	1-15	0-19,50	0,50-6,50	1-9
Z		-2,160	-1,303	-2,577	-2,076
p		0,031	0,192	0,010	0,038

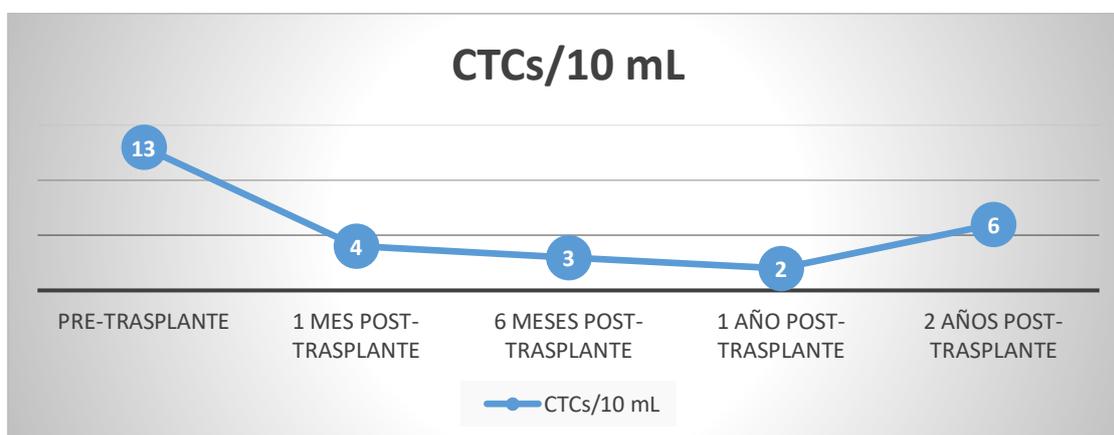


Figura 15. Evolución de los niveles medianos de CTCs de los pacientes incluidos en el presente estudio, medidos por el sistema Isoflux®, en el periodo de tiempo transcurrido entre antes del trasplante, hasta los 2 años tras el trasplante.

De igual forma que con las CTCs, encontramos que tras aplicar el test de Wilcoxon para la comparación de los niveles medianos de AFP antes y después del trasplante, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de AFP pre-trasplante y los niveles de AFP al mes, al año y a los 2 años post-trasplante ($p < 0,05$) (tabla 47). También se observó cómo, claramente, los niveles medianos de AFP de los pacientes incluidos en el estudio, presentaron una tendencia descendente tras el trasplante hepático (figura 16).

Tabla 47. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de AFP antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (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
N	31	25	18	21	15
Mediana	6	2	2	2	3
RI	4-16	1-3	2-8	2-4	2-5
Z		-3,903	-0,712	-3,049	-2,690
p		<0,001	0,477	0,002	0,007

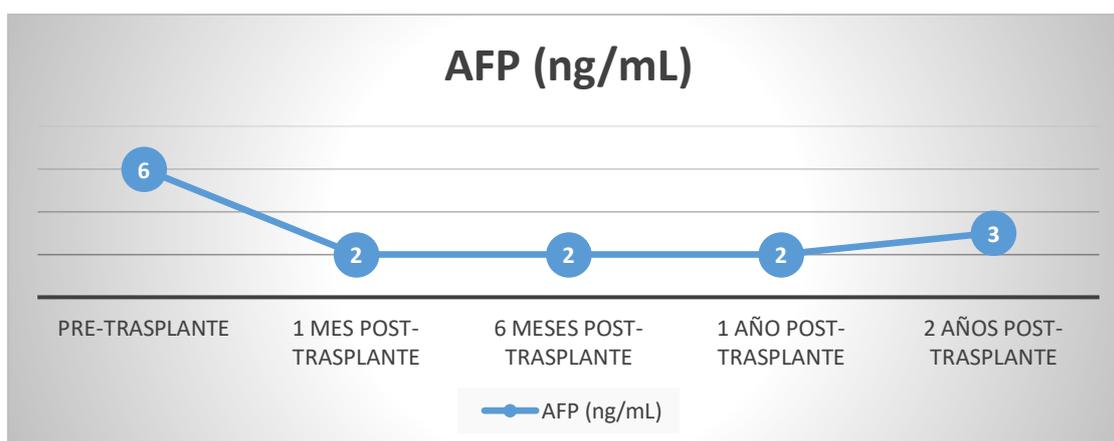


Figura 16. Evolución de los niveles medianos de AFP de los pacientes incluidos en el presente estudio, en el periodo de tiempo transcurrido entre antes del trasplante, hasta los 2 años tras el trasplante.

Tras aplicar el test de Wilcoxon para la comparación de los niveles medianos de GPC3 antes y después del trasplante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de GPC3 pre-trasplante y los niveles de GPC3 post-trasplante ($p > 0,05$) (tabla 48). Se observó que los niveles medianos de GPC3 de los pacientes incluidos en el estudio, se mantuvieron estables tras el trasplante hepático (figura 17).

Tabla 48. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de GPC3 antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (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
N	31	24	18	19	11
Mediana	6,21	9,58	9,78	7,76	6,24
RI	3,65-17,77	6,87-14,54	6,07-19,59	6,10-20,50	3,57-10,53
Z		-0,886	-1,067	-0,282	-0,178
p		0,376	0,286	0,778	0,859

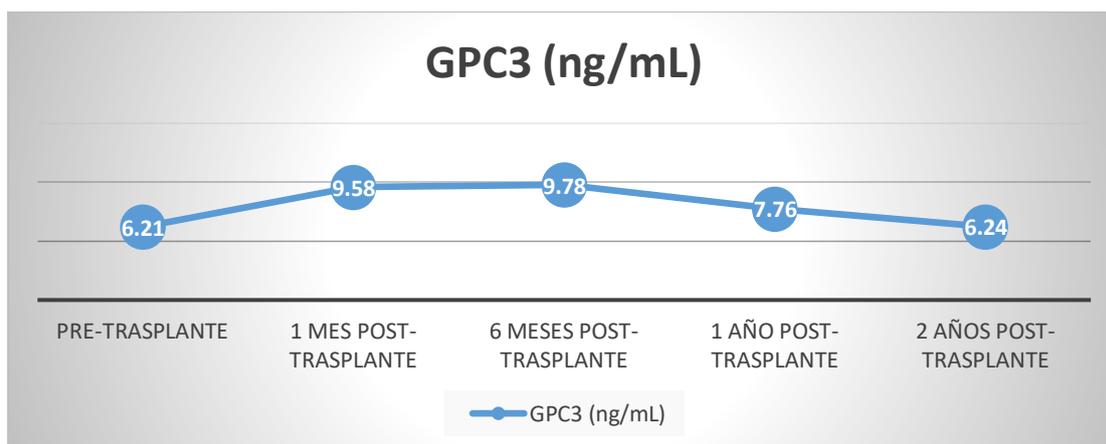


Figura 17. Evolución de los niveles medianos de GPC3 de los pacientes incluidos en el presente estudio, en el periodo de tiempo transcurrido entre antes del trasplante, hasta los 2 años tras el trasplante.

Tras aplicar el test de Wilcoxon para la comparación de los niveles medianos de MMP-1 antes y después del trasplante, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de MMP-1 pre-trasplante y los niveles de MMP-1 al mes, al año y a los 2 años post-trasplante ($p < 0,05$) (tabla 49). También se observó cómo, claramente, los niveles medianos de MMP-1 de los pacientes incluidos en el estudio, presentaron una tendencia descendente tras el trasplante hepático y se mantuvieron estables hasta los 2 años (figura 18).

Tabla 49. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de MMP-1 antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (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
N	31	24	18	19	11
Mediana	1,54	1,27	1,32	1,28	1,26
RI	1,26-2,06	1,21-1,32	0,93-1,67	1,22-1,35	1,03-1,48
Z		-3,696	-1,045	-2,616	-2,138
p		<0,001	0,296	0,009	0,033

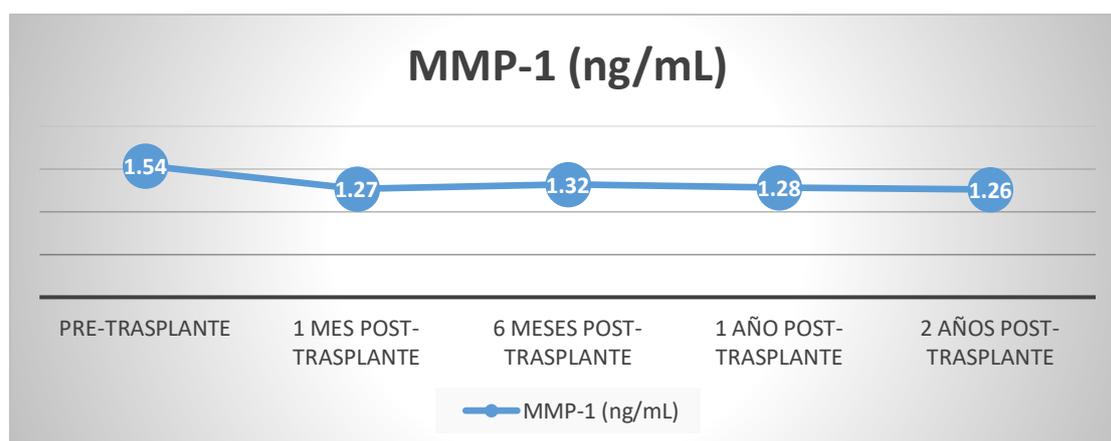


Figura 18. Evolución de los niveles medianos de MMP-1 de los pacientes incluidos en el presente estudio, en el periodo de tiempo transcurrido entre antes del trasplante, hasta los 2 años tras el trasplante.

Tras aplicar el test de Wilcoxon para la comparación de los niveles medianos de VEGF-C antes y después del trasplante, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de VEGF-C pre-trasplante y los niveles de VEGF-C a los 6 meses y al año post-trasplante ($p < 0,05$) (tabla 50), siendo estos dos últimos, mayores. Observando la evolución de los niveles medianos de VEGF-C a lo largo de los 2 años post-trasplante, se observa que, aunque los niveles aumenten levemente tras el trasplante, finalmente descienden a los 2 años, aunque esta disminución no sea significativa (figura 19).

Tabla 50. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de VEGF-C antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular C).

	VEGF-C (ng/mL) Pre- trasplante	VEGF-C (ng/mL) 1 mes post- trasplante	VEGF-C (ng/mL) 6 meses post- trasplante	VEGF-C (ng/mL) 1 año post- trasplante	VEGF-C (ng/mL) 2 años post- trasplante
N	31	24	18	19	11
Mediana	0,61	0,67	0,68	0,70	0,57
RI	0,42-2,23	0,50-0,88	0,40-1,87	0,44-2,39	0,35-2,12
Z		-1,657	-2,107	-1,992	-0,968
p		0,097	0,035	0,046	0,333

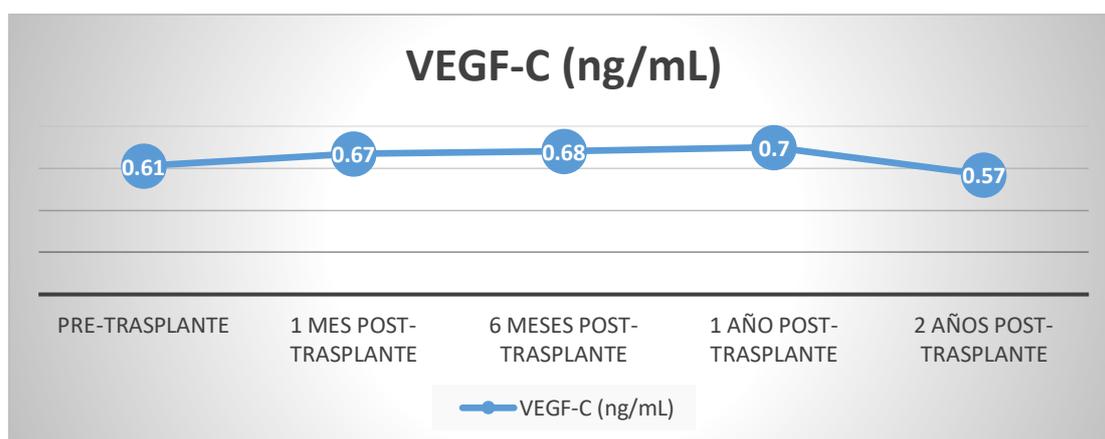


Figura 19. Evolución de los niveles medianos de VEGF-C de los pacientes incluidos en el presente estudio, en el periodo de tiempo transcurrido entre antes del trasplante, hasta los 2 años tras el trasplante.

Tras aplicar el test de Wilcoxon para la comparación de los niveles medianos de OPN antes y después del trasplante, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de OPN pre-trasplante y los niveles de OPN al mes, a los 6 meses y a los 2 años post-trasplante ($p < 0,05$) (tabla 51), siendo los niveles medianos significativamente superiores al mes y a los 6 meses, e inferiores a los 2 años post-trasplante. La evolución de los niveles medianos de OPN a lo largo de los 2 años post-trasplante, muestra que, a pesar de haber un incremento significativo de los niveles tras la cirugía, estos adoptan una pauta descendente, llegando incluso a valores inferiores a los 2 años post-trasplante (figura 20).

Tabla 51. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de OPN antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (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
N	31	24	18	19	11
Mediana	16,15	35,42	24,86	20,49	13,47
RI	12,86-28,46	20,82-45,63	13,74-43,82	12,73-29,53	8,43-17,73
Z		-3,457	-3,070	-1,851	-2,845
p		0,001	0,002	0,064	0,004

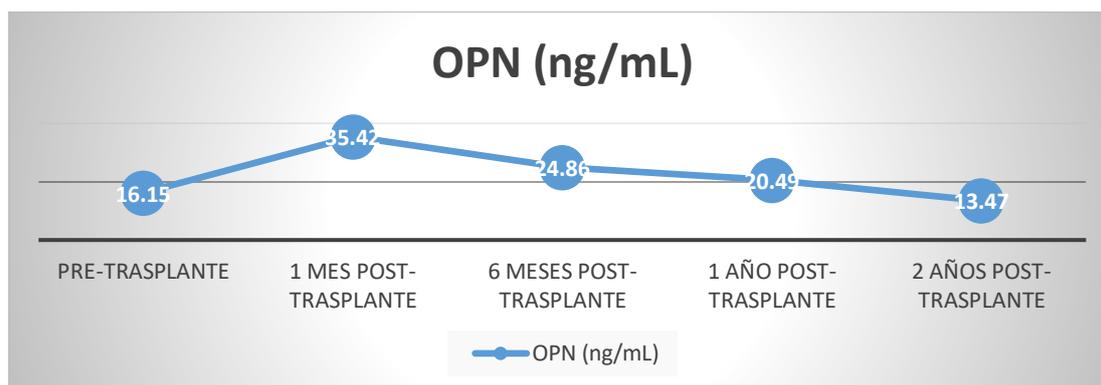


Figura 20. Evolución de los niveles medianos de OPN de los pacientes incluidos en el presente estudio, en el periodo de tiempo transcurrido entre antes del trasplante, hasta los 2 años tras el trasplante.

Tras aplicar el test de Wilcoxon para la comparación de los niveles medianos de IL-8 antes y después del trasplante, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de IL-8 pre-trasplante y los niveles de IL-8 al año post-trasplante ($p < 0,05$) (tabla 52). Aunque las diferencias entre los niveles de IL-8 pre- y post-trasplante no fueron significativas (a excepción del año post-trasplante), se observó cómo, claramente, los niveles medianos de IL-8 de los pacientes incluidos en el estudio, presentaron una tendencia descendente tras el trasplante hepático (figura 21).

Tabla 52. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de IL-8 antes y después del trasplante (al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años) (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
N	21	20	18	16	8
Mediana	2,70	0,76	0,35	0,00	0,045
RI	0,49-4,48	0,00-3,03	0,00-3,88	0,00-1,19	0,00-1,40
Z		-1,415	-1,255	-2,354	-1,680
p		0,157	0,209	0,019	0,093

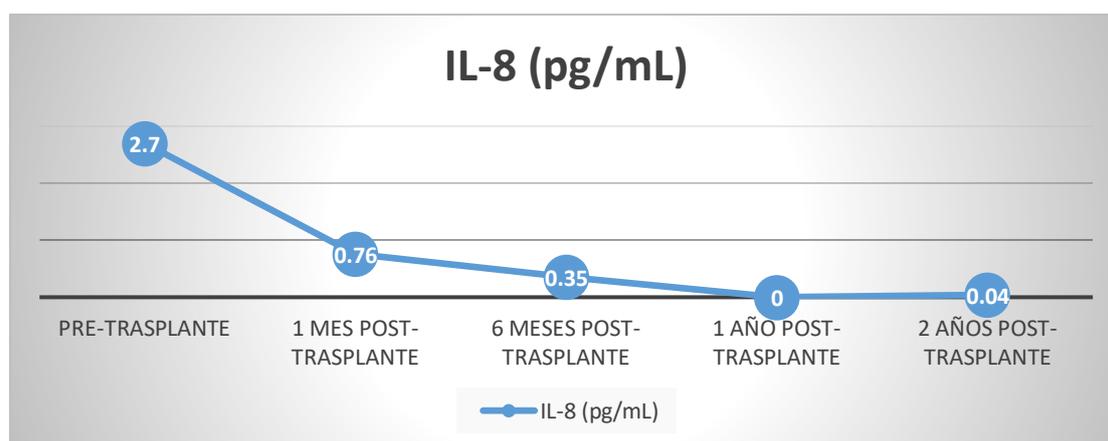


Figura 21. Evolución de los niveles medianos de IL-8 de los pacientes incluidos en el presente estudio, en el periodo de tiempo transcurrido entre antes del trasplante, hasta los 2 años tras el trasplante.

Tras separar los pacientes que presentaron invasión vascular por el tumor en el hígado trasplantado y los que no, y tras aplicar el test de Wilcoxon para el estudio de los niveles medianos de CTCs, AFP, MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 e IL-8 antes y después del trasplante en ambos grupos de pacientes, encontramos diferencias significativas en los niveles de AFP y MMP-1 pre-trasplante y post-trasplante, en los pacientes sin invasión vascular ($p < 0,05$) (tablas 54 y 56). En estos pacientes, observamos como los niveles de AFP y MMP-1 descendieron al mes y al año post-trasplante.

Además, encontramos una disminución significativa de los niveles de IL-8 al año post-trasplante, en los pacientes sin invasión vascular ($p < 0,05$) (tabla 59).

Tabla 53. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas, para la comparación de los niveles medianos de CTCs antes y después del trasplante (al mes y al año), en pacientes con invasión y sin invasión vascular (CTCs: células tumorales circulantes).

Pacientes sin invasión	CTCs/10mL Pre-trasplante	CTCs/10mL 1 mes Post-trasplante	CTCs/10mL 1 año Post-trasplante
Mediana	8,50	4	2
RI	1-50,75	1-12,50	0,75-4,75
Z		-1,494	-1,915
p		0,135	0,056
Pacientes con invasión			
Mediana	539	13	6
RI	448-1768	3-70	0-9
Z		-1,604	-1,604
p		0,109	0,109

Tabla 54. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de AFP antes y después del trasplante (al mes y al año), en pacientes con invasión y sin invasión vascular (AFP: alfa-fetoproteína).

Pacientes sin invasión	AFP (ng/mL) Pre-trasplante	AFP (ng/mL) 1 mes Post-trasplante	AFP (ng/mL) 1 año Post-trasplante
Mediana	6	2	2
RI	3,25-7	1-3,25	2-4
Z		-3,594	-3,466
p		<0,001	0,001
Pacientes con invasión			
Mediana	11	2	2
RI	4-14	2-2	1-163
Z		-1,604	0,000
p		0,109	1,000

Tabla 55. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de GPC3 antes y después del trasplante (al mes y al año), en pacientes con invasión y sin invasión vascular (GPC3: glipicano-3).

Pacientes sin invasión	GPC3 (ng/mL) Pre-trasplante	GPC3 (ng/mL) 1 mes Post-trasplante	GPC3 (ng/mL) 1 año Post-trasplante
Mediana	7,66	7,65	8,17
RI	3,46-22,03	6,44-14,15	6,31-20,64
Z		-0,295	-0,052
p		0,768	0,959
Pacientes con invasión			
Mediana	5,75	13,73	7,42
RI	5,29-18,13	10,89-22,55	5,40-20,50
Z		-1,604	-1,604
p		0,109	0,109

Tabla 56. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de MMP-1 antes y después del trasplante (al mes y al año), en pacientes con invasión y sin invasión vascular (MMP-1: metaloproteasa-1).

Pacientes sin invasión	MMP-1 (ng/mL) Pre-trasplante	MMP-1 (ng/mL) 1 mes Post-trasplante	MMP-1 (ng/mL) 1 año Post-trasplante
Mediana	1,46	1,27	1,28
RI	1,15-1,70	1,21-1,34	1,23-1,34
Z		-3,342	-2,948
p		0,001	0,003
Pacientes con invasión			
Mediana	1,64	1,27	1,27
RI	1,54-2,15	1,21-1,27	1,16-5,33
Z		-1,604	0,000
p		0,109	1,000

Tabla 57. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de VEGF-C antes y después del trasplante (al mes y al año), en pacientes con invasión y sin invasión vascular (VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular C).

Pacientes sin invasión	VEGF-C (ng/mL) Pre-trasplante	VEGF-C (ng/mL) 1 mes Post-trasplante	VEGF-C (ng/mL) 1 año Post-trasplante
Mediana	0,77	0,66	0,73
RI	0,49-2,42	0,47-1,07	0,44-2,31
Z		-1,721	-1,706
p		0,085	0,088
Pacientes con invasión			
Mediana	0,55	0,79	0,65
RI	0,37-5,35	0,50-0,81	0,30-2,39
Z		0,000	-0,535
p		1,000	0,593

Tabla 58. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de OPN antes y después del trasplante (al mes y al año), en pacientes con invasión y sin invasión vascular (OPN: osteopontina).

Pacientes sin invasión	OPN (ng/mL) Pre-trasplante	OPN (ng/mL) 1 mes Post-trasplante	OPN (ng/mL) 1 año Post-trasplante
Mediana	15,61	30,75	19,05
RI	11,93-24,95	19,77-45,08	12,12-24,15
Z		-3,111	-1,706
p		0,002	0,088
Pacientes con invasión			
Mediana	28,46	42,47	43,66
RI	20,40-33,74	37,75-59,82	26,91-173,88
Z		-1,604	-1,069
p		0,109	0,285

Tabla 59. Test de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas para la comparación de los niveles medianos de IL-8 antes y después del trasplante (al mes y al año), en pacientes con invasión y sin invasión vascular (IL-8: interleucina 8).

Pacientes sin invasión	IL-8 (pg/mL) Pre- trasplante	IL-8 (pg/mL) 1 mes Post-trasplante	IL-8 (pg/mL) 1 año Post-trasplante
Mediana	2,27	1,79	0,00
RI	0,34-3,59	0,00-3,58	0,00-0,92
Z		-0,682	-2,845
p		0,496	0,004
Pacientes con invasión			
Mediana	5,29	0,00	0,00
RI	0,59-10,74	0,00-0,00	0,00-10,32
1,Z		-1,826	-0,365
p		0,068	0,715

Los pacientes 4, 10 y 16 incluidos en el presente estudio, presentaron metástasis/recidiva tumoral tras el trasplante hepático.

El paciente 4, presentó metástasis ósea, de pulmón y hepática a los 6 meses tras el trasplante. En él, se observó unos niveles pre-trasplante elevados de CTCs (Me=13 CTCs/10mL), que posteriormente disminuyeron tras la cirugía. Además, se observó un incremento notable de los niveles de AFP, MMP-1, GPC3, OPN e IL-8 tras el trasplante, alcanzando los valores máximos a los 6 meses, coincidiendo con la recidiva. VEGF-C se mantuvo con niveles estables (figura 22).

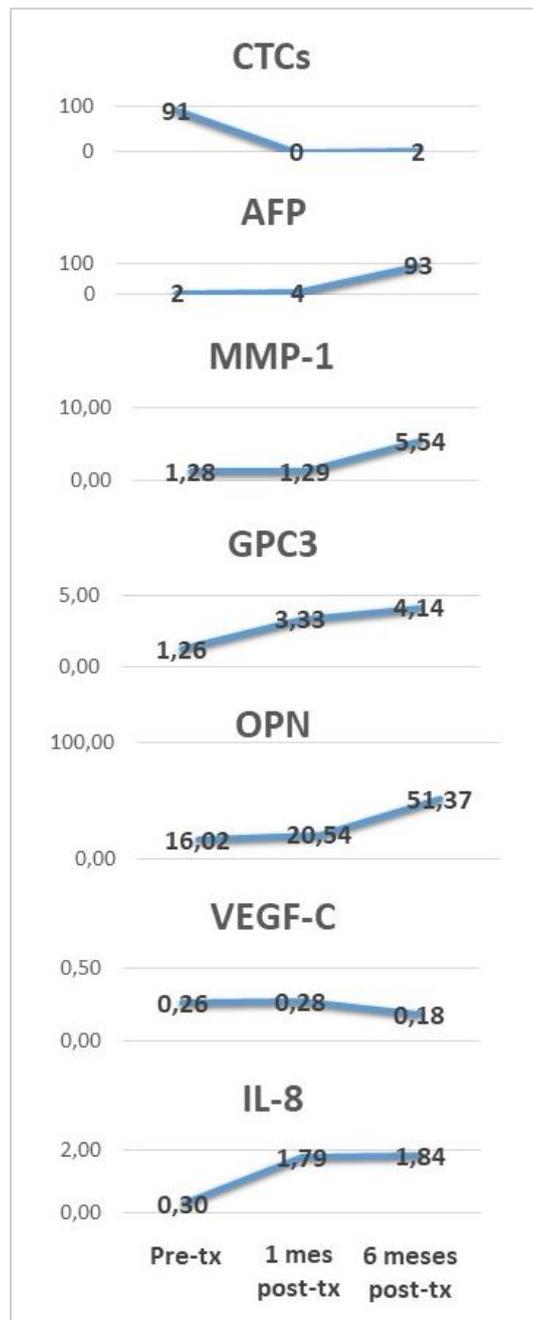


Figura 22. Niveles pre- y post-trasplante de CTCs, AFP, MMP-1, GPC3, OPN, VEGF-C e IL-8, en el paciente 4.

El paciente 10, presentó metástasis suprarrenal bilateral a los 6 meses tras el trasplante. En él, se observó unos niveles de CTCs y AFP pre-trasplante elevados. Tras el trasplante, entre el mes y los 6 meses, se observó un aumento considerable de AFP, MMP-1, GPC3, OPN e IL-8. VEGF-C se mantuvo en niveles más o menos estables (figura 23).

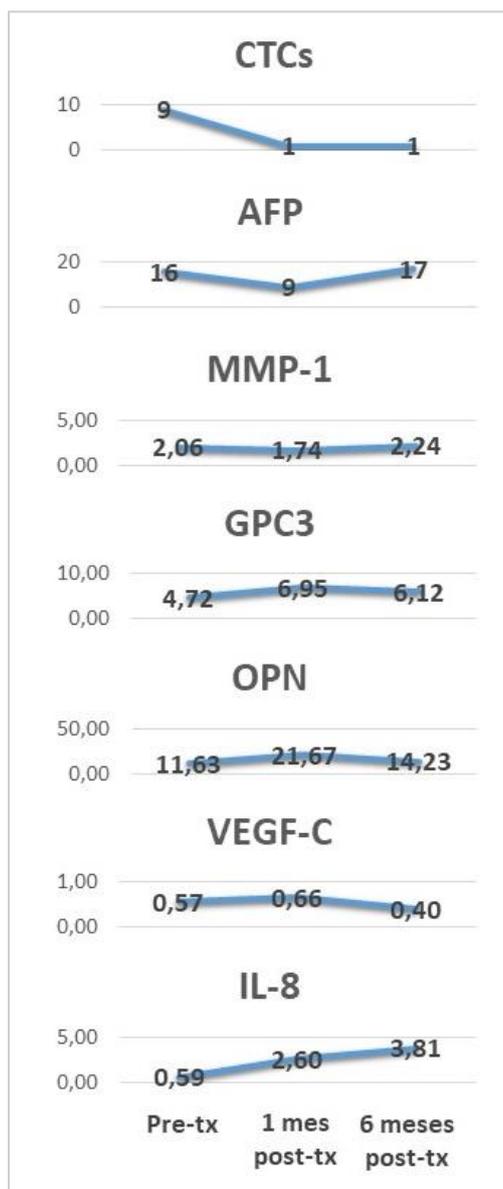


Figura 23. Niveles pre- y post-trasplante de CTCs, AFP, MMP-1, GPC3, OPN, VEGF-C e IL-8, en el paciente 10.

El paciente 16, presentó metástasis óseas y hepáticas a los 6 meses tras el trasplante. En él, se observó tras el trasplante, un incremento brusco de AFP, MMP-1, OPN e IL-8. GPC3 aumentó tras el trasplante, pero luego se mantuvo como el valor inicial pre-trasplante. VEGF-C inicialmente descendió, pero a partir del año aumentó su valor (figura 24).

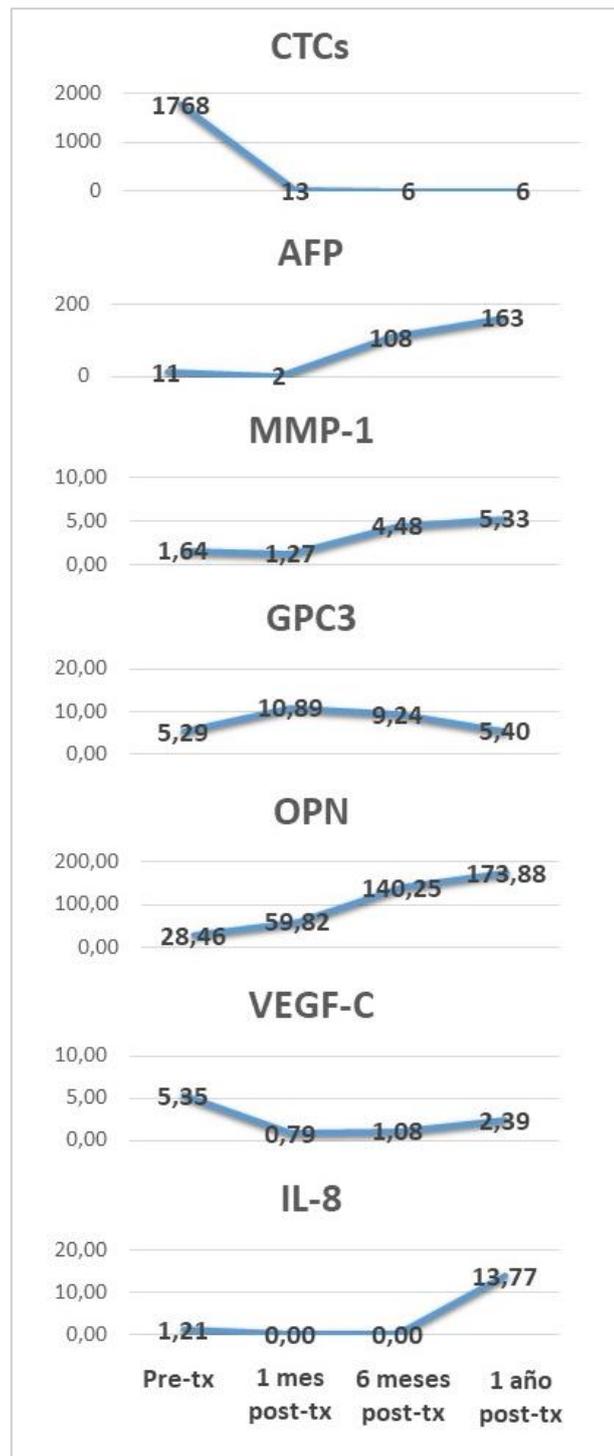


Figura 24. Niveles pre- y post-trasplante de CTCs, AFP, MMP-1, GPC3, OPN, VEGF-C e IL-8, en el paciente 16.

5.7 DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA EN LA PREDICCIÓN DE RECIDIVA POST-TRASPLANTE DE LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CTCs, AFP Y MMP-1 PRE-TRASPLANTE

Del total de 31 pacientes incluidos en el estudio, 27 de ellos fueron sometidos a trasplante hepático, de los cuales, un total de 3 pacientes tuvieron metástasis/recidiva tras el trasplante (pacientes 4, 10 y 16).

Tras la elaboración de la curva ROC para la determinación de la eficacia de predicción de recidiva/metástasis post-trasplante de los niveles de CTCs pre-trasplante, se determinó un AUC= 0,750 (75%) (IC95% 0,487-1,013 y p=0,165) (figura 25). Por lo que los niveles de CTCs pre-trasplante podrían predecir con un 75% de probabilidad, la aparición de recidiva/metástasis post-trasplante.

El mejor punto de corte de CTCs para predecir recidiva/metástasis post-trasplante con mejor S y E, correspondiente al máximo índice Youden (0,5), correspondió a ≥ 8.5 CTCs/10 mL, con una S=100% y una E=50% (figura 26).

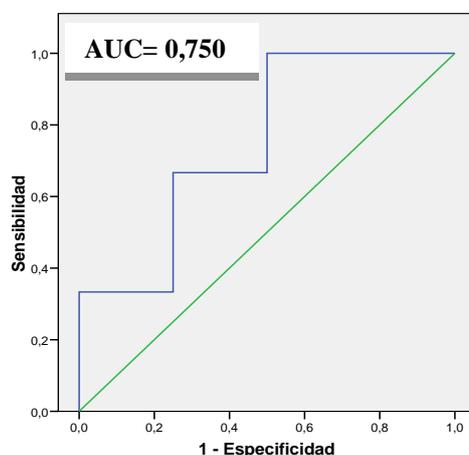


Figura 25. Curva ROC de CTCs pre-trasplante, para la predicción de recidiva/metástasis post-trasplante (AUC: área bajo la curva).

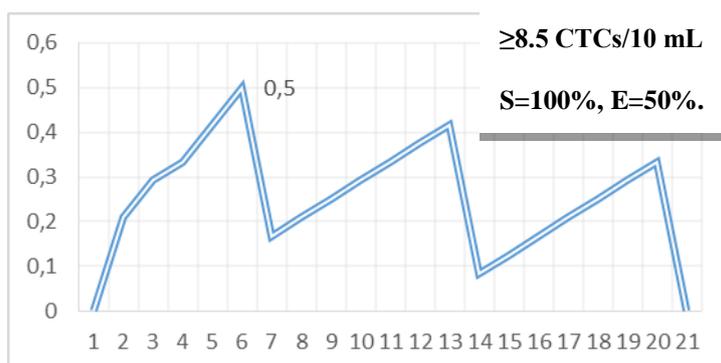


Figura 26. Máximo Índice Youden para CTCs pre-trasplante (0,5): relación entre S y 1-E que optimiza el valor de S y E para la predicción de recidiva/metástasis de la determinación de CTCs pre-trasplante (S: sensibilidad; E: especificidad).

Tras la elaboración de la curva ROC para la determinación de la eficacia de predicción de recidiva/metástasis post-trasplante de los niveles de AFP pre-trasplante, se determinó un AUC= 0,590 (59%) (IC95% 0,168-1,013 y $p=0,616$) (figura 27). Por lo que, los niveles de AFP pre-trasplante podrían predecir con un 59% de probabilidad, la aparición de recidiva/metástasis post-trasplante.

El mejor punto de corte de AFP para predecir recidiva/metástasis post-trasplante con mejor S y E, correspondiente al máximo índice Youden (0,45), correspondió a ≥ 9 ng/mL, con una S=66,6% y una E=79,16%. (figura 28).

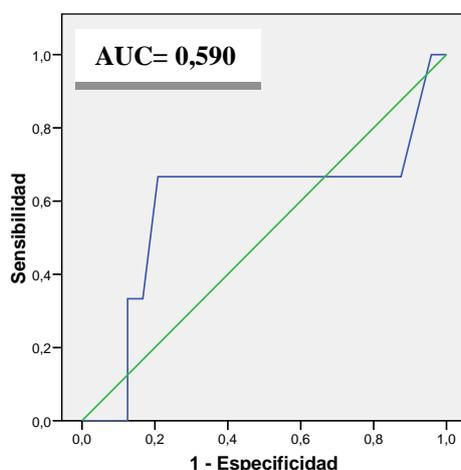


Figura 27. Curva ROC de AFP pre-trasplante, para la predicción de recidiva/metástasis post-trasplante (AUC: área bajo la curva).

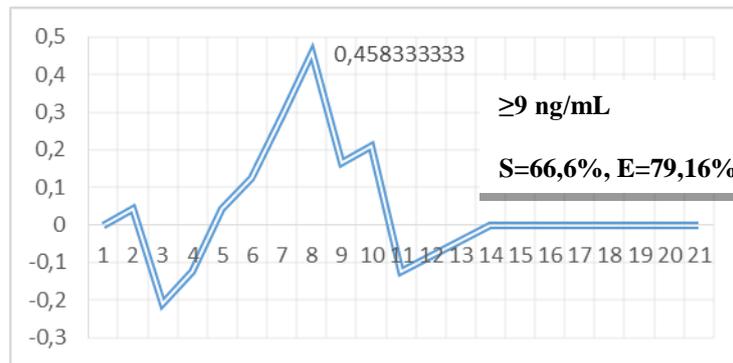


Figura 28. Máximo Índice Youden para AFP pre-trasplante (0,45): relación entre S y 1-E que optimiza el valor de S y E para la predicción de recidiva/metástasis de la determinación de AFP pre-trasplante (S: sensibilidad; E: especificidad).

Tras la elaboración de la curva ROC para la determinación de la eficacia de predicción de recidiva/metástasis post-trasplante de los niveles de MMP-1 pre-trasplante, se determinó un AUC= 0,639 (63.9%) (IC95% 0,371-0,907 y $p=0.440$) (figura 29). Por lo que, los niveles de MMP-1 pre-trasplante podrían predecir con un 63,9% de probabilidad, la aparición de recidiva/metástasis post-trasplante.

El mejor punto de corte de MMP-1 para predecir recidiva/metástasis post-trasplante con mejor S y E, correspondiente al máximo índice Youden (0,375), correspondió a $\geq 1,27$ ng/mL, con una S=100% y una E=37,5% (figura 30).

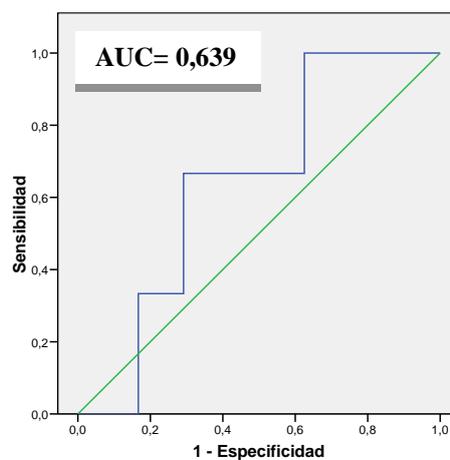


Figura 29. Curva ROC de MMP-1 pre-trasplante, para la predicción de recidiva/metástasis post-trasplante (AUC: área bajo la curva).

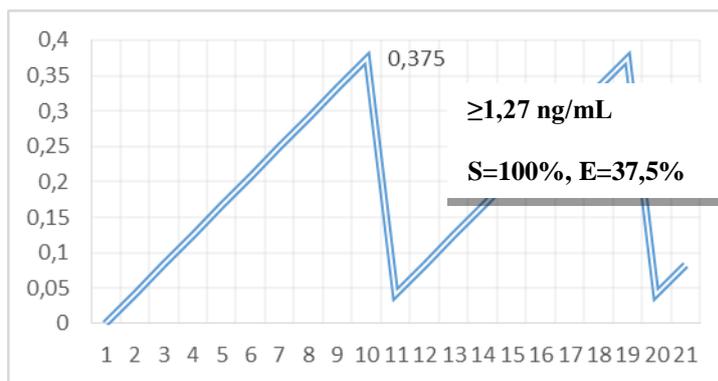


Figura 30. Máximo Índice Youden para MMP-1 pre-trasplante (0,375): relación entre S y 1-E que optimiza el valor de S y E para la predicción de recidiva/metástasis de la determinación de MMP-1 pre-trasplante (S: sensibilidad; E: especificidad).

Así, encontramos que de todos los marcadores pre-trasplante estudiados para la predicción de recidiva/metástasis, los niveles de CTCs fueron los mejores predictores (AUC=0,750), seguido de los niveles de MMP-1 (AUC= 0,639) y los niveles de AFP (AUC=0,590), aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos ($p>0,05$) (tabla 60).

Tabla 60. Comparación de la capacidad predictiva de recidiva/metástasis post-trasplante de CTCs, AFP y MMP-1 pre-trasplante, y sus respectivos puntos de corte con mejor sensibilidad y especificidad para la predicción. (AUC: Área bajo la curva; IC95%: índice de confianza al 95%; S: sensibilidad; E: especificidad).

Marcador pre-trasplante	AUC (%)	IC95%	p	Punto de corte	S (%)	E (%)
CTCs /10mL	0,750 (75)	0,487-1,013	0,165	≥ 8.5	100	50
MMP-1 (ng/mL)	0,639 (63,9)	0,371-0,907	0,440	$\geq 1,27$	100	37,5
AFP (ng/mL)	0,590 (59)	0,168-1,013	0,616	≥ 9	66,6	79,16

5.8 ASOCIACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CTCs PRE-TRASPLANTE Y TIEMPO DE SG Y TIEMPO DE SLE TRAS EL TRASPLANTE

Tras aplicar el test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación de los niveles de CTCs pre-trasplante de los 27 pacientes trasplantados, con el tiempo de supervivencia y el tiempo de supervivencia libre de recidiva/metástasis tras el trasplante, no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) (tabla 61).

Tabla 61. Test de correlación Rho de Spearman para el estudio de la asociación de CTCs pre-trasplante con el tiempo de SG y el tiempo de SLE tras el trasplante. (CTCs: células tumorales circulantes; SG: supervivencia general; SLE: supervivencia libre de enfermedad).

Paciente	CTCs /10mL Pre- trasplante	Tiempo SG Post-trasplante (meses)	Tiempo SLE post-trasplante (meses)
Mediana	13	24	24
RI	2-91	13-28	12-28
Rho		0,372	0,265
p		0,056	0,182

5.9 ANÁLISIS DE SG Y SLE TRAS EL TRASPLANTE

Tras realizar la curva de supervivencia Kaplan-Meier para el estudio de la SLE y SG de los 27 pacientes con CHC trasplantados, se muestra la supervivencia media sin recidiva y la supervivencia media general del paciente y sus respectivas curvas, en la tabla 62 y figura 31, respectivamente.

Tabla 62. SLE y SG de pacientes con CHC trasplantados. Medias con límite inferior y superior (IC95%). Porcentajes de supervivencia al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años post-trasplante.

SUPERVIVENCIA POST-TRASPLANTE	
Supervivencia media sin recidiva (meses)	33,38 (29,53-37,23)
Al mes	100%
A los 6 meses	92,3%
Al año	88,5%
A los 2 años	88,5%
Supervivencia media general (meses)	31,81 (27,73-35,89)
Al mes	100%
A los 6 meses	100%
Al año	88,5%
A los 2 años	79,5%

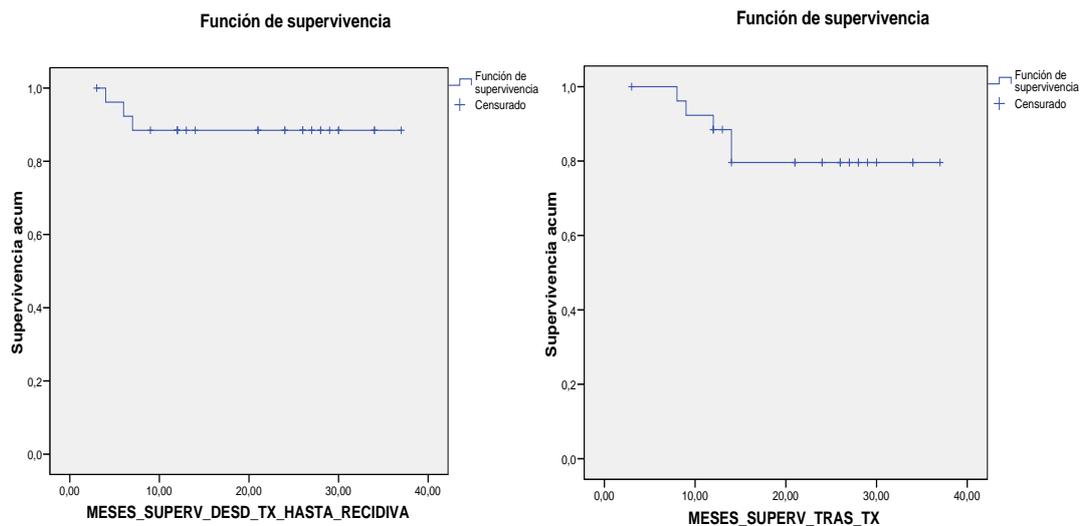


Figura 31. Curvas de SLE y SG post-trasplante de los pacientes con CHC trasplantados.

Posteriormente se llevó a cabo la comparación de curvas de SG y SLE tras el trasplante, entre pacientes con diferentes características clínicas y analíticas.

En la tabla 63 se muestra el número de pacientes con/sin recidiva y con/sin fallecimiento post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante $<8,5$ CTCs/10 mL y $\geq 8,5$ CTCs/10 mL.

Tabla 63. Número de pacientes con/sin recidiva y con/sin exitus post-trasplante, dentro de los grupos con <8,5 CTCs/10 mL y \geq 8,5 CTCs/10 mL.

CTCs/10 mL Pre-trasplante	Nº Pacientes	Recidiva Post-trasplante		Exitus Post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
<8,5	12	12	0	10	2
\geq 8,5	15	12	3	12	3

La supervivencia media sin recidiva del paciente en los grupos con CTCs<8,5/10 mL y CTCs \geq 8,5/10mL, no pudo calcularse, debido a que ningún paciente del grupo con <8,5 CTCs, tuvo recidiva post-trasplante. No existieron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no tuvo recidiva al final de cada intervalo, entre grupos de pacientes con CTCs<8,5/10 mL y CTCs \geq 8,5/10mL ($p>0,05$) (tabla 64 y figura 32).

En la tabla 64 se muestra la supervivencia media general de los grupos de pacientes con CTCs<8,5/10mL y CTCs \geq 8,5/10mL. La proporción acumulada de pacientes que no fallecieron al final de cada intervalo en el grupo con CTCs<8,5/10 mL, no fue significativamente diferente del grupo con \geq 8,5 CTCs/10mL ($p<0,05$) (tabla 64 y figura 32).

Tabla 64. SLE y SG entre grupos con <8,5 CTCs/10 mL y \geq 8,5 CTCs/10 mL. Medias con límite inferior y superior (IC95%). Porcentajes de supervivencia al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años post-trasplante en ambos grupos (CTCs: células tumorales circulantes).

SUPERVIVENCIA POST- TRASPLANTE	CTCs<8,5 /10mL	CTCs \geq 8,5 /10mL	Log Rank (p)
Supervivencia media sin recidiva (meses)	-	-	2,364 (p=0,124)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	86,7%	
Al año	100%	80%	
A los 2 años	100%	80%	
Supervivencia media general (meses)	25,63 (21,40-29,87)	32 (26,89-37,10)	0,013 (p=0,910)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	100%	
Al año	81,8%	93,3%	
A los 2 años	81,8%	80%	

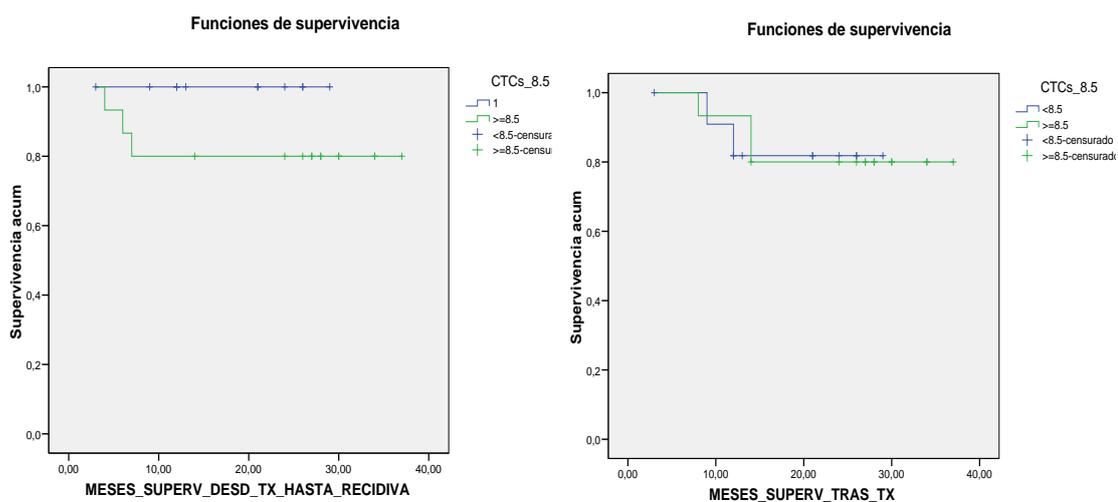


Figura 32. Curvas de SLE y SG post-trasplante en grupos con $<8,5$ CTCs/10 mL y $\geq 8,5$ CTCs/10 mL. Log Rank (Mantel-Cox).

En la tabla 65 se muestra el número de pacientes con/sin recidiva y con/sin fallecimiento post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con un único nódulo tumoral y con más de un nódulo tumoral hepático.

Tabla 65. Número de pacientes con/sin recidiva y con/sin exitus post-trasplante, dentro de los grupos con un único nódulo tumoral y con más de un nódulo tumoral hepático.

Nódulo (LOE)	Nº Pacientes	Recidiva Post-trasplante		Exitus Post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
Única	14	13	1	13	1
Múltiple	13	11	2	9	4

En la tabla 66 se muestra la supervivencia media sin recidiva y la supervivencia media general del paciente en los grupos con un único nódulo tumoral y con más de un nódulo tumoral. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no tuvo recidiva al final de cada intervalo, entre

los grupos de pacientes con presencia de un único nódulo y pacientes con nódulos múltiples ($p > 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no fallecieron al final de cada intervalo entre ambos grupos de pacientes ($p > 0,05$) (tabla 66 y figura 33).

Tabla 66. SLE y SG entre grupos con un único nódulo tumoral y con más de un nódulo tumoral hepático. Medias con límite inferior y superior (IC95%). Porcentajes de supervivencia al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años post-trasplante en ambos grupos (LOE: lesión ocupante de espacio).

SUPERVIVENCIA POST-TRASPLANTE	LOE Única	LOE Múltiple	Log Rank (p)
Supervivencia media sin recidiva (meses)	31,69 (27,34-36,03)	32,30 (26,32-38,29)	0.307 (p=0,579)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	92,3%	92,3%	
Al año	92,3%	84,6%	
A los 2 años	92,3%	84,6%	
Supervivencia media general (meses)	32 (28,23-35,76)	29,03 (22,56-35,49)	1,791 (p=0,181)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	100%	
Al año	92,3%	84,6%	
A los 2 años	92,3%	67,7%	

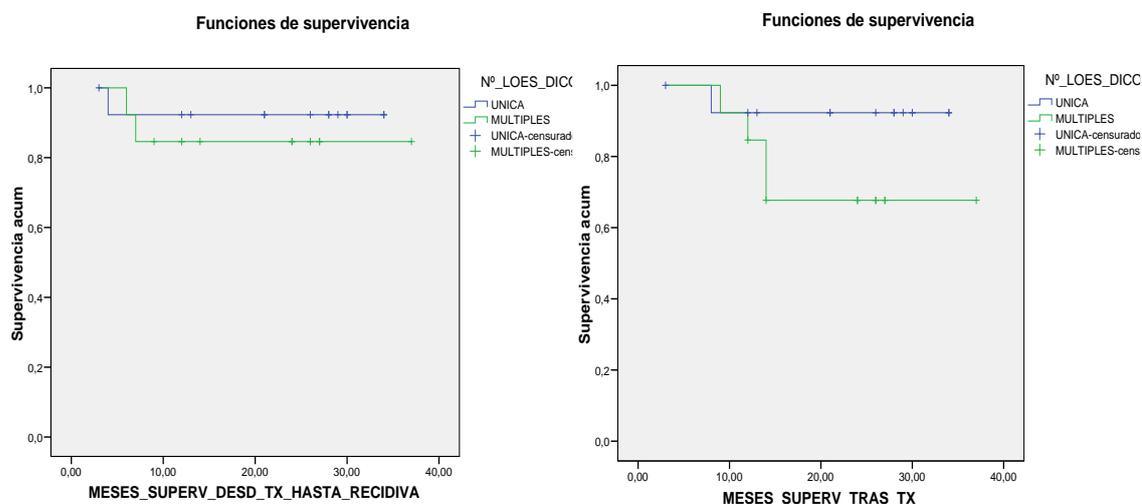


Figura 33. Curvas de SLE y SG post-trasplante en grupos con un único nódulo tumoral y con más de un nódulo tumoral hepático. Log Rank (Mantel-Cox).

En la tabla 67 se muestra el número de pacientes con/sin recidiva y con/sin fallecimiento post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con invasión vascular y sin invasión vascular tumoral.

Tabla 67. Número de pacientes con/sin recidiva y con/sin exitus post-trasplante, dentro de los grupos sin invasión vascular y con invasión vascular tumoral.

Invasión	Nº Pacientes	Recidiva Post-trasplante		Exitus Post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
No	24	22	2	20	4
Sí	3	2	1	2	1

En la tabla 68 se muestra la supervivencia media sin recidiva y la supervivencia media general del paciente en los grupos con invasión y sin invasión vascular. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no tuvo recidiva al final de cada intervalo, entre los grupos de pacientes con y sin invasión vascular ($p>0,05$). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no fallecieron al final de cada intervalo entre ambos grupos de pacientes ($p>0,05$) (tabla 68 y figura 34).

Tabla 68. SLE y SG entre grupos sin invasión vascular y con invasión vascular tumoral. Medias con límite inferior y superior (IC95%). Porcentajes de supervivencia al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años post-trasplante en ambos grupos.

SUPERVIVENCIA POST-TRASPLANTE	No Invasión	Sí Invasión	Log Rank (p)
Supervivencia media sin recidiva (meses)	34,26 (30,62-37,89)	20 (8,79-31,20)	1,634 (p=0,201)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	95,7%	66,7%	
Al año	91,3%	66,7%	
A los 2 años	91,3%	66,7%	
Supervivencia media general (meses)	32,25 (28,03-36,48)	22,66 (15,73-29,60)	0,206 (p=0,650)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	100%	
Al año	87%	100%	
A los 2 años	81,8%	66,7%	

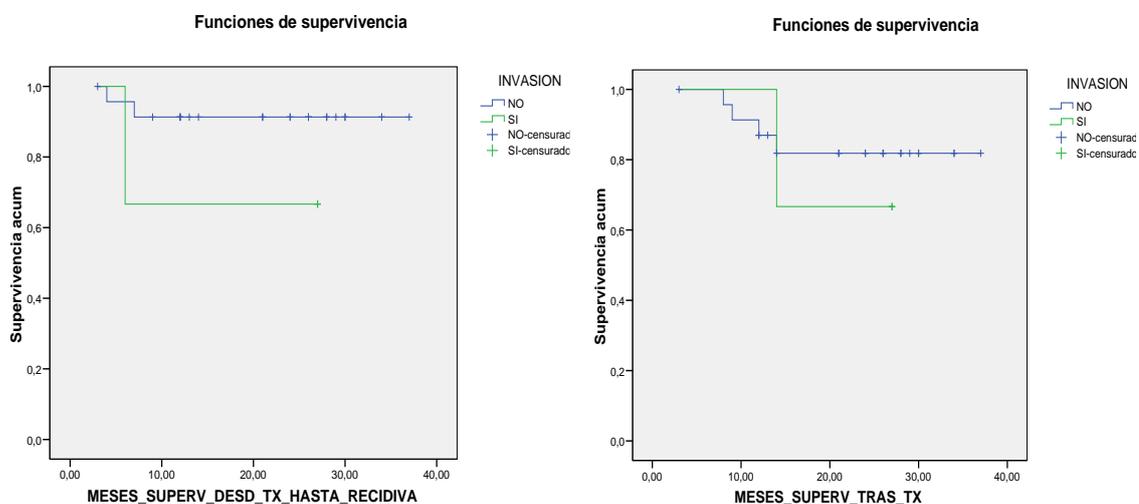


Figura 34. Curvas de SLE y SG post-trasplante en grupos sin invasión vascular y con invasión vascular tumoral. Log Rank (Mantel-Cox).

En la tabla 69 se muestra el número de pacientes con/sin recidiva y con/sin fallecimiento post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de AFP < 9 ng/mL y AFP ≥ 9 ng/mL.

Tabla 69. Número de pacientes con/sin recidiva y con/sin exitus post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de AFP<9 ng/mL y AFP≥9 ng/mL (AFP: alfa-fetoproteína).

AFP Pre-trasplante	Nº Pacientes	Recidiva Post-trasplante		Exitus Post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
<9 ng/mL	20	19	1	17	3
≥9 ng/mL	7	5	2	5	2

En la tabla 70 se muestra la supervivencia media sin recidiva y la supervivencia media general del paciente en los grupos con niveles pre-trasplante de AFP<9 ng/mL y AFP≥9 ng/mL. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no tuvo recidiva al final de cada intervalo, entre los grupos de pacientes con AFP<9 ng/mL y AFP≥9 ng/mL ($p>0,05$). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no fallecieron al final de cada intervalo entre ambos grupos de pacientes ($p>0,05$) (tabla 70 y figura 35).

Tabla 70. SLE y SG entre grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de AFP<9 ng/mL y AFP≥9 ng/mL. Medias con límite inferior y superior (IC95%). Porcentajes de supervivencia al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años post-trasplante en ambos grupos (AFP: alfa-fetoproteína).

SUPERVIVENCIA POST- TRASPLANTE	AFP <9 ng/mL	AFP ≥9 ng/mL	Log Rank (p)
Supervivencia media sin recidiva (meses)	32,57 (29,86-35,29)	27,85 (17,14-38,57)	3,023 (p=0,082)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	71,4%	
Al año	94,7%	71,4%	
A los 2 años	94,7%	71,4%	
Supervivencia media general (meses)	30,24 (26,35-34,14)	29,57 (20,78-38,35)	0,426 (p=0,514)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	100%	
Al año	89,5%	85,7%	
A los 2 años	83,1%	71,4%	

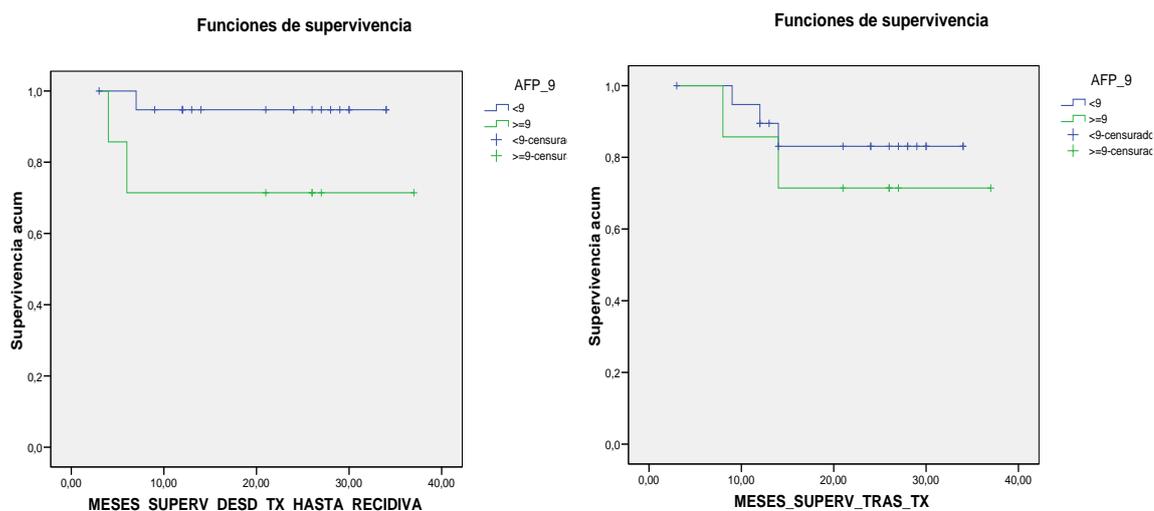


Figura 35. Curvas de SLE y SG post-trasplante en grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de AFP<9 ng/mL y AFP≥9 ng/mL. Log Rank (Mantel-Cox).

En la tabla 71 se muestra el número de pacientes con/sin recidiva y con/sin fallecimiento post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de MMP-1<1,27 ng/mL y MMP-1≥1,27 ng/mL.

Tabla 71. Número de pacientes con/sin recidiva y con/sin exitus post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de MMP-1<1,27 ng/mL y MMP-1≥1,27 ng/mL (MMP-1: metaloproteasa 1).

MMP-1 Pre-trasplante	N° Pacientes	Recidiva Post-trasplante		Exitus Post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
<1,27 ng/mL	9	9	0	7	2
≥1,27 ng/mL	18	15	3	15	3

La supervivencia media sin recidiva del paciente de los grupos con MMP-1<1,27 ng/mL y MMP-1≥1,27 ng/mL no pudo calcularse, debido a que ningún paciente del grupo con MMP-1<1,27 ng/mL, tuvo recidiva post-trasplante.

No existieron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no tuvo recidiva al final de cada intervalo, entre grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de MMP-1 <1,27 ng/mL y MMP-1 \geq 1,27 ng/mL (tabla 72 y figura 36).

En la tabla 72 se muestra la supervivencia media general de los grupos de pacientes con MMP-1 <1,27 ng/mL y MMP-1 \geq 1,27 ng/mL. La proporción acumulada de pacientes que no fallecieron al final de cada intervalo en el grupo con MMP-1 <1,27 ng/mL, no fue significativamente diferente del grupo con MMP-1 \geq 1,27 ng/mL ($p < 0,05$) (tabla 72 y figura 36).

Tabla 72. SLE y SG entre grupos con niveles pre-trasplante de MMP-1 <1,27 ng/mL y MMP-1 \geq 1,27 ng/mL. Medias con límite inferior y superior (IC95%). Porcentajes de supervivencia al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años post-trasplante en ambos grupos (MMP-1: metaloproteasa 1).

SUPERVIVENCIA POST-TRASPLANTE	MMP-1 <1,27 ng/mL	MMP-1 \geq1,27 ng/mL	Log Rank (p)
Supervivencia media sin recidiva (meses)	-	-	1,415 (p=0,234)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	88,9%	
Al año	100%	83,3%	
A los 2 años	100%	83,3%	
Supervivencia media general (meses)	25,12 (19,25-30,99)	32,83 (28,49-37,17)	0,693 (p=0,405)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	100%	
Al año	75%	94%	
A los 2 años	75%	83,3%	

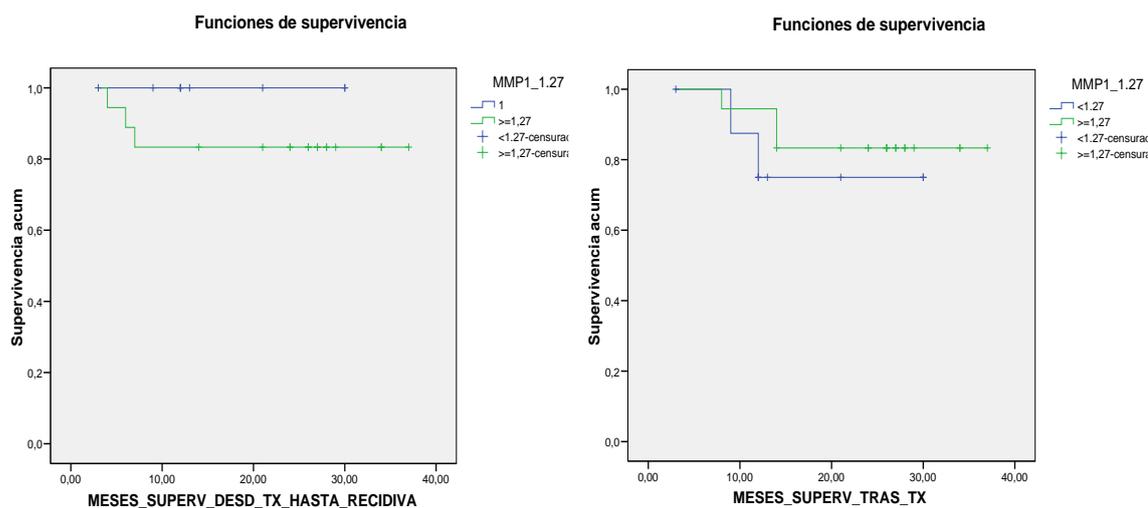


Figura 36. Curvas de SLE y SG post-trasplante en grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de MMP-1 <math>< 1,27</math> ng/mL y MMP-1 $\geq 1,27$ ng/mL. Log Rank (Mantel-Cox).

En la tabla 73 se muestra el número de pacientes con/sin recidiva y con/sin fallecimiento post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de bilirrubina $\leq 1,20$ mg/dL y bilirrubina $> 1,20$ mg/dL.

Tabla 73. Número de pacientes con/sin recidiva y con/sin exitus post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de bilirrubina $\leq 1,20$ mg/dL y bilirrubina $> 1,20$ mg/dL.

Bilirrubina Pre-trasplante	Nº Pacientes	Recidiva Post-trasplante		Exitus Post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
$\leq 1,20$ mg/dL	19	17	2	15	4
$> 1,20$ mg/dL	8	7	1	7	1

En la tabla 74 se muestra la supervivencia media sin recidiva y la supervivencia media general del paciente en los grupos con niveles pre-trasplante de bilirrubina $\leq 1,20$ mg/dL y bilirrubina $> 1,20$ mg/dL. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no tuvo recidiva al final de cada intervalo, entre los grupos de pacientes con bilirrubina $\leq 1,20$ mg/dL y bilirrubina $> 1,20$ mg/dL ($p > 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente

significativas en la proporción acumulada de pacientes que no fallecieron al final de cada intervalo entre ambos grupos de pacientes ($p>0,05$) (tabla 74 y figura 37).

Tabla 74. SLE y SG entre grupos con niveles pre-trasplante de bilirrubina $\leq 1,20$ mg/dL y bilirrubina $> 1,20$ mg/dL. Medias con límite inferior y superior (IC95%). Porcentajes de supervivencia al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años post-trasplante en ambos grupos.

SUPERVIVENCIA POST-TRASPLANTE	Bilirrubina $\leq 1,20$ mg/dL	Bilirrubina $> 1,20$ mg/dL	Log Rank (p)
Supervivencia media sin recidiva (meses)	33,44 (28,79-38,09)	27,12 (21,85-32,39)	0,002 (p=0,962)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	88,9%	100%	
Al año	88,9%	87,5%	
A los 2 años	88,9%	87,5%	
Supervivencia media general (meses)	30,84 (25,53-36,16)	28 (24,33-31,66)	0,523 (p=0,470)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	100%	
Al año	83,3%	100%	
A los 2 años	76,4%	87,5%	

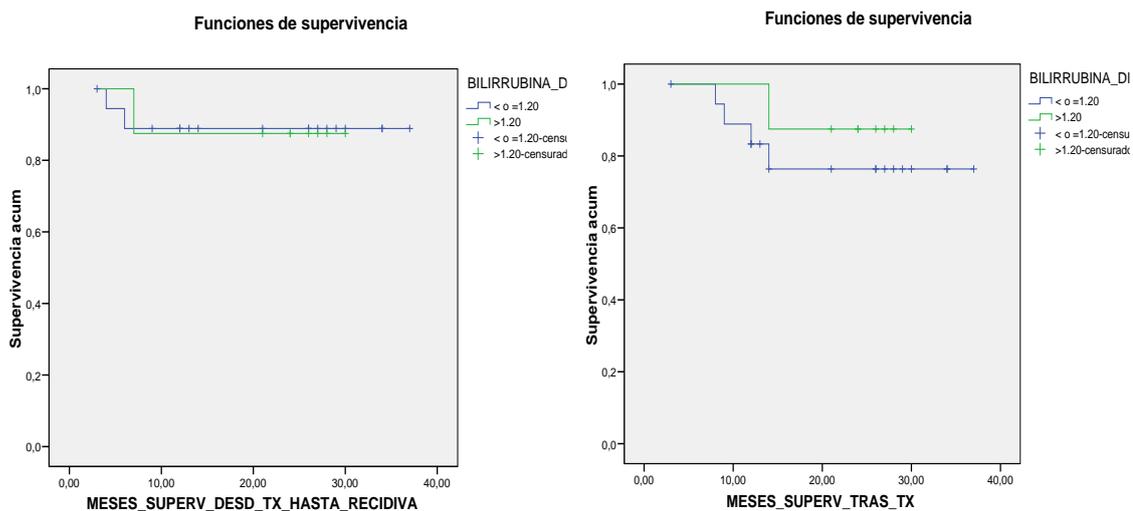


Figura 37. Curvas de SLE y SG post-trasplante en grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de bilirrubina $\leq 1,20$ mg/dL y bilirrubina $> 1,20$ mg/dL. Log Rank (Mantel-Cox).

En la tabla 75 se muestra el número de pacientes con/sin recidiva y con/sin fallecimiento post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de GOT \leq 40 U/L y GOT $>$ 40 U/L.

Tabla 75. Número de pacientes con/sin recidiva y con/sin exitus post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de GOT \leq 40 U/L y GOT $>$ 40 U/L (GOT: transaminasa glutámico-oxalacética).

GOT Pre-trasplante	Nº Pacientes	Recidiva Post-trasplante		Exitus Post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
\leq 40 U/L	12	11	1	9	3
$>$ 40 U/L	14	12	2	12	2

En la tabla 76 se muestra la supervivencia media sin recidiva y la supervivencia media general del paciente en los grupos con niveles pre-trasplante de GOT \leq 40 U/L y GOT $>$ 40 U/L. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no tuvo recidiva al final de cada intervalo, entre los grupos de pacientes con GOT \leq 40 U/L y GOT $>$ 40 U/L ($p>0,05$). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no fallecieron al final de cada intervalo entre ambos grupos de pacientes ($p>0,05$) (tabla 76 y figura 38).

Tabla 76. SLE y SG entre grupos con niveles pre-trasplante de GOT \leq 40 U/L y GOT $>$ 40 U/L. Medias con límite inferior y superior (IC95%). Porcentajes de supervivencia al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años post-trasplante en ambos grupos (GOT: transaminasa glutámico-oxalacética).

SUPERVIVENCIA POST-TRASPLANTE	GOT \leq 40 U/L	GOT $>$ 40 U/L	Log Rank (p)
Supervivencia media sin recidiva (meses)	31,27 (26,17-36,36)	32,64 (27,05-38,23)	0,116 (p=0,734)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	90,9%	92,9%	
Al año	90,9%	85,7%	
A los 2 años	90,9%	85,7%	
Supervivencia media general (meses)	27,36 (20,93-33,78)	33,46 (28,95-37,97)	1,105 (p=0,293)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	100%	
Al año	72,7%	100%	
A los 2 años	72,7%	84,6%	

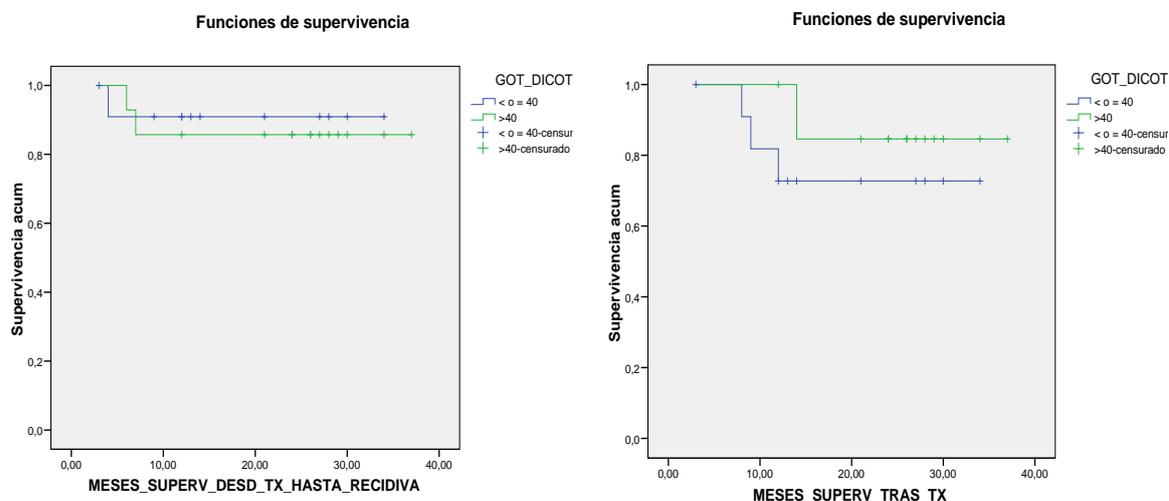


Figura 38. Curvas de SLE y SG post-trasplante en grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de GOT \leq 40 U/L y GOT $>$ 40 U/L. Log Rank (Mantel-Cox).

En la tabla 77 se muestra el número de pacientes con/sin recidiva y con/sin fallecimiento post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de GPT \leq 41 U/L y GPT $>$ 41 U/L.

Tabla 77. Número de pacientes con/sin recidiva y con/sin exitus post-trasplante, dentro de los grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de $GPT \leq 41$ U/L y $GPT > 41$ U/L (GPT: transaminasa glutámico-pirúvica).

GPT Pre-trasplante	Nº Pacientes	Recidiva Post-trasplante		Exitus Post-trasplante	
		NO	SI	NO	SI
≤ 41 U/L	16	14	2	12	4
> 41 U/L	11	10	1	10	1

En la tabla 78 se muestra la supervivencia media sin recidiva y la supervivencia media general del paciente en los grupos con niveles pre-trasplante de $GPT \leq 41$ U/L y $GPT > 41$ U/L. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no tuvo recidiva al final de cada intervalo, entre los grupos de pacientes con $GPT \leq 41$ U/L y $GPT > 41$ U/L ($p > 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción acumulada de pacientes que no fallecieron al final de cada intervalo entre ambos grupos de pacientes ($p > 0,05$) (tabla 78 y figura 39).

Tabla 78. SLE y SG entre grupos con niveles pre-trasplante de $GPT \leq 41$ U/L y $GPT > 41$ U/L. Medias con límite inferior y superior (IC95%). Porcentajes de supervivencia al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años post-trasplante en ambos grupos (GPT: transaminasa glutámico-pirúvica).

SUPERVIVENCIA POST- TRASPLANTE	GPT ≤ 41 U/L	GPT > 41 U/L	Log Rank (p)
Supervivencia media sin recidiva (meses)	30,13 (25,14-35,12)	34,27 (29,17-39,36)	0,140 ($p=0,708$)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	86,7%	100%	
Al año	86,7%	90,9%	
A los 2 años	86,7%	90,9%	
Supervivencia media general (meses)	27,67 (22,35-32,99)	34,44 (29,72-39,16)	1,235 ($p=0,266$)
Al mes	100%	100%	
A los 6 meses	100%	100%	
Al año	80%	100%	
A los 2 años	72,7%	88,9%	

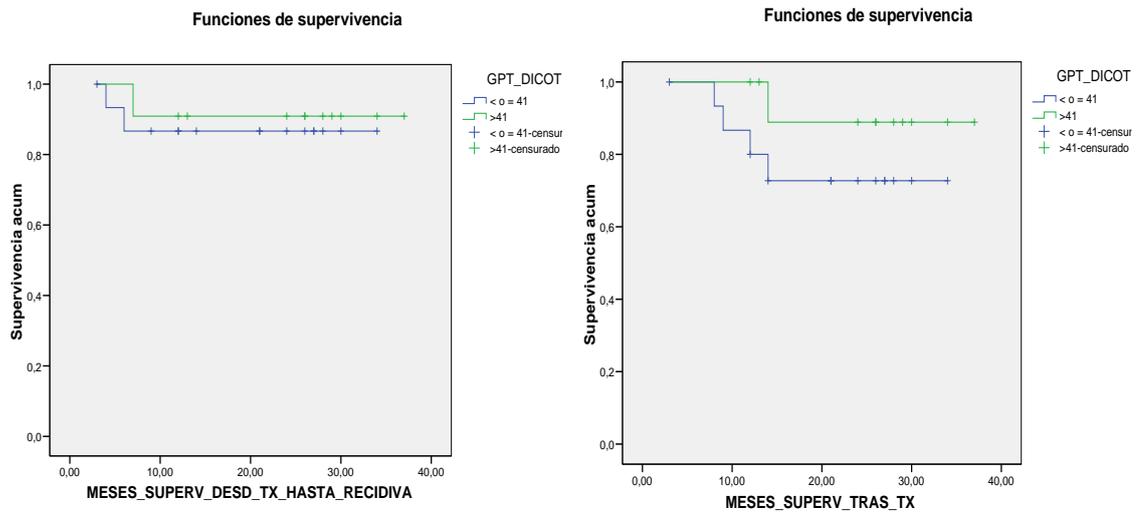


Figura 39. Curvas de SLE y SG post-trasplante en grupos de pacientes con niveles pre-trasplante de $GPT \leq 41$ U/L y $GPT > 41$ U/L. Log Rank (Mantel-Cox).

6. DISCUSIÓN

El CHC ocupa el segundo lugar entre las causas de mortalidad relacionadas con el cáncer. La enfermedad es mortal en los primeros 3-6 meses (2,3), por lo que el diagnóstico y tratamiento temprano puede bloquear la progresión tumoral, resultando en un beneficio en cuanto a la supervivencia de esta enfermedad. No obstante, actualmente el CHC representa uno de los principales desafíos en el área del manejo del cáncer, debido a las diferentes rutas moleculares responsables, diferentes agentes causantes, y al diagnóstico tardío en la mayoría de los casos.

Aunque existen terapias consideradas como curativas y efectivas para el CHC (resección y trasplante hepático), aparece un elevado porcentaje de pacientes que sufren recidiva dentro del primer año tras la cirugía (170). La principal razón por lo que esto ocurre es la presencia de micrometástasis residuales formadas ya desde antes de la cirugía, o bien por la diseminación de células tumorales procedentes del tumor original al torrente sanguíneo durante la manipulación quirúrgica (173). A pesar de que varios trabajos han sugerido que las CTCs son las responsables de las metástasis y las recurrencias en el CHC (135,171,172), los mecanismos responsables de estos procesos son todavía poco conocidos. Además, la heterogeneidad en el diseño de los diferentes estudios y en sus resultados, limitan el valor clínico de cada uno de ellos en cuanto al efecto pronóstico de las CTCs (392). Así, el significado clínico de las CTCs en CHC no está confirmado aún, y su uso como marcador predictivo es controvertido.

No obstante, la detección y cuantificación de CTCs en sangre periférica de los pacientes con cáncer, toma gran interés en el campo de la medicina clínica, ya que las CTCs reflejan la progresión tumoral a tiempo real y esto podría proporcionarnos una “biopsia líquida”, más útil que una biopsia tradicional, que reflejaría las características y la dinámica del tumor.

Las CTCs son ampliamente heterogéneas. No existe un único parámetro que defina a la verdadera CTC. Según publicaciones recientes, las CTCs que expresan la molécula EpCAM en su superficie se asocian a una mayor agresividad tumoral y a la formación de metástasis en CHC (155,206,208,209). En 2015, Kelley y cols., compararon los niveles de CTCs EpCAM+ determinadas por inmunomagnetismo entre pacientes con CHC y pacientes sin enfermedad hepática tumoral, demostrando que 7/20 de los pacientes con CHC presentaron >2CTCs/7,5 mL, mientras que todos los pacientes sin CHC mostraron niveles <2 CTCs (175). Estos resultados confirman el hecho de que las células epiteliales EpCAM+ son raras en pacientes con ausencia de cáncer hepático, y que tienen un origen tumoral en pacientes con CHC (155). Así, la detección y la

erradicación a tiempo de estas células tumorales con capacidad metastásica, se considera de una gran importancia a la hora de disminuir la mortalidad por cáncer.

En los últimos años, se han desarrollado numerosas técnicas prometedoras de detección de CTCs. Sin embargo, en la actualidad, hay muchos problemas sin resolver en el campo del uso clínico de CTCs en pacientes con cáncer (123). Estos incluyen precisión, sensibilidad y especificidad de las técnicas, el punto de corte óptimo de concentración de CTCs, los marcadores óptimos para la identificación de CTCs y la capacidad de determinar la condición real de la célula (viable o apoptótica), existiendo una gran variabilidad entre laboratorios en los métodos empleados para la detección de CTCs.

Lo ideal, sería poder identificar aquellas células más agresivas, con mayor potencial metastásico. Para ello, se requieren técnicas que sean capaces de detectar subpoblaciones celulares con características de células madre, en las cuales se ha perdido la expresión de ciertas proteínas epiteliales de superficie, como EpCAM. Por lo que los métodos de detección de CTCs basados en la detección de EpCAM en la superficie celular, subestimarían el verdadero recuento de CTCs. No obstante, como ya mencionamos, se ha visto que EpCAM es un marcador potencial de CSCs hepáticas (206). Éstas son más invasivas y tumorigénicas y altamente resistentes al tratamiento quimioterápico y radioterápico (208) y podrían ser las responsables de la progresión de la enfermedad post-trasplante. Así, las técnicas de aislamiento de CTCs basadas en la detección de EpCAM cobran importancia en pacientes con CHC.

A pesar de que el sistema CellSearch[®] (Menarini Silicon Biosystems) se considera el método más estandarizado para la detección de CTCs EpCAM+, éste presenta relativamente una baja sensibilidad y pureza: sólo una fracción de pacientes con cánceres metastásicos, presentan positividad para las CTCs. Sin embargo, el nuevo sistema inmunomagnético Isoflux[®] (Fluxion Biosciences Inc, South San Francisco, CA), permite una recuperación prácticamente completa de las CTCs intactas (168). Existen estudios que demuestran que este nuevo sistema presenta una mayor sensibilidad en la recuperación de CTCs que el sistema CellSearch[®] (168,169,393). En un reciente estudio de Alva y cols., 2015, se analizaron paralelamente una serie de muestras de sangre procedentes de pacientes con cáncer de vejiga, por los métodos CellSearch[®] e Isoflux[®], para la detección de CTCs, encontrándose un valor de CTCs/7,5 mL < 10 en todas las muestras procesadas por el método CellSearch[®], sin embargo, el 44% de las muestras procesadas por Isoflux[®], presentaron un valor de CTCs/7,5

mL>10, por lo que los autores concluyeron que el sistema Isoflux[®] mostraba una mayor sensibilidad para la detección de CTCs en cáncer de vejiga, posiblemente, debido a que el sistema Isoflux[®] consigue un flujo más uniforme de la muestra y una fuerza magnética más potente dentro del cartucho de aislamiento (169). El sistema Isoflux[®] ya mostró previamente una mayor sensibilidad en la detección de CTCs en el estudio realizado por Harb y cols. en cáncer de próstata y colorrectal (168). En este estudio se determinaron tasas de recuperación de CTCs procedentes de una línea celular de cáncer de próstata (PC3) del 40% y del 90% en los sistemas CellSearch[®] e Isoflux[®], respectivamente. También, se calcularon las tasas de recuperación de CTCs procedentes de pacientes con cáncer de próstata, encontrándose que únicamente el 36% de los pacientes presentaron >4 CTCs/7,5 mL con el sistema CellSearch[®], mientras que el 95% de los pacientes presentaron >4 CTCs/7,5 mL con el sistema Isoflux[®]. De la misma manera, la tasa de recuperación de CTCs en pacientes con cáncer colorrectal resultó ser mayor (87%) con el sistema Isoflux[®] que la descrita en la literatura por el sistema CellSearch[®] (23%) (394). Además, en este estudio se puso de manifiesto que con el sistema Isoflux[®], los porcentajes de recuperación de células derivadas de líneas tumorales de cáncer de mama (MDA-MB-231), con baja expresión de EpCAM, eran mayores que las descritas en la literatura con el sistema CellSearch[®] (74% frente a 12%, respectivamente) (395).

En este estudio, evaluamos dos tecnologías de aislamiento de CTCs mediante inmunomagnetismo anti-EpCAM, CellSearch[®] e Isoflux[®] y, acorde con los resultados citados anteriormente, encontramos una mayor sensibilidad del sistema Isoflux[®], en la detección de CTCs en pacientes con CHC en espera de trasplante. Los niveles de CTCs obtenidos mediante los sistemas CellSearch[®] e Isoflux[®] en CHC, fueron significativamente diferentes entre los dos métodos, aislándose estas células en el 8,3% y en el 83,33% de las muestras, respectivamente. Los niveles de CTCs no fueron concordantes entre sí, existiendo un error proporcional entre ambos métodos.

Ya en un estudio previo preliminar, nuestro grupo puso de manifiesto que el sistema Isoflux[®] parece ser una buena herramienta para la identificación de CTCs en pacientes con CHC, presentando una sensibilidad mayor que el método CellSearch[®]. Sólo en 1/21 pacientes (4,7%) se detectaron ≥ 2 CTCs/7,5 mL de sangre periférica con el sistema CellSearch[®]. Con respecto al sistema IsoFlux[®], se detectó una concentración de ≥ 2 CTCs/7,5 mL en 19 de 21 pacientes (90,5%). La comparación de ambos métodos mediante el gráfico de Bland-Altman mostró que no son métodos intercambiables entre

ellos para la determinación de las CTCs en estos pacientes, y se encuentra un sesgo proporcional entre ellos (393).

En la literatura actual no hemos encontrado ningún estudio que use el sistema IsoFlux[®] en pacientes con CHC. Tampoco hemos encontrado ningún estudio que compare ambos métodos en pacientes con CHC en lista de espera para trasplante. Kelley y cols., obtuvieron una mayor tasa de recuperación de CTCs en pacientes con CHC metastásico, con el sistema CellSearch[®] (≥ 2 CTCs/7,5 mL en 7/20 pacientes) (175). Creemos que nuestra tasa de detección con este método fue menos eficiente porque nuestros pacientes no eran metastásicos y cumplían con los criterios de Milán. Por lo tanto, para que los CTCs se consideren como nuevos biomarcadores en la clínica, se necesita un sistema para detectar los CTCs con mayor sensibilidad para que se puedan usar en las etapas iniciales del proceso del tumor.

En otro estudio previo de nuestro grupo, la detección de CTCs con el sistema Isoflux[®] fue positiva en el 87,5% de los pacientes con CHC en lista de espera para TOH, lo que muestra la elevada sensibilidad de este método para la detección de CTCs en este tipo de pacientes antes de la cirugía (396).

Así pues, el sistema Isoflux[®] es un sistema optimizado para garantizar la máxima recuperación de células que expresan EpCAM en su superficie, debido a varias razones: en primer lugar, emplea un sistema de microfluidos, en la que el flujo viaja a una velocidad conocida ($v=0,37$ mm/s) para dirigir las células a la zona magnética de aislamiento, controlando de esta manera, el tiempo de residencia de la célula dentro de la zona de aislamiento, resultando en una captura más eficiente. Las fuerzas gravitacionales y fuerzas hidrodinámicas debidas al flujo, permiten que el resto de células continúen pasando hacia el depósito de residuos. Este sistema de microfluidos permite una reducción de la contaminación de fondo, dando como resultado una mayor pureza de las células diana. En segundo lugar, el sistema Isoflux[®], en comparación con otros métodos, mejora la recuperación de las células gracias a que éstas quedan retenidas en una superficie que se desacopla posteriormente. Este hecho permite una mayor viabilidad de las células recuperadas en un mínimo volumen de elución (muestra concentrada), lo que permite análisis moleculares posteriores en los que se requieren bajos volúmenes de muestra (397). Y, en tercer lugar, las perlas inmunomagnéticas empleadas en el sistema Isoflux[®], tienen un mayor diámetro (4,5 μ m), en comparación con el sistema CellSearch[®]. Esto significa que las células diana se pueden aislar con

muchas menos perlas. Esto es probable que contribuya a la mayor sensibilidad, sobre todo cuando el antígeno está presente en bajos niveles sobre la superficie celular.

De esta manera, el sistema Isoflux[®] se puede considerar como un sistema de aislamiento y transferencia de CTCs con alta eficiencia, ofreciendo una alta recuperación de CTCs, con elevada viabilidad, mínima contaminación y en un bajo volumen de elución y por ello, fue el método de elección en nuestro estudio.

Entre los parámetros de laboratorio que se emplean para el seguimiento de la evolución de la enfermedad en pacientes con CHC, durante la estancia en lista de espera para trasplante hepático, encontramos las enzimas hepáticas (GOT, GPT, LDH), parámetros de obstrucción biliar (ALP, GGT, bilirrubina y colesterol), parámetros indicadores de la función hepática (bilirrubina, albúmina y TP), parámetros tumorales (niveles de AFP y CEA), marcadores de inflamación (PCR, RNL) y otros, como ferritina, plaquetas y glucosa. Tras el estudio de la relación entre las CTCs y estos parámetros bioquímicos, hematológicos y de coagulación pre-trasplante, no se encontró ninguna asociación significativa entre ellos. Sin embargo, sí observamos que había diferencias significativas en los niveles de CTCs entre los pacientes con niveles normales y elevados de bilirrubina total, de manera que los pacientes con niveles de bilirrubina $\leq 1,20$ mg/dL, presentaron menores niveles de CTCs que los pacientes con niveles de bilirrubina $> 1,20$ mg/dL. La bilirrubina se considera el mejor marcador de obstrucción biliar, además de ser un buen indicador de la función hepática. Sus niveles son empleados para la clasificación del grado de disfunción hepática Child-Pugh, (64), así como para el sistema MELD de priorización para el trasplante hepático, basado en la gravedad de la hepatopatía (83). Los niveles más elevados de bilirrubina corresponden a una mala función hepática, por lo tanto, peor pronóstico y menor supervivencia. Kim y cols., concluyeron que los niveles elevados de bilirrubina, era uno de los factores predictores de corta SLE tras el trasplante hepático en pacientes con CHC (398). En el estudio de Sakata y cols., en pacientes con CHC y trombosis tumoral portal, se observó que los niveles patológicos de bilirrubina era uno de los factores de mal pronóstico en estos pacientes (399). Este aumento podría deberse a la destrucción de hepatocitos por el crecimiento del tumor o a la alteración del sistema circulatorio debido a la trombosis de la vena porta. En un estudio reciente, los niveles elevados de bilirrubina se asociaron a niveles elevados de CTCs (400). Esto podría deberse a una mayor extensión del tumor en estos pacientes, lo que implicaría una obstrucción biliar y colestasis. De esta manera,

podríamos considerar que los niveles de CTCs podrían ser un marcador predictivo de gran utilidad al permitir una mejor selección de pacientes, mejorando la gestión de las listas de espera y priorizando el acceso al trasplante a pacientes con mayores probabilidades de supervivencia.

De la misma forma, se encontraron diferencias significativas en los niveles de CTCs entre los pacientes con niveles normales y elevados de PCR. Los pacientes con niveles de PCR $\leq 0,50$ mg/dL presentaron menores recuentos de CTCs, frente a los pacientes con niveles de PCR $>0,50$ mg/dL. Las respuestas inflamatorias sistémicas, parecen estar relacionadas con procesos de angiogénesis e invasión vascular, debido a la secreción de diferentes citoquinas (401). La PCR es un reactante de fase aguda que aumenta en respuesta a la inflamación. Ésta puede aparecer típicamente tras la cirugía hepática. Además, el CHC como consecuencia de la infección del VHC (la principal causa de cirrosis hepática subyacente al CHC en nuestros pacientes), está íntimamente asociado con el grado de inflamación y necrosis hepática. El rápido recambio celular y la inflamación continua provocada por este virus propiciaría la proliferación de hepatocitos indiferenciados, la aparición de nódulos displásicos y finalmente CHC (14). Por lo que los niveles de CTCs, podrían reflejar un mayor estado de inflamación hepática, y un peor pronóstico para estos pacientes.

A pesar de que existen varios estudios en los que se asocian los niveles elevados de CTCs EpCAM+, con niveles elevados de AFP en pacientes con CHC (155,175,178,392,402), existe un estudio preliminar, donde las CTCs determinadas por el sistema Isoflux® en pacientes con CHC incluidos en lista de espera, no se asociaban con los niveles de AFP pre-trasplante (396). De igual forma, en este trabajo, los niveles de CTCs tampoco correlacionaron con los niveles de AFP pre-trasplante. Tampoco con parámetros que reflejan el grado de afectación de la función hepática, entre los que se encuentran los marcadores de función hepática, como las enzimas (GOT, GPT, GGT, ALP). Estos resultados se asemejan a los encontrados por Yao F. y cols., en los que tras la separación inmunomagnética y posterior RT-PCR, la concentración de CTCs en sangre periférica de pacientes con CHC, no correlacionó con los niveles séricos de AFP, GOT, GPT, GGT y ALP (403). Como ya mencionamos, la sensibilidad de la AFP para el diagnóstico de CHC es bastante baja (35,36). Sus niveles pueden estar elevados en enfermedades hepáticas no cancerosas (42,43), y muchos pacientes con CHC presentan pequeñas elevaciones de AFP, mientras que el 80% de CHC de pequeño tamaño (<2 cm) no expresan AFP. Por ello, podemos considerar a los niveles sanguíneos de CTCs pre-

trasplante como un marcador más fiable de enfermedad hepática tumoral, comparado con los niveles de AFP.

Tras la evaluación de la asociación de los niveles de CTCs pre-trasplante y diferentes parámetros demográficos y clínicos en los pacientes con CHC incluidos en lista de espera y sometidos a posterior trasplante, encontramos que existía una asociación destacable entre los niveles de CTCs determinados por el sistema Isoflux® y el tiempo transcurrido en lista de espera, no existiendo correlación con el tiempo transcurrido desde el diagnóstico. Los pacientes estuvieron en lista de espera un tiempo medio de 150 ± 153 días antes de ser trasplantados. Aquellos que se encontraron un mayor número de días en espera para la recepción de un hígado sano, presentaron mayores recuentos de CTCs. Este resultado coincide con el ya encontrado en el año 2016, en un estudio preliminar de nuestro grupo, realizado con 24 pacientes con CHC, con un tiempo medio en lista de espera de 163 ± 160 días (396). Por lo que, creemos que la determinación de CTCs podría ser usada como un criterio más de mal pronóstico para la priorización del TOH en los pacientes con CHC.

El pronóstico de estos enfermos es muy difícil de establecer. Para la predicción de la recurrencia y el pronóstico tras el trasplante se determinan características clínicopatológicas tras la examinación de la pieza, como la presencia de invasión vascular, el tamaño tumoral, número de tumores y grado de diferenciación histológica según Edmonson y Steiner (79,80). No obstante, todas ellas, carecen de sensibilidad suficiente para establecer un pronóstico de forma individual.

Numerosos estudios en la literatura han mostrado la existencia de una asociación significativa entre el número de CTCs en pacientes con cáncer hepático y la presencia de invasión vascular (155,175,177,178,392), así como la existencia de una correlación significativa entre el recuento de CTCs y el número de tumores hepáticos (402). En 2004, Vona y cols., determinaron que la presencia de CTCs en pacientes con CHC determinadas mediante ISET y posterior análisis citomorfológico, fue asociada significativamente con la presencia de invasión tumoral (177). Posteriormente, en 2015, Kelley y cols., compararon los niveles de CTCs EpCAM+ determinadas por inmunomagnetismo entre pacientes con CHC y pacientes sin enfermedad hepática tumoral y asociaron los niveles de CTCs a la presencia de invasión vascular en estos enfermos (175). Fan y cols., encontraron que aunque la asociación no fuese estadísticamente significativa, sí que existía una tendencia a que los pacientes con

mayor número de tumores, presentarían mayores recuentos de CTCs (392). En concordancia con estos resultados, en nuestro trabajo, también se estableció una correlación significativa entre los niveles de CTCs pre-trasplante y el número de LOES hepáticas, de manera que, a mayor número de tumores, mayor recuento de CTCs en sangre. También, se encontró una diferencia significativa en los niveles de CTCs pre-trasplante entre los pacientes con y sin invasión vascular, siendo estos niveles significativamente superiores en pacientes con invasión vascular en comparación con los que no presentaron invasión vascular, no existiendo estas diferencias entre los pacientes con y sin necrosis tumoral. De estos resultados, podemos deducir que la detección de CTCs puede tener una implicación clínica útil a la hora de predecir la evolución del CHC tras el trasplante. Los pacientes con niveles menores de CTCs pre-trasplante podrían tener, en un principio, mejor pronóstico tras la cirugía, por lo que, como ya se ha mencionado, el recuento de CTCs sería un buen criterio de priorización de los pacientes con CHC en lista de espera para TOH.

La TACE, se considera el único tratamiento paliativo que ha demostrado ser beneficioso en términos de supervivencia para los pacientes con CHC en estadio intermedio (82). Aunque los resultados no están consolidados, en general se acepta la existencia de un beneficio sustancial, sin un impacto perjudicial sobre la supervivencia post-trasplante por CHC (404). Incluso, otros estudios han señalado la importancia de la TACE tras la cirugía (405,406), por lo que cabría pensar, que a mayor número de TACES recibidas, menor tamaño del tumor viable y, por lo tanto, menor concentración de CTCs en sangre. Sin embargo, son muy pocos los pacientes que consiguen una respuesta completa, debido a que el tejido tumoral recupera la irrigación y continúa creciendo (82,86,87). Por otro lado, el tratamiento con TACE está asociado con la modulación de ciertas citoquinas involucradas en la angiogénesis e inflamación (350). Además, una manipulación inadecuada o excesiva del hígado, facilitaría la diseminación de CTCs al torrente sanguíneo (407). Por esto, el número de CTCs en sangre periférica podría verse aumentado tras la realización de la TACE durante el tiempo en lista de espera en estos pacientes. 25 pacientes de este estudio fueron sometidos a una o más TACES durante el periodo de inclusión en lista de espera. El número máximo de TACES pre-trasplante realizadas fueron 6. Sin embargo, los niveles de CTCs no se asociaron al número de tratamientos realizados con TACE pre-trasplante.

En nuestro estudio, los niveles de CTCs pre-trasplante no fueron diferentes entre los grupos de pacientes con diferentes etiologías de cirrosis subyacente al CHC.

Cualquier patología hepática que conduzca a una cirrosis, es un importante factor de riesgo para desarrollar un CHC posterior. De hecho, el CHC suele aparecer en torno a un 90% de todos los casos de cirrosis hepática ya establecida (4). Una vez establecida la cirrosis, existe el riesgo de desarrollar CHC independientemente de la causa que la originó, y ese riesgo persiste, aunque en menor medida, a pesar de eliminar el agente causante (6). En este estudio, no encontramos ninguna relación entre los niveles de CTCs y la etiología de la cirrosis en nuestros pacientes con CHC. La presencia de enfermedad tumoral y como consecuencia, los niveles de CTCs en sangre, son independientes del tipo de enfermedad sobre la que asienta este tumor. Estos resultados confirman los ya existentes en la literatura referente a las CTCs en CHC (408,409).

En cuanto a los parámetros demográficos estudiados, no encontramos ninguna correlación estadísticamente significativa entre el número de CTCs pre-trasplante y la edad de los pacientes con CHC incluidos en el estudio, resultados que concuerdan con los ya encontrados anteriormente por Hofman y cols. en cáncer de pulmón (116) y en otros estudios realizados en pacientes con CHC (408,409).

El hecho de que más de un 10% de receptores de hígado trasplantados presenten recurrencias dentro del primer año tras la cirugía, sugiere que las CTCs, podrían ser las responsables del proceso metastásico y de recidiva en estos pacientes (135,171,172). Como ya se ha comentado, las CTCs se consideran biomarcadores emergentes del proceso metastásico, proporcionándonos una biopsia líquida a tiempo real que podría sustituir a la biopsia tradicional (101-104). La determinación del número de CTCs y su caracterización en pacientes con cáncer promete ser de gran ayuda para identificar a pacientes con riesgo de recaídas (101-103). La persistencia de CTCs, puede sugerir la resistencia al tratamiento y la erradicación incompleta de las células cancerosas. Pese a que se cree que la detección de dichas células en sangre periférica podría tener un gran valor clínico con respecto a una predicción temprana de recidiva (386-388), actualmente escasos son los estudios de CTCs en pacientes con CHC. En un estudio prospectivo de Fan y cols., se encontró que la recidiva tumoral intrahepática post-quirúrgica estaba estrechamente asociada con los recuentos de CTCs (172). Posteriormente, Schulze y cols., llegaron a la conclusión de que las CTCs EpCAM+ estaban asociadas a metástasis en pacientes con CHC (155). De forma muy reciente, otros investigadores concluyeron que los niveles de CTCs totales se asociaban a recurrencia tras la resección hepática, y concretamente fueron las CTCs mesenquimales las más invasivas (410). Después del

trasplante hepático, al igual que tras la hepatectomía, este proceso indica recurrencia y afecta a la SG y a la SLE.

Varios estudios han demostrado, además, que la cuantificación de CTCs en pacientes con cáncer antes de una intervención quirúrgica presenta mejor valor predictivo de recurrencia, que los niveles de CTCs tras la cirugía (113,121). En 2013, Sun y cols., determinaron que aquellos pacientes con presencia de CTCs preoperatorias en sangre periférica, determinadas por el sistema CellSearch[®], tenían significativamente mayor riesgo de recurrencia temprana tras resección hepática, especialmente aquellos con valores de AFP <400ng/mL o pacientes de bajo riesgo de recurrencia (178). Zhou y cols., en 2016, encontraron una asociación significativa entre los niveles de CTCs EpCAM+ preoperatorios y la presencia de recurrencia tras la resección hepática (411), de manera que aquellos pacientes con recidiva post-cirugía, presentaban mayores niveles preoperatorios de CTCs.

Sin embargo, tras el estudio de la asociación de los niveles de CTCs pre-trasplante en CHC con la presencia de recidiva post-trasplante en nuestro trabajo, observamos que los niveles de CTCs no fueron significativamente diferentes entre aquellos pacientes que recidivaron tras el trasplante frente a los que no. De igual forma, tampoco hubo diferencias en sus niveles entre los pacientes que fallecieron frente a los que no. No obstante, en concordancia con los hallazgos de los estudios anteriores (178,411), del total de 31 pacientes incluidos en nuestro estudio, los pacientes 4, 10 y 16 fueron los que presentaron metástasis/recidiva tumoral a los 6 meses tras el trasplante hepático, y posterior fallecimiento. El paciente 4 presentó metástasis ósea, de pulmón y hepática, el paciente 10 presentó metástasis suprarrenal bilateral y, el paciente 16, presentó metástasis óseas y hepáticas. Los tres pacientes presentaron niveles superiores de CTCs pre-trasplante, en comparación con los niveles post-trasplante. Esto se observó, sobretodo, en los pacientes 4 y 16, cuyos niveles de CTCs fueron especialmente elevados (91 y 1768 CTCs/10 mL, respectivamente) y que posteriormente disminuyeron drásticamente tras el trasplante, por lo que existe una tendencia, aunque no significativa, a que valores muy elevados de CTCs pre-trasplante, se asocien a posterior recidiva.

Los CHC se consideran tumores heterogéneos debido a los diversos factores causantes. En el microambiente tumoral del CHC se encuentran componentes del estroma, factores de crecimiento, enzimas proteolíticas, y citoquinas inflamatorias (218). Todos estos elementos juegan un importante papel en la proliferación y

supervivencia celular, así como en la angiogénesis y metástasis. Todos ellos, se consideran biomarcadores útiles para el seguimiento del desarrollo y el pronóstico del CHC, pudiendo complementar a AFP, incluso algunos de ellos permiten detectar la presencia de CHC en ausencia de AFP sérica. Además, la detección de estos marcadores se considera útil para el seguimiento de las CTCs en la sangre (50). También, nos proporcionan nuevas modalidades terapéuticas y representan nuevas dianas para los agentes quimioterápicos. Sin embargo, es difícil encontrar un único biomarcador con 100% de sensibilidad y especificidad en el CHC.

En este estudio analizamos los niveles de los siguientes biomarcadores: MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 e IL-8, todos ellos involucrados en el proceso de invasión y metástasis en el CHC.

Las MMPs presentan una participación compleja en el proceso metastásico (184), por lo que se cree que serían de gran ayuda para el diagnóstico temprano y seguimiento de la enfermedad (229,230). El aumento en la expresión de MMP-1 se asocia a una mayor invasividad y capacidad de migración de las células tumorales (244,412), concretamente, se ha visto que está involucrada en el proceso de intravasación (265). En 2001, Kim y cols., detectaron la expresión de RNAm de MMP-1, junto a otras MMPs en varias líneas celulares tumorales de hígado (282). Recientemente, Liao y cols. en 2012, observaron que existía una elevada expresión de MMP-1 en tejidos con CHC, siendo ésta ausente en tejidos sanos.

Tras evaluar la asociación entre los niveles de MMP-1 y los niveles de CTCs, no se encontró ninguna correlación significativa entre ellos, ni antes ni tras el trasplante. Se ha visto que las MMPs median la activación del proceso “EMT” en diferentes tumores epiteliales (413). En el estudio de Cierna y cols., en cáncer de mama, se vio la existencia de una correlación positiva significativa entre los niveles de CTCs con fenotipo “EMT” y los niveles de MMP-1, expresados por estas células. Sin embargo, no existió esta asociación entre los niveles de CTCs con marcadores epiteliales y los niveles de MMP-1 (414). En nuestro estudio determinamos las CTCs EpCAM+ (fenotipo epitelial), lo que podría ser una posible explicación a la no asociación con MMP-1. Así, la expresión de MMP-1 se asocia a aquellas células más invasivas con fenotipo mesenquimal, por lo que sería una buena diana terapéutica para la disminución del proceso metastásico (414).

En nuestro trabajo, se encontró una importante asociación de la concentración de MMP-1 con los niveles de AFP, en los pacientes con CHC durante la estancia en lista

de espera, y hasta los 2 años tras el trasplante. A pesar de que hay alguna evidencia de que los niveles de MMP-1 no se asocian a los niveles de AFP en el CHC (277), estos resultados ya fueron significativos anteriormente en un reciente estudio preliminar de nuestro grupo, el cuál fue llevado a cabo con 20 pacientes con CHC en lista de espera. Los niveles de MMP-1 y AFP correlacionaron de forma positiva tanto antes del trasplante como después de éste, hasta el año post-trasplante (415). Como ya se dijo, AFP presenta sobre todo un VPN elevado y en la actualidad su uso se limita únicamente a establecer el pronóstico del CHC. Así, MMP-1, igual que AFP podría considerarse un factor de recurrencia de la enfermedad.

En cuanto a la asociación de MMP-1 pre-trasplante con características clínicas estudiadas de los pacientes, no se encontró ninguna asociación destacable con ninguna de ellas. A pesar de que estudios, como el de Liao y cols., demostraron que la sobreexpresión de MMP-1 estaba asociada significativamente con el estadio tumoral, presencia de invasión y recurrencia en CHC (277), nuestros resultados coinciden con los de otros autores, los cuales dicen que la expresión de MMP-1 en la mayoría de tejidos con CHC era igual o inferior comparado con los tejidos adyacentes sin CHC y no presentaba asociación con características clínicopatológicas de la enfermedad, como el grado de diferenciación histopatológica del tumor (416). Podría ser que, con un mayor número de pacientes, estos resultados fueran significativos, pero esto queda por esclarecer en estudios posteriores.

El GPC3, es un proteoglicano oncofetal implicado en la morfogénesis y crecimiento (288,293) que en el adulto puede expresarse en algún tipo de neoplasias. Varios estudios han puesto de manifiesto la expresión específica de GPC3 en tejidos con CHC (289,417-419). En cuanto al estudio de los niveles de GPC3 en nuestros pacientes, sus niveles no correlacionaron con los niveles de CTCs ni AFP ni antes ni después del trasplante. Capurro y cols., mostraron que los niveles séricos de GPC3 determinados a través de ELISA son de utilidad en el diagnóstico temprano de CHC (289). Sin embargo, hay autores que demuestran que los niveles séricos y el nivel de expresión de GPC3 en pacientes con CHC no son superiores a los de los pacientes sin CHC (307,420). Otros, concluyen que los niveles séricos de GPC3 no presentan ninguna asociación con los niveles de AFP en CHC (289,421).

Además, no se encontró ninguna asociación significativa entre los niveles de GPC3 con los parámetros clínicopatológicos estudiados en los pacientes en lista de espera, a excepción de una correlación negativa significativa entre los niveles de GPC3 y el

números de TACES pre-trasplante realizadas y una asociación entre los niveles de GPC3 pre-trasplante con la presencia/ausencia de necrosis tumoral del hígado afecto. De manera, que aquellos pacientes que no presentaron necrosis hepática tenían mayores niveles medios de GPC3. Este hallazgo podría ser debido a que los pacientes con un menor tratamiento con TACE durante su estancia en lista de espera, presentarían una mayor proporción de tejido tumoral activo y, por lo tanto, mayores niveles de este marcador. Los resultados no significativos concuerdan con los obtenidos en algunos estudios previos en los que la expresión génica y niveles séricos de GPC3 no se asociaron ni al número de tumores, ni al estadio tumoral (307,421), ni con la presencia de recurrencia tras el trasplante hepático (421) ni a diferenciación histológica tumoral (421). Además, Morris y cols., encontraron que el 100% de las CTCs aisladas en pacientes con CHC expresaban GPC3, sin embargo éstas no se correlacionaron con características clínicas como etiología y estadio Child-Pugh (409). Así, sugerimos, que los niveles de GPC3 no presentarían utilidad para la detección del CHC. Tampoco reflejarían la progresión de esta enfermedad, no siendo un factor predictor de recurrencia post-quirúrgica en estos pacientes.

En cuanto a los demás marcadores, el VEGF es una molécula que está involucrada en varios mecanismos responsables de la progresión tumoral, invasión y metástasis. Presenta un importante papel en el desarrollo de CHC, promoviendo la supervivencia de las células tumorales, su proliferación y la angiogénesis (348,349).

Los niveles de VEGF-C determinados en este estudio, no tuvieron ninguna asociación significativa con los niveles de CTCs y AFP, ni antes ni después del trasplante. Tampoco encontramos ninguna asociación significativa entre los niveles de este marcador y las características clínicopatológicas de los pacientes.

Existen varios estudios que demuestran que los niveles de VEGF, correlacionan significativamente con la presencia de metástasis, invasión vascular, estadios avanzados de la enfermedad y mayores niveles de AFP, pudiendo ser un marcador útil de invasividad tumoral y predictor de la supervivencia en pacientes con CHC (350,353,359-361). Aquellos pacientes que presentaban tumores de mayor tamaño (>5 cm) y mayores niveles de AFP (>400 ng/mL), presentaban mayores niveles de VEGF, jugando un importante papel en el desarrollo del CHC (350). En 2015, Zhang y cols., determinaron los niveles plasmáticos de VEGF en pacientes con CHC sometidos posteriormente a TOH, concluyendo, que los niveles de VEGF pre-trasplante correlacionaban con la supervivencia tras el trasplante (354). Pacientes con valores pre-

trasplante de VEGF >44 pg/mL presentaron menor supervivencia tras el trasplante que aquellos con valores <44 pg/mL. Estos autores, demostraron, además, que valores elevados de VEGF pre-trasplante estaban asociados significativamente con la presencia de tumores múltiples, tumores de gran tamaño (>5 cm) e invasión vascular. A pesar de estos estudios, en los que se demuestra que VEGF se asocia a parámetros clínicos de los pacientes con CHC, existe bibliografía que refleja, de forma consonante a nuestro estudio, que los niveles de VEGF pre-trasplante no se asocia con el tamaño del tumor, ni con la presencia de invasión vascular (422). Otros muestran que no hay diferencias significativas en los niveles de VEGF entre las diferentes etiologías de la cirrosis, estadios Child-Pugh, ni entre diferentes grados de diferenciación tumoral (354). Zhang y cols., tampoco encontraron una asociación significativa entre los niveles de VEGF y los de AFP (354). De esta manera, según los resultados de nuestro trabajo y de la evidencia científica, creemos que el papel de VEGF-C como marcador serológico en pacientes trasplantados por CHC, no está claro, por lo que no sería un buen marcador para el seguimiento de estos pacientes.

Respecto a la OPN, es una molécula que participa tanto en procesos fisiológicos normales, como en fenómenos de patogénesis de varios estados de enfermedad (311). Está altamente expresada en diferentes cánceres, participando en procesos de invasión tumoral, progresión y metástasis (320). Se ha encontrado en plasma de pacientes con CHC y se considera un marcador, mejor incluso que la AFP, para el diagnóstico temprano de CHC (328,329,347).

En nuestro estudio, no se encontró ninguna asociación significativa entre los niveles de OPN y los niveles de CTCs y AFP, ni antes ni después del trasplante. Fouad y cols. (345) y Hodeib y cols. (344), determinaron los niveles plasmáticos de OPN y AFP en diferentes grupos de pacientes (CHC, enfermedad hepática crónica y sanos). Los valores de OPN y AFP fueron significativamente superiores en los pacientes con CHC en comparación con los otros grupos. Además, estos dos marcadores correlacionaban significativamente entre sí. Tal y como confirmaron previamente algunos estudios (343), estos autores concluyeron que el rendimiento diagnóstico de la OPN era similar a la AFP, con sensibilidades y especificidades para el diagnóstico de CHC muy similares. Sin embargo, otros autores mostraron resultados diferentes, en los cuales la OPN no presentaba correlación con AFP (329,423).

En este estudio, nosotros tampoco encontramos ninguna asociación significativa entre OPN y las características clínicopatológicas de los pacientes. Sin embargo, sí se

observó un aumento de OPN al mes y a los 6 meses post-trasplante en comparación con los niveles pre-trasplante, en los 3 pacientes con recidiva tras la cirugía (pacientes, 4, 10 y 16). Varios estudios demuestran que los niveles de OPN correlacionan con características clínicopatológicas de pacientes con CHC, tales como estadio del tumor, invasión vascular, metástasis y recidiva (320,424,425). Por lo que, según nuestros resultados, OPN podría estar asociado a la presencia de metástasis y ser un marcador de mal pronóstico en los pacientes trasplantados por CHC.

Por último, la IL-8 se considera un potente factor angiogénico (363). Varios estudios han demostrado que la expresión de esta interleucina está correlacionada con una mayor invasividad de las células tumorales, angiogénesis, invasión y metástasis en varios tumores sólidos (364-367). Estudios existentes muestran que esta molécula parece estar implicada tanto directamente como indirectamente en la progresión del CHC, jugando un papel crítico en la metástasis del este tumor (370,426), aunque el mecanismo no está del todo esclarecido.

En referencia a los niveles de IL-8 de nuestro trabajo, no encontramos ningún tipo de asociación significativa entre ellos y los niveles de CTCs y AFP, ni antes ni después del trasplante. Tampoco encontramos ninguna asociación significativa entre los niveles de marcador y las características clínicopatológicas de los pacientes. De forma consonante a los resultados de este trabajo, Kim y cols., no encontraron resultados significativos en la asociación de esta citoquina y parámetros indicadores de progresión de la enfermedad en el CHC tras el trasplante, como el número de tumores, invasión vascular y estadio tumoral (398). Nosotros tampoco encontramos diferencias en los niveles de IL-8 entre aquellos pacientes que tuvieron recidiva post-trasplante frente a los que no. A pesar de estos resultados, los niveles de IL-8 aumentaron considerablemente tras el trasplante en los tres pacientes que recidivaron y fallecieron tras la cirugía. Akiba y cols., en 2001, encontraron que aquellos pacientes que presentaron invasión venosa y portal por el tumor, expresaban niveles mayores de IL-8 (427). El mismo resultado se obtuvo en el estudio de Kubo y cols., en 2005, en el que los pacientes con CHC con expresión de IL-8 positiva, mostraron una mayor incidencia de invasión vascular tumoral, que los pacientes sin expresión de IL-8 (426). Otros estudios, mostraron que los niveles séricos de IL-8 parecían correlacionar con el tamaño del tumor y el estadio tumoral (50,426,428), y a una menor supervivencia en estos pacientes (428,429). Un estudio reciente, sugiere que la determinación de los niveles de IL-8 antes del tratamiento con TACE en pacientes con CHC, predice la respuesta al tratamiento y la SLE tras el

trasplante (398). Los pacientes con niveles pre-TACE de IL-8 más elevados (>32 pg/mL), presentaron mayor incidencia de enfermedad refractaria tras la TACE, y menor supervivencia libre de recidiva tras el trasplante. Según nuestros resultados, IL-8, sería un marcador interesante en la progresión de la enfermedad tras la cirugía, predictor de recidiva y mortalidad tras el trasplante en pacientes con CHC.

Tras el estudio y seguimiento de los niveles de CTCs y de los demás marcadores tumorales en el CHC, desde el momento pre-trasplante hasta los dos años post-trasplante, encontramos niveles de CTCs pre-trasplante más elevados que los niveles post-trasplante. Se observó cómo, claramente, los niveles medianos de CTCs de los pacientes incluidos en el estudio, presentaron una tendencia descendente tras el trasplante hepático. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Yao y cols., los cuales observaron que la detección de CTCs en pacientes con CHC tras el tratamiento quirúrgico, era significativamente inferior que los niveles de CTCs antes del tratamiento, por lo que las CTCs originadas del tumor primario, pueden reducirse tras la cirugía curativa. Aunque los niveles post-trasplante descendieron, tampoco desaparecieron por completo. Una posible explicación a la presencia de CTCs después del trasplante en los pacientes incluidos en este estudio, es que, tras la manipulación quirúrgica, una manipulación inadecuada del hígado (compresión hepática excesiva que daña al tejido que rodea al tumor), puede favorecer la liberación de células tumorales hepáticas al torrente sanguíneo (407). Además, el ambiente interno alterado tras la cirugía puede facilitar la colonización de estas células y posterior recurrencia y metástasis (430). Adicionalmente, se ha visto que traumas quirúrgicos que originan isquemia, pueden aumentar la liberación de citoquinas que favorecen la invasión, migración y proliferación de las CTCs, dando lugar a focos metastásicos (431). Es decir, un paciente sin CTCs antes de la cirugía, puede presentar CTCs tras ella. Este fenómeno junto con la inmunosupresión de estos pacientes tras el trasplante, hace que las CTCs puedan permanecer en sangre periférica durante un tiempo. Otra posibilidad, es la presencia de micrometástasis ocultas no detectadas.

De forma similar a las CTCs, AFP y MMP-1 mostraron diferencias significativas en sus niveles entre los pacientes antes de ser trasplantados, y al mes, al año y a los 2 años tras el trasplante, observando como sus niveles descendieron significativamente tras el trasplante. Sin embargo, las diferencias en los niveles entre antes del trasplante y a los 6 meses post-trasplante, no fueron significativas. Esto pudo ser debido a la presencia de 4

pacientes trasplantados cuyos niveles de MMP-1 y AFP aumentaron a los 6 meses (pacientes 2, 4, 10 y 16), de los cuales, a 3 de ellos se les detectó recidiva tumoral mediante PET-TC (pacientes 4, 10 y 16), coincidiendo con la elevación de los marcadores. La presencia de micrometástasis no encontradas por PET-TC, pero que causan una elevación de ambos marcadores, podría ser una explicación, para el otro paciente. La elevación de ambos marcadores en estos pacientes tras el trasplante, nos indica que ambos posiblemente se asocien a la recidiva tumoral.

Analizando la evolución de los niveles de IL-8 a lo largo de los 2 años tras el trasplante, pudimos observar como existía una tendencia a la disminución de sus niveles medianos en comparación con los niveles pre-trasplante, llegando a ser prácticamente negativos a los 2 años, aunque estos resultados no fueron significativos, a excepción del año post-trasplante. La evidencia científica sugiere que las células cancerosas pueden segregar distintos perfiles de citoquinas (432), por lo que al disminuir las CTCs tras el trasplante, es lógico pensar que también lo hagan los niveles de IL-8. Las citoquinas, entre las que se encuentra la IL-8, son moléculas que pueden reflejar la inflamación y se consideran un factor pronóstico adverso (433). IL-8 se ha asociado previamente con angiogénesis, proliferación celular, e invasión tumoral (434). Varios estudios han asociado niveles séricos elevados de IL-8 con una corta supervivencia libre de enfermedad y con la presencia de recurrencia en el CHC (429,433,435). El hecho de que los niveles de IL-8, no fueran significativamente inferiores tras el trasplante puede deberse a que los niveles de esta interleucina aumentaron considerablemente, a partir del mes del trasplante, en dos de los pacientes que recidivaron (pacientes 4 y 10).

En cuanto a la evolución de OPN antes y después del trasplante, encontramos diferencias significativas entre los niveles de OPN pre-trasplante y los niveles de OPN al mes, a los 6 meses y a los 2 años post-trasplante, siendo los niveles medianos significativamente superiores al mes y a los 6 meses, e inferiores a los 2 años post-trasplante. La evolución de los niveles medianos de OPN a lo largo de los 2 años post-trasplante, muestra que, a pesar de haber un incremento significativo de los niveles tras la cirugía, estos adoptan una pauta descendente, llegando incluso a valores inferiores a los 2 años post-trasplante. El aumento de OPN al mes y a los 6 meses, coincide con un aumento brusco de este marcador al mes y a los 6 meses, en los 3 pacientes con recidiva post-trasplante (pacientes, 4, 10 y 16). Varios estudios, muestran como la sobreexpresión de OPN y sus altos niveles en suero, se relaciona con altas tasas de recidiva y una corta supervivencia tras el TOH en pacientes con CHC (337,338). Zhou y

cols., demostraron además, que los niveles séricos de OPN descendían significativamente tras la resección curativa del CHC, y que sólo en los casos de recurrencia del tumor, los niveles de OPN aumentaban (436). Por lo que IL-8 y OPN, como ya mencionamos anteriormente, serían marcadores interesantes en la progresión de la enfermedad tras la cirugía, siendo útiles para monitorizar la respuesta al tratamiento y la recurrencia tras la cirugía curativa.

En cuanto a los niveles medianos de VEGF-C antes y después del trasplante, en este trabajo, encontramos un aumento significativo a los 6 meses y al año post-trasplante. La cirugía hepática puede suponer una situación general de estrés tisular, con la aparición de hipoxia. Esta hipoxia puede inducir un aumento de VEGF, tal y como se ha visto en algunos estudios realizados en pacientes con CHC sometidos a TACE, en los que los niveles de VEGF aumentaban temporalmente tras ella, seguido de un descenso de los niveles (437). En pacientes con CHC sometidos a trasplante también se ha visto un aumento de micropartículas endoteliales tras la cirugía, entre las que se encuentran VEGF, con una normalización posterior en todos los pacientes (438), por lo que los autores concluyen que este hecho podría deberse a una situación de estrés tras la cirugía. Sólo los pacientes que tuvieron complicaciones, tales como sepsis, fallo renal o fallecimiento, mantuvieron niveles post-trasplante elevados de estas moléculas en suero. En nuestro estudio podríamos esperar que el aumento de este biomarcador tras el trasplante fuera debido a un aumento de éste en los pacientes con recidiva post-cirugía. Sin embargo, de los tres pacientes con recidiva, el paciente 16 fue el único paciente en el que se constató un aumento progresivo de VEGF-C tras el trasplante alcanzando valores máximos al año, cuando falleció. Por lo que el aumento post-trasplante en nuestros pacientes puede ser debido a otros procesos no tumorales. Se observó que, los niveles de VEGF-C finalmente descendieron a los 2 años, aunque esta disminución no fue significativa.

Respecto al estudio de los niveles de GPC3 en nuestros pacientes, no encontramos diferencias significativas en sus niveles entre antes y después del trasplante. Existe una gran heterogeneidad en los resultados aportados por los estudios de GPC3 en CHC. Algunos de ellos, consideran el GPC3 como un factor pronóstico negativo tras el trasplante (304), otros, muestran que los niveles séricos de GPC3 no se asocian a características clínicas de los pacientes (307,421), resultados que coincidirían con los nuestros. Así, GPC3, aunque está presente en nuestros pacientes con CHC, permanece invariable a pesar de eliminar el tumor original. Una posible explicación sería la de que

GPC3 es una glicoproteína de membrana que puede ser liberada desde la superficie celular al ambiente extracelular. Así, los niveles séricos de GPC3 no serían un reflejo de la expresión de esta proteína en el tejido tumoral. Además, existen diferentes formas moleculares de GPC3 (289,308), y los diferentes estudios pueden emplear diferentes anticuerpos que reconocen diferentes epítomos en las técnicas de ELISA.

Por lo que el empleo de estos dos marcadores (GPC3 y VEGF-C) para el seguimiento de la evolución de estos pacientes, sería cuestionable.

Tras separar a los pacientes que tuvieron invasión vascular de los que no, tras la biopsia hepática, destacamos los niveles de AFP, MMP-1 e IL-8 obtenidos en estos pacientes antes y después del trasplante. Claramente, los valores de estos tres marcadores, descendieron al año post-trasplante en los pacientes sin invasión vascular, mientras que los valores de estos, permanecieron invariables transcurrido el año post-trasplante en los pacientes con invasión vascular. Liao y cols., demostraron que la sobreexpresión de MMP-1 estaba asociada significativamente con presencia de invasión y recurrencia en CHC (277). Otros estudios, han asociado la presencia de elevados niveles de IL-8 y AFP con una mayor incidencia de invasión vascular tumoral (60,434). Los niveles de CTCs en los pacientes sin invasión vascular, también fueron inferiores al año post-trasplante en comparación con los niveles pre-trasplante, resultado que se acercó al límite de la significancia ($p=0,056$). Kelley y cols., asociaron los niveles de CTCs a la presencia de invasión vascular en enfermos con CHC (175). Así, en aquellos pacientes sin invasión, tras eliminar el tumor mediante cirugía, los niveles de estos marcadores descienden y, sin embargo, en aquellos con invasión vascular no. Esto demostraría, una vez más, la asociación de los niveles de CTCs, AFP, MMP-1 e IL-8 con un mal pronóstico y con posibles recidivas futuras en el CHC.

Varios estudios, para la detección de CTCs en pacientes con CHC sometidos a resección hepática, han asociado la positividad de CTCs preoperatorias con recurrencias del tumor y una SLE más corta tras la resección, sugiriendo que la determinación de CTCs a tiempo real, podría ser un parámetro útil en el seguimiento de la respuesta al tratamiento quirúrgico y en la recurrencia de la enfermedad (178,410). Sun y cols., establecieron un nivel de ≥ 2 CTCs/7,5 mL determinadas con el sistema CellSearch® como el mejor punto de corte para la predicción de recurrencia temprana tras resección, con un AUC de 0,750 y una sensibilidad y especificidad de 70,60% y 80%,

respectivamente (178). Wang y cols., tras el estudio de la capacidad de predicción de recidiva de las CTCs preoperatorias determinadas por filtración y posterior análisis del ARNm, obtuvieron un AUC=0,691, con un punto de corte de ≥ 4 CTCs, (sensibilidad de 76,9% y especificidad de 58,3%). Concretamente, fueron las CTCs mesenquimales (con expresión de Vimentina y Twist), las que presentaron un mayor AUC (0,764), con un punto de corte de ≥ 1 CTC y sensibilidad y especificidad del 69,2% y 80,6% respectivamente, demostrando que las células con características mesenquimáticas presentaban mayor riesgo de recidiva tras la cirugía por ser las más invasivas (410).

Nuestros resultados muestran que los niveles de CTCs presentan un AUC similar al de los estudios encontrados en la literatura (178,410), aunque con diferente sensibilidad, especificidad y diferente punto de corte. En nuestro estudio 3 pacientes tuvieron recidiva tras la cirugía. En ellos, los niveles de CTCs pre-trasplante fueron de 91, 9 y 1768 CTCs/10 mL, respectivamente. Tras el estudio de la capacidad predictora de recidiva post-trasplante mediante la elaboración de las curvas ROC, encontramos que los niveles de CTCs presentaban una mayor capacidad de predicción de recidiva que MMP-1 y AFP, con una AUC de 0,750, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos ($p > 0,05$). El mejor punto de corte para la discriminación de recidiva post-trasplante, obtenido a partir del mejor índice Youden, fue de ≥ 8.5 CTCs/10 mL, S=100% y E=50%. Nosotros empleamos el método Isoflux[®] para la cuantificación de CTCs, mientras que, en los estudios citados, el sistema CellSearch[®] y la filtración y posterior análisis de ARNm fueron las técnicas empleadas para el análisis de CTCs (178,410), motivo por el que probablemente se deban estas diferencias.

Tras las CTCs, los mejores marcadores pre-trasplante para predecir recurrencia en nuestro estudio fueron MMP-1 y AFP, aunque los resultados tampoco fueron significativos y presentaron una capacidad predictora baja. MMP-1 con AUC= 0,639, punto de corte de $\geq 1,27$ ng/mL, S=100% y E=37,5% y AFP con AUC=0,590, con punto de corte de ≥ 9 ng/mL, S=66,6% y E=79,16%. Liao y cols., demostraron que la sobreexpresión de MMP-1 estaba asociada significativamente con presencia de recidiva tumoral (277), considerando a MMP-1 como un factor pronóstico independiente. Sin embargo, el significado clínico de AFP en la predicción de la recurrencia del CHC tras el trasplante, es controvertido. Hay estudios en los que asocian la expresión preoperatoria de AFP con la recurrencia, pudiendo servir como un factor predictor de recaída de la enfermedad tumoral tras el trasplante (421), mientras que, en otros, se

muestra que AFP sola no es suficiente para predecir recurrencia. Su interpretación debe hacerse junto a otros factores pronósticos demostrados, como la diferenciación histológica tumoral y la invasión tumoral (439-441).

Estos tres marcadores parecen ser los únicos que tendrían la capacidad de predecir recidiva o metástasis tras el trasplante, a pesar de no encontrar resultados significativos, por lo que deberíamos obtener un mayor número de recidivas post-trasplante para ver si estos resultados llegan a ser significativos. MMP-1 podría tratarse de un nuevo biomarcador determinante en el diagnóstico temprano y monitorización del CHC e, incluso, podría ser mejor que la AFP para la detección de recidiva.

Las CTCs se han correlacionado con parámetros tales como, la SLE y la SG, en pacientes con cáncer de mama, colorrectal y próstata metastatizante (105-110), así como en otros tipos de cáncer.

Existen varios estudios en los que se han asociado las CTCs preoperatorias, determinadas por el método CellSearch[®], con bajos tiempos de supervivencia libre de enfermedad tumoral, y en los que se sugiere que las CTCs podrían ser buenas predictoras de la evolución del CHC tras la cirugía (178,442). Schulze y cols., correlacionaron la presencia de CTCs EpCAM+ determinadas por CellSearch[®], con una peor SG (155). La presencia de CTCs se relacionó con estadios más avanzados de la enfermedad y con la aparición de metástasis.

De igual forma, la detección de CTCs en CHC a través de otros métodos diferentes a la detección inmunomagnética, también se ha asociado a parámetros clinicopatológicos de bajo pronóstico, como la presencia de metástasis, con una corta SLE y SG de estos pacientes tras la cirugía (392,402,408).

En nuestro estudio, de los 27 pacientes con CHC que fueron trasplantados, 5 pacientes (15,52%) fallecieron tras el trasplante, 3 de los cuales (11,11%) fallecieron debido a recidiva/metástasis post-trasplante. No se encontró ninguna correlación significativa entre los niveles de CTCs pre-trasplante con el tiempo de supervivencia y el tiempo de supervivencia libre de recidiva/metástasis tras el trasplante. Sin embargo, sí que existió una tendencia a una menor supervivencia (tanto general como libre de enfermedad) en los pacientes con valores de CTCs pre-trasplante más elevados, por lo que nuestros resultados se asemejan a los encontrados en la bibliografía.

En la literatura encontramos algunos estudios en los que asocian diferentes características clínicas y analíticas a un mal pronóstico en CHC, con recidiva o metástasis tras la cirugía y, por lo tanto, a menores tiempos de SG y SLE.

Se sabe que la invasión vascular en el hígado afecto, es un factor de riesgo para la recurrencia tras el trasplante. Los pacientes sin invasión vascular presentan mayor SLE (443). Estos resultados también fueron evidenciados en el estudio de Wang y cols. (421), en el que se vio que la presencia de invasión vascular y la expresión de AFP pre-trasplante eran factores predictores de la recurrencia y una menor SLE tras el trasplante hepático en pacientes con CHC.

Liao y cols., encontraron que los pacientes con CHC con elevados niveles de MMP-1 mostraban una corta SLE Y SG en comparación con aquellos pacientes con niveles disminuidos(277).

Kim y cols., llegaron a la conclusión de que los niveles elevados de bilirrubina, GOT, y AFP, la presencia de múltiples tumores y la invasión vascular eran factores predictores de una corta SLE tras el trasplante hepático en pacientes con CHC (398).

En nuestro estudio, tras analizar las curvas de supervivencia de pacientes trasplantados con diferentes características clínico-analíticas, posibles predictoras de una corta supervivencia tras la cirugía, se observó que no existían diferencias estadísticamente significativas en la SLE y SG entre los grupos de pacientes con niveles disminuidos y elevados de CTCs, AFP, MMP-1, bilirrubina, GOT y GPT, ni entre pacientes con ausencia o presencia de invasión vascular, ni entre aquellos con una única o múltiples LOES. A pesar de estos resultados no significativos, la tendencia a los dos años post-trasplante fue la de una menor SLE para los pacientes con mayores niveles de CTCs, AFP, MMP-1, bilirrubina, GOT, y para los pacientes con más de un nódulo tumoral y los que presentaron invasión vascular. En el caso de la SG, ésta fue peor a los 2 años, en aquellos pacientes con mayores niveles de CTCs, AFP, pacientes con varias LOES y pacientes con invasión vascular, aunque los resultados tampoco fueron significativos.

Kelley y cols., estudiaron los niveles de CTCs en pacientes con CHC metastásico, empleando el sistema CellSearch® (175). Observaron que los pacientes con presencia de CTCs en sangre tenían una media de SG menor que los pacientes con CHC sin CTCs detectables, aunque estas diferencias, como en nuestro estudio, no fueron estadísticamente significativas. Estos autores, tampoco encontraron diferencias

estadísticamente significativas en la media de SG en los pacientes con CHC, entre niveles bajos y elevados de AFP y presencia/ausencia de invasión vascular (175).

Así, CTCs, AFP, MMP-1, bilirrubina, GOT, GPT, la presencia de más de un nódulo tumoral y la presencia de invasión vascular, podrían ser buenos marcadores pronósticos de recidiva post-trasplante.

Las perspectivas futuras en el uso de la tecnología Isoflux[®] para la detección de CTCs y en la detección de otros marcadores indicadores de progresión de la enfermedad tumoral son muy buenas. No obstante, en la actualidad, las CTCs no se emplean como marcadores pronósticos de forma rutinaria en CHC, debido a varias razones: falta de sensibilidad de las técnicas empleadas para la detección de CTCs, empleo de muestras pequeñas que limitan la significancia estadística con resultados contradictorios o no concluyentes. Además, las diferencias encontradas entre los distintos resultados encontrados en la literatura científica con respecto al estudio de MMP-1, VEGF-C, OPN, GPC3 e IL-8, se deben a diferencias al procedimiento de medición empleado en cada uno de los estudios, en los que existen discrepancias en los anticuerpos usados para la detección de estas moléculas, los cuales, reconocen distintos aminoácidos de la proteína.

Por todo ello, se requieren nuevas tecnologías más sensibles y estudiar mayor número de pacientes, poblaciones más diversas, con diferentes demográficos, características tumorales, estadios de la enfermedad, para poder validar el valor pronóstico de todos estos marcadores y su punto de corte óptimo antes de la aplicación clínica.

Sería necesario llevar a cabo nuevas investigaciones clínicas para comprobar si la determinación de estos biomarcadores en la circulación sanguínea de enfermos con CHC, puede proporcionar un valor pronóstico en la evolución del mismo y así poder elegir el mejor tratamiento para prevenir la recidiva. Además, estandarizar las técnicas genéticas para la determinación de las CTCs en el laboratorio clínico asistencial es hoy día relativamente sencilla. En un futuro próximo, la detección de las CTCs, de los marcadores y su estudio molecular en profundidad, podría ser una buena herramienta pronóstica para la individualización del tratamiento del CHC.

7. CONCLUSIONES

De los resultados del presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

Primera: el sistema Isoflux[®] no es un método intercambiable con el sistema CellSearch[®], demostrándose que es un mejor sistema de aislamiento y de determinación de CTCs en pacientes con CHC sometidos a trasplante.

Segunda: la concentración de CTCs pre-trasplante en sangre periférica en pacientes con CHC, está asociada a factores bioquímicos de mal pronóstico (bilirrubina), a un mayor estado de inflamación hepática (PCR) y a factores clínicos tales como, un mayor tiempo de estancia en lista de espera, un mayor número de tumores y la presencia de invasión vascular, todos ellos asociados con una peor evolución de la enfermedad tumoral.

Tercera: la concentración de CTCs en sangre periférica de pacientes con CHC no se asocia a la etiología de la cirrosis previa al cáncer hepático, por lo que la presencia de enfermedad tumoral y como consecuencia, los niveles de CTCs en sangre, son independientes del tipo de enfermedad sobre la que asienta este tumor.

Cuarta: MMP-1, IL-8 y OPN, son nuevos biomarcadores interesantes para la monitorización de la progresión de la enfermedad tras la cirugía curativa, mejores que los niveles de GPC3 y de VEGF-C en los pacientes con CHC.

Quinta: a pesar de que los niveles de CTCs, AFP y MMP-1 descienden tras la cirugía, estos no son predictores de la supervivencia general y supervivencia libre de recidiva o metástasis, según los resultados no significativos obtenidos en este estudio.

Sexta: se necesitan trabajos más amplios, junto a una caracterización genética de las CTCs, para corroborar o conseguir significancia en los resultados.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
- (2) Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003 Dec 6;362(9399):1907-17.
- (3) Shariff MI, Cox IJ, Gomaa AI, Khan SA, Gedroyc W, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009 Aug;3(4):353-67.
- (4) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001 Oct 15;94(2):153-56.
- (5) Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, et al. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology* 2004 Apr;126(4):1005-14.
- (6) Martilla Peña A, Chiva M, Fernández-Simón A, Romerao Cristóbal M. Hepatocarcinoma. 2012;11(12):693-703.
- (7) Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S5-S16.
- (8) Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002 Aug;31(4):339-46.
- (9) Theise ND, Park YN, Kojiro M. Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis. *Clin Liver Dis* 2002 May;6(2):497-512.
- (10) Lewis S, Roayaie S, Ward SC, Shyknevsky I, Jibara G, Taouli B. Hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C in the absence of advanced fibrosis or cirrhosis. *AJR Am J Roentgenol* 2013 Jun;200(6):W610-6.
- (11) 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.
- (12) Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981 Nov 21;2(8256):1129-33.
- (13) 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.
- (14) Budhu A, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol* 2006 Dec;80(6):1197-213.

- (15) Yatsuji S, Hashimoto E, Tobar M, Taniai M, Tokushige K, Shiratori K. Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2009 Feb;24(2):248-54.
- (16) Wang CS, Yao WJ, Chang TT, Wang ST, Chou P. The impact of type 2 diabetes on the development of hepatocellular carcinoma in different viral hepatitis statuses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009 Jul;18(7):2054-60.
- (17) Tung HD, Wang JH, Tseng PL, Hung CH, Kee KM, Chen CH, et al. Neither diabetes mellitus nor overweight is a risk factor for hepatocellular carcinoma in a dual HBV and HCV endemic area: community cross-sectional and case-control studies. *Am J Gastroenterol* 2010 Mar;105(3):624-31.
- (18) Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arai S, Imai Y, et al. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011 May;9(5):428-33; quiz e50.
- (19) 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.
- (20) Bravi F, Bosetti C, Tavani A, Bagnardi V, Gallus S, Negri E, et al. Coffee drinking and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Hepatology* 2007 Aug;46(2):430-5.
- (21) Yuen MF, Cheng CC, Laufer JJ, Lam SK, Ooi CG, Lai CL. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience. *Hepatology* 2000 Feb;31(2):330-5.
- (22) Sugano S, Miyoshi K, Suzuki T, Kawafune T, Kubota M. Intrahepatic arteriovenous shunting due to hepatocellular carcinoma and cirrhosis, and its change by transcatheter arterial embolization. *Am J Gastroenterol* 1994 Feb;89(2):184-8.
- (23) Luo JC, Hwang SJ, Wu JC, Lai CR, Li CP, Chang FY, et al. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma patients with paraneoplastic syndromes. *Hepatogastroenterology* 2002 Sep-Oct;49(47):1315-9.
- (24) 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.
- (25) European Association For The Study Of The Liver, European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012 Apr;56(4):908-43.
- (26) Bolondi L, Sofia S, Siringo S, Gaiani S, Casali A, Zironi G, et al. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut* 2001 Feb;48(2):251-9.

- (27) Forner A, Reig M, Varela M, Burrel M, Feliu J, Briceno J, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update consensus document from the AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI and SETH. *Med Clin (Barc)* 2016 Jun 3;146(11):511.e1-511.e22.
- (28) 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.
- (29) Higashi K, Clavo AC, Wahl RL. Does FDG uptake measure proliferative activity of human cancer cells? In vitro comparison with DNA flow cytometry and tritiated thymidine uptake. *J Nucl Med* 1993 Mar;34(3):414-9.
- (30) Thie JA. Understanding the standardized uptake value, its methods, and implications for usage. *J Nucl Med* 2004 Sep;45(9):1431-4.
- (31) Waidely E, Obaid Al-Yuobi A, Bashammakh A, El-Shahawi M, Leblanc R. Serum protein biomarkers relevant to hepatocellular carcinoma and their detection. *Analyst* 2016;141:36.
- (32) Bergstrand CG, Czar B. Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest* 1956;8(2):174.
- (33) Gomaa AI, Khan SA, Leen ELS, Waked I, Taylor-Robinson SD. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009 Mar 21;15(11):1301-14.
- (34) 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.
- (35) Thompson Coon J, Rogers G, Hewson P, Wright D, Anderson R, Cramp M, et al. Surveillance of cirrhosis for hepatocellular carcinoma: systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess* 2007 Sep;11(34):1-206.
- (36) Daniele B, Bencivenga A, Megna AS, Tinessa V. Alpha-fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S108-12.
- (37) Collier J, Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;27(1):273-8.
- (38) 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.
- (39) 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.

- (40) Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, Mazzella G, Accogli E, Caraceni P, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol* 2001 Apr;34(4):570-5.
- (41) Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;62 Suppl 1:57-63.
- (42) Toyoda H, Kumada T, Kiriyaama S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, et al. Changes in the characteristics and survival rate of hepatocellular carcinoma from 1976 to 2000: analysis of 1365 patients in a single institution in Japan. *Cancer* 2004 Jun 1;100(11):2415-21.
- (43) Vejchapipat P, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Chittmittrapap S, Poovorawan Y. Association between serum hepatocyte growth factor and survival in untreated hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2004 Dec;39(12):1182-8.
- (44) Ioannou GN, Perkins JD, Carithers RL, Jr. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: impact of the MELD allocation system and predictors of survival. *Gastroenterology* 2008 May;134(5):1342-51.
- (45) Kumada T, Nakano S, Takeda I, Sugiyama K, Osada T, Kiriyaama S, et al. Patterns of recurrence after initial treatment in patients with small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997 Jan;25(1):87-92.
- (46) Borel F, Konstantinova P, Jansen PL. Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012 Jun;56(6):1371-83.
- (47) Forner A, Ayuso C, Isabel Real M, Sastre J, Robles R, Sangro B, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Med Clin (Barc)* 2009 Feb 28;132(7):272-87.
- (48) Leoni S, Piscaglia F, Golfieri R, Camaggi V, Vidili G, Pini P, et al. The impact of vascular and nonvascular findings on the noninvasive diagnosis of small hepatocellular carcinoma based on the EASL and AASLD criteria. *Am J Gastroenterol* 2010 Mar;105(3):599-609.
- (49) Sangiovanni A, Manini MA, Iavarone M, Romeo R, Forzenigo LV, Fraquelli M, et al. The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Gut* 2010 May;59(5):638-44.
- (50) Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006 Feb 28;12(8):1175-81.
- (51) Cui R, He J, Zhang F, Wang B, Ding H, Shen H, et al. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKAI) and hepatoma-specific band of

serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma markers complementary to alpha-fetoprotein. *Br J Cancer* 2003 Jun 16;88(12):1878-82.

(52) Walsh SR, Cook EJ, Goulder F, Justin TA, Keeling NJ. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2005 Sep 1;91(3):181-4.

(53) Gomez D, Morris-Stiff G, Toogood GJ, Lodge JP, Prasad KR. Impact of systemic inflammation on outcome following resection for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Surg Oncol* 2008 May 1;97(6):513-8.

(54) Bhatti I, Peacock O, Lloyd G, Larvin M, Hall RI. Preoperative hematologic markers as independent predictors of prognosis in resected pancreatic ductal adenocarcinoma: neutrophil-lymphocyte versus platelet-lymphocyte ratio. *Am J Surg* 2010 Aug;200(2):197-203.

(55) 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.

(56) 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.

(57) Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut* 2014 May;63(5):844-55.

(58) Cheng SJ, Freeman RB, Jr, Wong JB. Predicting the probability of progression-free survival in patients with small hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2002 Apr;8(4):323-8.

(59) Grizzi F, Franceschini B, Hamrick C, Frezza EE, Cobos E, Chiriva-Internati M. Usefulness of cancer-testis antigens as biomarkers for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *J Transl Med* 2007;5:3.

(60) Sakata J, Shirai Y, Wakai T, Kaneko K, Nagahashi M, Hatakeyama K. Preoperative predictors of vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2008 Aug;34(8):900-5.

(61) Kew MC. Prevention of hepatocellular carcinoma. *HPB : The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2005;7(1):16-25.

(62) Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004 Oct 7;351(15):1521-31.

(63) Camma C, Giunta M, Andreone P, Craxi A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *J Hepatol* 2001 Apr;34(4):593-602.

- (64) Meijide Míguez H. CHILD- PUGH Clasificación pronóstica de la hepatopatía. Medicina Interna CHU Juan Canalejo A Coruña .
- (65) Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. Major Probl Clin Surg 1964;1:1-85.
- (66) 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.
- (67) 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.
- (68) 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 Hepatocellulaire. J Hepatol 1999 Jul;31(1):133-41.
- (69) 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.
- (70) Vauthey JN, Dixon E, Abdalla EK, Helton WS, Pawlik TM, Taouli B, et al. Pretreatment assessment of hepatocellular carcinoma: expert consensus statement. HPB (Oxford) 2010 Jun;12(5):289-99.
- (71) 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.
- (72) Pons F, Varela M, Llovet JM. Staging systems in hepatocellular carcinoma. HPB (Oxford) 2005;7(1):35-41.
- (73) 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.
- (74) Zubrod, CG., Scheneidermann, M., Frei, E., y cols. Appraisal of methods for the study of chemotherapy of cancer in man: comparative therapeutic trial of nitrogen mustard and trietyhlene thiophosphoramide. J Chron Dis 1960;11:7-33.
- (75) Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J. Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. Semin Liver Dis 2010 Feb;30(1):61-74.
- (76) Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. Hepatology 2002 Mar;35(3):519-24.

- (77) Mazzaferro V. Results of liver transplantation: With or without milan criteria? *Liver Transplantation* 2007;13(S2):S44-S47.
- (78) Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996 Mar 14;334(11):693-9.
- (79) Ikeda K, Saitoh S, Tsubota A, Arase Y, Chayama K, Kumada H, et al. Risk factors for tumor recurrence and prognosis after curative resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1993 Jan 1;71(1):19-25.
- (80) Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954 May;7(3):462-503.
- (81) 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.
- (82) Llovet JM, Real MI, Montana 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.
- (83) Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000 Apr;31(4):864-71.
- (84) Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003 Jan;124(1):91-6.
- (85) Marelli L, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, et al. Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007 Jan-Feb;30(1):6-25.
- (86) 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.
- (87) Lencioni R, Marrero J, Venook A, Ye SL, Kudo M. Design and rationale for the non-interventional Global Investigation of Therapeutic DEcisions in Hepatocellular Carcinoma and Of its Treatment with Sorafenib (GIDEON) study. *Int J Clin Pract* 2010 Jul;64(8):1034-41.
- (88) Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 2007 Mar;46(3):474-81.

- (89) Ferrer Puchol MD, la Parra C, Esteban E, Vaño M, Forment M, Vera A, et al. Quimioembolización del hepatocarcinoma: partículas cargadas frente a quimioembolización convencional. *Radiología* 2011;53(03):246-53.
- (90) Lammer J, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A, et al. Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010 Feb;33(1):41-52.
- (91) Lencioni R, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A, et al. A randomized phase II trial of a drug eluting bead in the treatment of hepatocellular carcinoma by transcatheter arterial chemoembolization. *J Clin Oncol* 2009;27:4523.
- (92) Clavien PA, Lesurtel M, Bossuyt PMM, Gores GJ, Langer B, Perrier A, et al. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol* 2012 Jan;13(1):e11-22.
- (93) Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2010 Feb;30(1):52-60.
- (94) Asworth T. A case of cancer in which cells similar to those in tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869;14:146-7.
- (95) Kaiser J. Medicine. Cancer's circulation problem. *Science* 2010 Feb 26;327(5969):1072-4.
- (96) Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004 Oct 15;10(20):6897-904.
- (97) Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011 Mar 25;331(6024):1559-64.
- (98) Uhr JW, Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Jul 26;108(30):12396-400.
- (99) Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Dec 19;97(26):14608-13.
- (100) Fabisiewicz A, Kulik J, Kober P, Brewczynska E, Pienkowski T, Siedlecki JA. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Acta Biochim Pol* 2004;51(3):747-55.
- (101) Pantel K, Alix-Panabieres C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 2010 Sep;16(9):398-406.

- (102) Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Rev Proteomics* 2007 Dec;4(6):741-56.
- (103) Attard G, de Bono JS. Utilizing circulating tumor cells: challenges and pitfalls. *Curr Opin Genet Dev* 2011 Feb;21(1):50-8.
- (104) Lianidou ES, Mavroudis D, Sotiropoulou G, Agelaki S, Pantel K. What's new on circulating tumor cells? A meeting report. *Breast Cancer Res* 2010;12(4):307.
- (105) Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005 Mar 1;23(7):1420-130.
- (106) Yagata H, Nakamura S, Toi M, Bando H, Ohno S, Kataoka A. Evaluation of circulating tumor cells in patients with breast cancer: multi-institutional clinical trial in Japan. *Int J Clin Oncol* 2008 Jun;13(3):252-6.
- (107) Tibbe AG, Miller MC, Terstappen LW. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry A*. 2007 Mar;71(3):154-62.
- (108) Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, et al. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007 Apr 1;13(7):2023-9.
- (109) Tol J, Koopman M, Miller MC, Tibbe A, Cats A, Creemers GJ, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann Oncol* 2010 May;21(5):1006-12.
- (110) Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009 Jul;20(7):1223-9.
- (111) Negin BP, Meropol NJ, Alpaugh RK, Ruth K, McAleer C, Halbherr T, et al. Characterization and prognostic significance of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with metastatic pancreatic cancer. *JCO* 2010 05/20; 2017/09;28(15):4127.
- (112) Mudan S, Giakoustidis A, Thillainayagam AV, Jacob J, Stebbing J. Clinical utility of circulating tumor cell measurement in the diagnosis of indeterminate lesions of the pancreas. *Future Oncol* 2010 Jan;6(1):177-9.
- (113) Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, Saikawa Y, Suda K, Ando T, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 2008 Nov;15(11):3092-100.
- (114) Nakamura T, Yasumura T, Hayashi K, Eguchi R, Ide H, Takasaki K, et al. Immunocytochemical detection of circulating esophageal carcinoma cells by immunomagnetic separation. *Anticancer Res* 2000 Nov-Dec;20(6C):4739-44.

- (115) Khan MS, Tsigani T, Rashid M, Rabouhans JS, Yu D, Luong TV, et al. Circulating tumor cells and EpCAM expression in neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2011 Jan 15;17(2):337-45.
- (116) Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Flejou JF, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res* 2011 Feb 15;17(4):827-35.
- (117) Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009 Nov 15;15(22):6980-6.
- (118) Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011 Apr 20;29(12):1556-63.
- (119) Dorsey JF, Kao GD, MacArthur KM, Ju M, Steinmetz D, Wileyto EP, et al. Tracking viable circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing definitive radiation therapy: pilot study results. *Cancer* 2015 Jan 1;121(1):139-49.
- (120) Rink M, Chun FK, Minner S, Friedrich M, Mauermann O, Heinzer H, et al. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. *BJU Int* 2011 May;107(10):1668-75.
- (121) Peach G, Kim C, Zacharakis E, Purkayastha S, Ziprin P. Prognostic significance of circulating tumour cells following surgical resection of colorectal cancers: a systematic review. *Br J Cancer* 2010 Apr 27;102(9):1327-34.
- (122) Guo J, Yao F, Lou Y, Xu C, Xiao B, Zhou W, et al. Detecting carcinoma cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma by immunomagnetic beads and rt-PCR. *J Clin Gastroenterol* 2007 Sep;41(8):783-8.
- (123) van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, Terstappen LW, den Toonder JM. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res* 2011 Sep 15;71(18):5955-60.
- (124) Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009 Apr;9(4):302-12.
- (125) Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, et al. Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *Journal of Oncology* 2011;2011:1-10.
- (126) Coumans FA, Doggen CJ, Attard G, de Bono JS, Terstappen LW. All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* 2010 Sep;21(9):1851-7.

- (127) Lankiewicz S, Rivero BG, Bocher O. Quantitative real-time RT-PCR of disseminated tumor cells in combination with immunomagnetic cell enrichment. *Mol Biotechnol* 2006 Sep;34(1):15-27.
- (128) Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008 Mar;47(3):919-28.
- (129) Lalmahomed ZS, Kraan J, Gratama JW, Mostert B, Sleijfer S, Verhoef C. Circulating tumor cells and sample size: the more, the better. *J Clin Oncol* 2010 Jun 10;28(17):e288-9; author reply e290.
- (130) Konigsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol* 2011 Jun;50(5):700-10.
- (131) Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res* 2003;162:149-55.
- (132) Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007 Aug 18;253(2):180-204.
- (133) Balic M, Dandachi N, Hofmann G, Samonigg H, Loibner H, Obwaller A, et al. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2005 Nov;68(1):25-30.
- (134) Mankin HJ, Fondren G, Hornicek FJ, Gebhardt MC, Rosenberg AE. The use of flow cytometry in assessing malignancy in bone and soft tissue tumors. *Clin Orthop Relat Res* 2002 Apr;(397):95-105.
- (135) Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000 Jan;156(1):57-63.
- (136) Gascoyne PR, Noshari J, Anderson TJ, Becker FF. Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis. *Electrophoresis* 2009 Apr;30(8):1388-98.
- (137) Gorczyca W, Deptala A, Bedner E, Li X, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of human tumors by laser scanning cytometry. *Methods Cell Biol* 2001;64:421-43.
- (138) Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, Yu M, Miyamoto DT, Ulkus L, et al. Isolation and Characterization of Circulating Tumor Cells from Patients with Localized and Metastatic Prostate Cancer. *Sci Transl Med* 2010 Mar 31;2(25):25ra23.
- (139) Eifler RL, Lind J, Falkenhagen D, Weber V, Fischer MB, Zeillinger R. Enrichment of circulating tumor cells from a large blood volume using

leukapheresis and elutriation: proof of concept. *Cytometry B Clin Cytom* 2011 Mar;80(2):100-11.

(140) Alix-Panabieres C, Rebillard X, Brouillet JP, Barbotte E, Iborra F, Segui B, et al. Detection of circulating prostate-specific antigen-secreting cells in prostate cancer patients. *Clin Chem* 2005 Aug;51(8):1538-141.

(141) Alix-Panabieres C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res* 2012;195:69-76.

(142) Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007 12/20;450(7173):1235-9.

(143) Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014 Feb 19;6(224):224ra24.

(144) Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2006 Dec;13(4):1033-67.

(145) Qian J, Yao D, Dong Z, Wu W, Qiu L, Yao N, et al. Characteristics of hepatic igf-ii expression and monitored levels of circulating igf-ii mRNA in metastasis of hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2010 Nov;134(5):799-806.

(146) Husemann Y. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008;13:58-68.

(147) Alix-Panabieres C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res* 2008 Aug 15;14(16):5013-21.

(148) Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. *Nature* 2002 Aug 22;418(6900):823.

(149) Gradilone A, Naso G, Raimondi C, Cortesi E, Gandini O, Vincenzi B, et al. Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization. *Ann Oncol* 2011 Jan;22(1):86-92.

(150) Xu W, Cao L, Chen L, Li J, Zhang XF, Qian HH, et al. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy. *Clin Cancer Res* 2011 Jun 1;17(11):3783-93.

(151) Sleijfer S, Gratama JW, Sieuwerts AM, Kraan J, Martens JW, Foekens JA. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? *Eur J Cancer* 2007 Dec;43(18):2645-50.

(152) Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 Mar;76(3):1438-42.

- (153) Müller V, Riethdorf S, Rack B, Janni W, Fasching PA, Solomayer E, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System™ and AdnaTest Breast™ in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. *Breast Cancer Res* 2012;14(4):R118.
- (154) Amato RJ, Melnikova V, Zhang Y, Liu W, Saxena S, Shah PK, et al. Epithelial cell adhesion molecule-positive circulating tumor cells as predictive biomarker in patients with prostate cancer. *Urology* 2013 Jun;81(6):1303-7.
- (155) Schulze K, Gasch C, Staufer K, Nashan B, Lohse AW, Pantel K, et al. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2013 Nov;133(9):2165-71.
- (156) Miller MC, Doyle GV, Terstappen LWMM. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *Journal of Oncology* 2010;2010:617421.
- (157) Chiappini F. Circulating tumor cells measurements in hepatocellular carcinoma. *Int J Hepatol* 2012;2012:684802.
- (158) Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Emig R, Wallwiener D, Solomayer EF. Image analysis systems for the detection of disseminated breast cancer cells on bone-marrow cytospins. *J Clin Lab Anal* 2005;19(3):115-9.
- (159) Pantel K, Deneve E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem* 2012 May;58(5):936-40.
- (160) Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006 Sep 1;66(17):8319-26.
- (161) Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Rãse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 2012 May 16;12(1):178.
- (162) Sua-Villegas LF, Silva-Pérez NM, Vidaurreta-Lázaro M, Maestro-de las Casas ML, Rafael-Fernández S, Veganzones-de Castro S. Actualidad y futuro en las técnicas de cuantificación de células tumorales circulantes: su importancia en tumores sólidos epiteliales. *Revista del Laboratorio Clínico* 2011;04(03):113-70.
- (163) Kagan M, Howard D, Bendele Tea. A sample preparation and analysis system for identification of circulating tumor cells. *J Clin Ligand Assay* 2002;25:104-10.
- (164) Papavasiliou P, Fisher T, Kuhn J, Nemunaitis J, Lamont J. Circulating tumor cells in patients undergoing surgery for hepatic metastases from colorectal cancer. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2010 Jan;23(1):11-4.

- (165) Bevilacqua S, Gallo M, Franco R, Rossi A, De Luca A, Rocco G, et al. A "live" biopsy in a small-cell lung cancer patient by detection of circulating tumor cells. *Lung Cancer* 2009 Jul;65(1):123-5.
- (166) Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004 Aug 19;351(8):781-91.
- (167) Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, et al. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system. *Int J Cancer* 2012 Apr 1;130(7):1590-7.
- (168) Harb W, Fan A, Tran T, Danila DC, Keys D, Schwartz M, et al. Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. *Translational Oncology* 2013 10;6(5):528-IN1.
- (169) Alva A, Friedlander T, Clark M, Huebner T, Daignault S, Hussain M, et al. Circulating Tumor Cells as Potential Biomarkers in Bladder Cancer. *J Urol* 2015 Sept;194(3):790-8.
- (170) Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol* 2009 Jan;10(1):35-43.
- (171) Zhang Y, Li J, Cao L, Xu W, Yin Z. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: detection techniques, clinical implications, and future perspectives. *Semin Oncol* 2012 Aug;39(4):449-60.
- (172) Fan ST, Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Yu WC, Wong J. Prediction of posthepatectomy recurrence of hepatocellular carcinoma by circulating cancer stem cells: a prospective study. *Ann Surg* 2011 Oct;254(4):569-76.
- (173) Wong IH, Lau WY, Leung T, Yeo W, Johnson PJ. Hematogenous dissemination of hepatocytes and tumor cells after surgical resection of hepatocellular carcinoma: a quantitative analysis. *Clin Cancer Res* 1999 Dec;5(12):4021-7.
- (174) Scatton O, Chiappini F, Riou P, Marconi A, Saffroy R, Bralet MP, et al. Fate and characterization of circulating tumor cells in a NOD/SCID mouse model of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006 Jul 6;25(29):4067-75.
- (175) Kelley RK, Magbanua MJM, Butler TM, Collisson EA, Hwang J, Sidiropoulos N, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: a pilot study of detection, enumeration, and next-generation sequencing in cases and controls. *BMC Cancer* 2015;15:206.

- (176) Zee BC, Wong C, Kuhn T, Howard R, Yeo W, Koh J, et al. Detection of circulating tumor cells (CTCs) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). *JCO* 2007 Jun 20;25(18):15037.
- (177) Vona G, Estepa L, Beroud C, Damotte D, Capron F, Nalpas B, et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. *Hepatology* 2004 Mar;39(3):792-7.
- (178) Sun YF, Xu Y, Yang XR, Guo W, Zhang X, Qiu SJ, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatology* 2013 Apr;57(4):1458-68.
- (179) Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009 Dec 24;139(7):1315-26.
- (180) Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
- (181) Rafii S, Avezilla ST, Jin DK. Tumor vasculature address book: identification of stage-specific tumor vessel zip codes by phage display. *Cancer Cell* 2003 Nov;4(5):331-3.
- (182) Norton L, Massague J. Is cancer a disease of self-seeding? *Nat Med* 2006 Aug;12(8):875-8.
- (183) Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005 Mar;7(3):211-7.
- (184) Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002 Mar;2(3):161-74.
- (185) Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, et al. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 2007 Apr 12;446(7137):765-70.
- (186) Hwang JH, Smith CA, Salhia B, Rutka JT. The role of fascin in the migration and invasiveness of malignant glioma cells. *Neoplasia* 2008 Feb;10(2):149-59.
- (187) Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005 Jul 28;436(7050):518-24.
- (188) Vignjevic D, Schoumacher M, Gavert N, Janssen KP, Jih G, Lae M, et al. Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. *Cancer Res* 2007 Jul 15;67(14):6844-53.
- (189) Ksiazkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology* 2012;79(4):195-208.

- (190) Biddle A, Mackenzie IC. Cancer stem cells and EMT in carcinoma. *Cancer Metastasis Rev* 2012 Feb 3.
- (191) Chen X, Lingala S, Khoobyari S, Nolta J, Zern MA, Wu J. Epithelial Mesenchymal Transition and Hedgehog Signaling Activation are Associated with Chemoresistance and Invasion of Hepatoma Subpopulations. *J Hepatol* 2011 Oct;55(4):838-45.
- (192) Radisky DC, LaBarge MA. Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype. *Cell Stem Cell* 2008 Jun 5;2(6):511-2.
- (193) Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010 Jun;15(2):261-73.
- (194) Mishra L, Banker T, Murray J, Byers S, Thenappan A, He AR, et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009 Jan;49(1):318-29.
- (195) Mostert B, Kraan J, Bolt-de Vries J, van der Spoel P, Sieuwerts AM, Schutte M, et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146. *Breast Cancer Res Treat* 2011 May;127(1):33-41.
- (196) Pang R, Law WL, Chu AC, Poon JT, Lam CS, Chow AK, et al. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* 2010 Jun 4;6(6):603-15.
- (197) Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2009;11(4):R46.
- (198) Lingala S, Cui YY, Chen X, Ruebner BH, Qian XF, Zern MA, et al. Immunohistochemical staining of cancer stem cell markers in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2010 Aug;89(1):27-35.
- (199) Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 2010 Sep;120(9):3326-39.
- (200) Li YM, Xu SC, Li J, Han KQ, Pi HF, Zheng L, et al. Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease. *Cell Death Dis* 2013 Oct 3;4:e831.
- (201) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, et al. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013 Apr;57(4):1484-97.
- (202) Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008 Mar 1;68(5):1451-61.

- (203) Liang J, Ding T, Guo Z, Yu X, Hu Y, Zheng L, et al. Expression pattern of tumour-associated antigens in hepatocellular carcinoma: association with immune infiltration and disease progression. *Br J Cancer* 2013 Aug 20;109(4):1031-9.
- (204) Zeng SS, Yamashita T, Kondo M, Nio K, Hayashi T, Hara Y, et al. The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2014 Jan;60(1):127-34.
- (205) de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 1999 Jun;188(2):201-6.
- (206) Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009 Mar;136(3):1012-24.
- (207) Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 2007 Feb 12;96(3):417-23.
- (208) Terris B, Cavard C, Perret C. EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2010 Feb;52(2):280-1.
- (209) Ji J, Wang XW. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 2012 Aug;39(4):461-72.
- (210) Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 2009 Feb;11(2):162-71.
- (211) Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 2007 Aug;171(2):386-95.
- (212) Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev* 2012 Feb;38(1):68-75.
- (213) Salnikov AV, Kusumawidjaja G, Rausch V, Bruns H, Gross W, Khamidjanov A, et al. Cancer stem cell marker expression in hepatocellular carcinoma and liver metastases is not sufficient as single prognostic parameter. *Cancer Lett* 2009 Mar 18;275(2):185-93.
- (214) Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007 Jun;132(7):2542-56.
- (215) Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008 Feb;13(2):153-66.

- (216) Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005 Dec 1;65(23):10946-51.
- (217) Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006 Dec 2;5:67.
- (218) Leonardi GC, Candido S, Cervello M, Nicolosi D, Raiti F, Travali S, et al. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (review). *Int J Oncol* 2012 Jun;40(6):1733-47.
- (219) Wang L, Yao M, Dong Z, Zhang Y, Yao D. Circulating specific biomarkers in diagnosis of hepatocellular carcinoma and its metastasis monitoring. *Tumour Biol* 2014 Jan;35(1):9-20.
- (220) Ge T, Shen Q, Wang N, Zhang Y, Ge Z, Chu W, et al. Diagnostic values of alpha-fetoprotein, dickkopf-1, and osteopontin for hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 2015 Mar;32(3):59.
- (221) Zhang SY, Lin BD, Li BR. Evaluation of the diagnostic value of alpha-L-fucosidase, alpha-fetoprotein and thymidine kinase 1 with ROC and logistic regression for hepatocellular carcinoma. *FEBS Open Bio* 2015 Mar 26;5:240-4.
- (222) Ertle JM, Heider D, Wichert M, Keller B, Kueper R, Hilgard P, et al. A combination of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma. *Digestion* 2013;87(2):121-31.
- (223) Carethers JM, Braun J, Sands BE. Genetics, Genetic Testing and Biomarkers of Digestive Diseases. *Gastroenterology* 2015 Oct;149(5):1131-3.
- (224) Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962 Jun 15;48:1014-22.
- (225) Woessner JF. MMPs and TIMPs--an historical perspective. *Mol Biotechnol* 2002 Sep;22(1):33-49.
- (226) Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003 May 2;92(8):827-39.
- (227) Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 Mar;8(3):221-33.
- (228) Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004 Aug;4(8):617-29.

- (229) Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000 Mar;18(5):1135-49.
- (230) Cox G, O'Byrne K. Matrix metalloproteinases and cancer. *Anticancer Res* 2001 Nov;21(6):4207-19.
- (231) Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003 Nov;253(1-2):269-85.
- (232) Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002 Oct 1;115(Pt 19):3719-27.
- (233) Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF, Jr. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 2000 Oct 6;275(40):31226-32.
- (234) Noel A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol* 2008 Feb;19(1):52-60.
- (235) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994 Jul 7;370(6484):61-5.
- (236) Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 1996 May 31;85(5):683-93.
- (237) Wang XQ, Sun P, Paller AS. Ganglioside GM3 inhibits matrix metalloproteinase-9 activation and disrupts its association with integrin. *J Biol Chem* 2003 Jul 11;278(28):25591-9.
- (238) Yu WH, Woessner JF, Jr, McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev* 2002 Feb 1;16(3):307-23.
- (239) Jodele S, Blavier L, Yoon JM, DeClerck YA. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006 Mar;25(1):35-43.
- (240) Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005 Feb 10;23(5):1011-27.
- (241) Bruyere F, Melen-Lamalle L, Blacher S, Roland G, Thiry M, Moons L, et al. Modeling lymphangiogenesis in a three-dimensional culture system. *Nat Methods* 2008 May;5(5):431-7.

- (242) Ardi VC, Van den Steen PE, Opdenakker G, Schweighofer B, Deryugina EI, Quigley JP. Neutrophil MMP-9 proenzyme, unencumbered by TIMP-1, undergoes efficient activation in vivo and catalytically induces angiogenesis via a basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGFR-2 pathway. *J Biol Chem* 2009 Sep 18;284(38):25854-66.
- (243) Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006 Mar;25(1):9-34.
- (244) Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010 Apr 2;141(1):52-67.
- (245) Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 2001 Jan 15;61(2):577-81.
- (246) Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS, Segall JE. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 2000 May 1;60(9):2504-11.
- (247) Hrabec E, Streck M, Nowak D, Hrabec Z. Elevated level of circulating matrix metalloproteinase-9 in patients with lung cancer. *Respir Med* 2001 Jan;95(1):1-4.
- (248) Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 2001 Jan 1;61(1):237-42.
- (249) Kataoka H, Uchino H, Iwamura T, Seiki M, Nabeshima K, Kono M. Enhanced tumor growth and invasiveness in vivo by a carboxyl-terminal fragment of alpha1-proteinase inhibitor generated by matrix metalloproteinases: a possible modulatory role in natural killer cytotoxicity. *Am J Pathol* 1999 Feb;154(2):457-68.
- (250) Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol* 2004 Oct 25;167(2):223-9.
- (251) Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* 2005 May 23;169(4):681-91.
- (252) González Avila G, González A, Delgado J, Gutiérrez González LH. Participación de las metaloproteasas de matriz en la progresión del cáncer. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2009;22(4):328-36.
- (253) Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 1997 Dec 29;139(7):1861-72.

- (254) Sternlicht MD, Lochter A, Sympon CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999 Jul 23;98(2):137-46.
- (255) Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996;6(4):391-411.
- (256) Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997 Jan 24;272(4):2446-51.
- (257) Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 1999 Oct 1;99(1):81-92.
- (258) Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988 May 15;61(10):1942-56.
- (259) Surlin V, Ioana M, Plesea IE. Genetic patterns of metalloproteinases and their tissular inhibitors - clinicopathologic and prognostic significance in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2011;52(1 Suppl):231-6.
- (260) Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000 Dec;6(12):4823-30.
- (261) Huntington JT, Shields JM, Der CJ, Wyatt CA, Benbow U, Slingluff CL, Jr, et al. Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem* 2004 Aug 6;279(32):33168-76.
- (262) Zhang M, Teng X, Guo X, Li Z, Han J, Yao L. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *The Breast* 2013 Jun 01;22(3):330-4.
- (263) Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, et al. Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1999 Oct;21(7):627-38.
- (264) Uhlmann ME, Georgieva M, Sill M, Linnemann U, Berger MR. Prognostic value of tumor progression-related gene expression in colorectal cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012 Oct;138(10):1631-40.
- (265) Ossowski L. Invasion of connective tissue by human carcinoma cell lines: requirement for urokinase, urokinase receptor, and interstitial collagenase. *Cancer Res* 1992 Dec 15;52(24):6754-60.

- (266) Langenskiold M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson ML. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2005 May;20(3):245-52.
- (267) Hewitt RE, Leach IH, Powe DG, Clark IM, Cawston TE, Turner DR. Distribution of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in colorectal tumours. *Int J Cancer* 1991 Nov 11;49(5):666-72.
- (268) Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* 1998 Dec;43(6):791-7.
- (269) Baker EA, Leaper DJ. The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology. *Eur J Cancer* 2003 May 1;39(7):981-8.
- (270) Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997 Sep 3;89(17):1260-70.
- (271) Yamashita K, Tanaka Y, Mimori K, Inoue H, Mori M. Differential expression of MMP and uPA systems and prognostic relevance of their expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004 Jun 10;110(2):201-7.
- (272) Zhou J, Brinckerhoff C, Lubert S, Yang K, Saini J, Hooke J, et al. Analysis of matrix metalloproteinase-1 gene polymorphisms and expression in benign and malignant breast tumors. *Cancer Invest* 2011 Nov;29(9):599-607.
- (273) Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 2005 Feb 11;120(3):303-13.
- (274) Li Y, Jin X, Kang S, Wang Y, Du H, Zhang J, et al. Polymorphisms in the promoter regions of the matrix metalloproteinases-1, -3, -7, and -9 and the risk of epithelial ovarian cancer in China. *Gynecol Oncol* 2006;101(1):92.
- (275) George A, Ranganathan K, Rao UK. Expression of MMP-1 in histopathological different grades of oral squamous cell carcinoma and in normal buccal mucosa - an immunohistochemical study. *Cancer Biomark* 2010;7(6):275-83.
- (276) Yu-Kuei Chen, Chun-Wei Tung, Jui-Ying Lee, Yi-Chun Hung, Chien-Hung Lee, Shah-Hwa Chou, Hung-Shun Lin, Ming-Tsang Wu & I-Chen Wu. Plasma matrix metalloproteinase 1 improves the detection and survival prediction of esophageal squamous cell carcinoma. *Scientific Reports* 2016;6(30057).
- (277) 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.
- (278) Kang Y. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003;3:537-49.

- (279) Sawada S, Murakami K, Murata J, Tsukada K, Saiki I. Accumulation of extracellular matrix in the liver induces high metastatic potential of hepatocellular carcinoma to the lung. *Int J Oncol* 2001 Jul;19(1):65-70.
- (280) Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, et al. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 1997 Dec;26(6):1521-9.
- (281) Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996 Mar;110(3):821-31.
- (282) Kim JH, Kim TH, Jang JW, Jang YJ, Lee KH, Lee ST. Analysis of matrix metalloproteinase mRNAs expressed in hepatocellular carcinoma cell lines. *Mol Cells* 2001 Aug 31;12(1):32-40.
- (283) Ip YC, Cheung ST, Leung KL, Fan ST. Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005 Oct 28;11(40):6269-76.
- (284) Altadill A, Rodriguez M, Gonzalez LO, Junquera S, Corte MD, Gonzalez-Dieguez ML, et al. Liver expression of matrix metalloproteases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2009 Oct;41(10):740-8.
- (285) Filmus J, Church JG, Buick RN. Isolation of a cDNA corresponding to a developmentally regulated transcript in rat intestine. *Mol Cell Biol* 1988 Oct;8(10):4243-9.
- (286) Wang SK, Zynger DL, Hes O, Yang XJ. Discovery and diagnostic value of a novel oncofetal protein: glypican 3. *Adv Anat Pathol* 2014 Nov;21(6):450-60.
- (287) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Jun 20;306(1):16-25.
- (288) Iglesias BV, Centeno G, Pascuccelli H, Ward F, Peters MG, Filmus J, et al. Expression pattern of glypican-3 (GPC3) during human embryonic and fetal development. *Histol Histopathol* 2008 Nov;23(11):1333-40.
- (289) Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003 Jul;125(1):89-97.
- (290) Peters MG, Farias E, Colombo L, Filmus J, Puricelli L, Bal de Kier Joffe E. Inhibition of invasion and metastasis by glypican-3 in a syngeneic breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 2003 Jul;80(2):221-32.
- (291) Maeda D, Ota S, Takazawa Y, Aburatani H, Nakagawa S, Yano T, et al. Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Mod Pathol* 2009 Jun;22(6):824-32.

- (292) Yamanaka K, Ito Y, Okuyama N, Noda K, Matsumoto H, Yoshida H, et al. Immunohistochemical study of glypican 3 in thyroid cancer. *Oncology* 2007;73(5-6):389-94.
- (293) Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* 2001 Aug;108(4):497-501.
- (294) Perrimon N, Bernfield M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 2000 Apr 13;404(6779):725-8.
- (295) Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res* 1997 Nov 15;57(22):5179-84.
- (296) Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009 Aug;100(8):1403-7.
- (297) Zhu Z, Friess H, Wang L, Abou-Shady M, Zimmermann A, Lander A, et al. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut* 2001 Apr;48(4):558-64.
- (298) Ning S, Bin C, Na H, Peng S, Yi D, Xiang-hua Y, et al. Glypican-3, a novel prognostic marker of hepatocellular cancer, is related with postoperative metastasis and recurrence in hepatocellular cancer patients. *Mol Biol Rep* 2012 Jan;39(1):351-7.
- (299) Fu SJ, Qi CY, Xiao WK, Li SQ, Peng BG, Liang LJ. Glypican-3 is a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection. *Surgery* 2013 Sep;154(3):536-44.
- (300) Capurro MI, Xiang YY, Lobe C, Filmus J. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 2005 Jul 15;65(14):6245-54.
- (301) 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.
- (302) Gao W, Kim H, Ho M. Human Monoclonal Antibody Targeting the Heparan Sulfate Chains of Glypican-3 Inhibits HGF-Mediated Migration and Motility of Hepatocellular Carcinoma Cells. *PLoS One* 2015 Sep 2;10(9):e0137664.
- (303) Wu Y, Liu H, Weng H, Zhang X, Li P, Fan CL, et al. Glypican-3 promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through ERK signaling pathway. *Int J Oncol* 2015 Mar;46(3):1275-85.
- (304) Haruyama Y, Yorita K, Yamaguchi T, Kitajima S, Amano J, Ohtomo T, et al. High preoperative levels of serum glypican-3 containing N-terminal subunit are

associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Int J Cancer* 2015 Oct 1;137(7):1643-51.

(305) Haruyama Y, Kataoka H. Glypican-3 is a prognostic factor and an immunotherapeutic target in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016 Jan 7;22(1):275-83.

(306) Liu XF, Hu ZD, Liu XC, Cao Y, Ding CM, Hu CJ. Diagnostic accuracy of serum glypican-3 for hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Biochem* 2014 Feb;47(3):196-200.

(307) 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.

(308) 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.

(309) Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* 1979 Apr;16(4):885-93.

(310) Sase S, Ganu J, Nagane N. Osteopontin: A novel Protein Molecule. *Ind Med Gaz* 2012:62-66.

(311) Gürsoy G, Acar Y, Alagöz S. Osteopontin: A multifunctional molecule. *I. J. Med. Med. Sci.* 2010;1(3):55-60.

(312) Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Jun;87(12):4473-5.

(313) Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996 Jul 1;317(Pt 1):59-64.

(314) Bini A, Mann KG, Kudryk BJ, Schoen FJ. Noncollagenous bone matrix proteins, calcification, and thrombosis in carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 Aug;19(8):1852-61.

(315) Singh M, Ananthula S, Milhorn DM, Krishnaswamy G, Singh K. Osteopontin: a novel inflammatory mediator of cardiovascular disease. *Front Biosci* 2007 Jan 1;12:214-21.

(316) Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Ramirez B, Rodriguez A, Colina I, Silva C, et al. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Sep;92(9):3719-27.

- (317) Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE, Kiefer JA, Markwalder R, Klima I, et al. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1999 Aug;5(8):2271-7.
- (318) Robertson BW, Chellaiah MA. Osteopontin Induces β -Catenin Signaling Through Activation of Akt In Prostate Cancer Cells. *Exp Cell Res* 2010 Jan 1;316(1):1-11.
- (319) Furger KA, Menon RK, Tuck AB, Bramwell VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med* 2001 Nov;1(5):621-32.
- (320) Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers AF, et al. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res* 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):184-90.
- (321) Caruso DJ, Carmack AJ, Lokeshwar VB, Duncan RC, Soloway MS, Lokeshwar BL. Osteopontin and interleukin-8 expression is independently associated with prostate cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 2008 Jul 1;14(13):4111-8.
- (322) Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, Fisher LW. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001 Dec;7(12):4060-6.
- (323) Arai M, Yokosuka O, Kanda T, Fukai K, Imazeki F, Muramatsu M, et al. Serum osteopontin levels in patients with acute liver dysfunction. *Scand J Gastroenterol* 2006 Jan;41(1):102-10.
- (324) Yilmaz Y, Ozturk O, Alahdab YO, Senates E, Colak Y, Doganay HL, et al. Serum osteopontin levels as a predictor of portal inflammation in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2013 Jan;45(1):58-62.
- (325) Patouraux S, Bonnafous S, Voican CS, Anty R, Saint-Paul MC, Rosenthal-Allieri MA, et al. The osteopontin level in liver, adipose tissue and serum is correlated with fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 2012;7(4):e35612.
- (326) Zhao L, Li T, Wang Y, Pan Y, Ning H, Hui X, et al. Elevated plasma osteopontin level is predictive of cirrhosis in patients with hepatitis B infection. *Int J Clin Pract* 2008 Jul;62(7):1056-62.
- (327) Matsue Y, Tsutsumi M, Hayashi N, Saito T, Tsuchishima M, Toshikuni N, et al. Serum osteopontin predicts degree of hepatic fibrosis and serves as a biomarker in patients with hepatitis C virus infection. *PLoS One* 2015 Mar 11;10(3):e0118744.
- (328) Shang S, Plymoth A, Ge S, Feng Z, Rosen HR, Sangrajrang S, et al. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012 Feb;55(2):483-90.

- (329) Kim J, Ki SS, Lee SD, Han CJ, Kim YC, Park SH, et al. Elevated plasma osteopontin levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2006 Sep;101(9):2051-9.
- (330) Jang ES, Jeong SH, Kim JW, Choi YS, Leissner P, Brechot C. Diagnostic Performance of Alpha-Fetoprotein, Protein Induced by Vitamin K Absence, Osteopontin, Dickkopf-1 and Its Combinations for Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 2016 Mar 17;11(3):e0151069.
- (331) Rich N, Singal AG. Hepatocellular carcinoma tumour markers: current role and expectations. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014 Oct;28(5):843-53.
- (332) Khalil A, Elgedawy J, Faramawi MF, Elfert A, Salama I, Abbass A, et al. Plasma osteopontin level as a diagnostic marker of hepatocellular carcinoma in patients with radiological evidence of focal hepatic lesions. *Tumori* 2013 Jan-Feb;99(1):100-7.
- (333) Chimparlee N, Chuaypen N, Khlaiphuengsin A, Pinjaroen N, Payungporn S, Poovorawan Y, et al. Diagnostic and Prognostic Roles of Serum Osteopontin and Osteopontin Promoter Polymorphisms in Hepatitis B-related Hepatocellular Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(16):7211-7.
- (334) Wang CQ, Sun HT, Gao XM, Ren N, Sheng YY, Wang Z, et al. Interleukin-6 enhances cancer stemness and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma via up-regulating osteopontin expression. *Am J Cancer Res* 2016;6(9):1873-89.
- (335) Pan HW, Ou YH, Peng SY, Liu SH, Lai PL, Lee PH, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003 Jul 1;98(1):119-27.
- (336) Korita PV, Wakai T, Shirai Y, Matsuda Y, Sakata J, Cui X, et al. Overexpression of osteopontin independently correlates with vascular invasion and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2008 Dec;39(12):1777-83.
- (337) Sieghart W, Wang X, Schmid K, Pinter M, Konig F, Bodingbauer M, et al. Osteopontin expression predicts overall survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in patients beyond the Milan criteria. *J Hepatol* 2011 Jan;54(1):89-97.
- (338) 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.
- (339) Duarte-Salles T, Misra S, Stepien M, Plymoth A, Muller DC, Overvad K, et al. Circulating Osteopontin and Prediction of Hepatocellular Carcinoma Development in a Large European Population. *Cancer Prev Res (Phila)* 2016 Sept;9(9):758-65.

- (340) Medico E, Gentile A, Lo Celso C, Williams TA, Gambarotta G, Trusolino L, et al. Osteopontin is an autocrine mediator of hepatocyte growth factor-induced invasive growth. *Cancer Res* 2001 Aug 1;61(15):5861-8.
- (341) Iqbal J, McRae S, Mai T, Banaudha K, Sarkar-Dutta M, Waris G. Role of hepatitis C virus induced osteopontin in epithelial to mesenchymal transition, migration and invasion of hepatocytes. *PLoS One* 2014 Jan 31;9(1):e87464.
- (342) Dong Q, Zhu X, Dai C, Zhang X, Gao X, Wei J, et al. Osteopontin promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma through regulating vimentin. *Oncotarget* 2016 Mar 15;7(11):12997-13012.
- (343) Zhang CH, Xu GL, Jia WD, Ge YS, Li JS, Ma JL, et al. Prognostic significance of osteopontin in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2012 Jun 1;130(11):2685-92.
- (344) Hodeib H, ELshora O, Selim A, Sabry NM, El-Ashry HM. Serum Midkine and Osteopontin Levels as Diagnostic Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Electron Physician* 2017 Jan 25;9(1):3492-8.
- (345) Fouad SA, Mohamed NA, Fawzy MW, Moustafa DA. Plasma Osteopontin Level in Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Hepat Mon* 2015 Sep 1;15(9):e30753.
- (346) Wang HG, Xu H, Gu YM, Wang H, Xu W, Zu MH. Comparison osteopontin vs AFP for the diagnosis of HCC: a meta-analysis. 2014. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014 Dec;38(6):706-14.
- (347) Li J, Chen X, Dai M, Huang S, Chen J, Dai S. Diagnostic accuracy of osteopontin plus alpha-fetoprotein in the hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2017 Oct;41(5):543-53.
- (348) Bishayee A, Darvesh AS. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: a potential target for chemoprevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2012 Nov 1;12(9):1095-118.
- (349) Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, Lee DG, Yu HC, Yeum JH, et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol* 2003 Jun;16(6):552-7.
- (350) Chao Y, Wu CY, Kuo CY, Wang JP, Luo JC, Kao CH, et al. Cytokines are associated with postembolization fever and survival in hepatocellular carcinoma patients receiving transcatheter arterial chemoembolization. *Hepatol Int* 2013 Jul;7(3):883-92.
- (351) Stroescu C, Dragnea A, Ivanov B, Pechianu C, Herlea V, Sgarbura O, et al. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis* 2008 Dec;17(4):411-7.

- (352) Moeini A, Cornella H, Villanueva A. Emerging signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer* 2012 Sep;1(2):83-93.
- (353) Poon RT, Ho JW, Tong CS, Lau C, Ng IO, Fan ST. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2004 Oct;91(10):1354-60.
- (354) Zhang W, Kim R, Quintini C, Hashimoto K, Fujiki M, Diago T, et al. Prognostic role of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation. *Liver Transpl* 2015 Jan;21(1):101-11.
- (355) Poon RT, Lau C, Pang R, Ng KK, Yuen J, Fan ST. High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies. *Ann Surg Oncol* 2007 Jun;14(6):1835-45.
- (356) Shim JH, Park JW, Kim JH, An M, Kong SY, Nam BH, et al. Association between increment of serum VEGF level and prognosis after transcatheter arterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Sci* 2008 Oct;99(10):2037-44.
- (357) Poon RT, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J. High serum levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Oncol Rep* 2004 May;11(5):1077-84.
- (358) Niizeki T, Sumie S, Torimura T, Kurogi J, Kuromatsu R, Iwamoto H, et al. Serum vascular endothelial growth factor as a predictor of response and survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma undergoing hepatic arterial infusion chemotherapy. *J Gastroenterol* 2012 Jun;47(6):686-695.
- (359) Kaseb AO, Morris JS, Hassan MM, Siddiqui AM, Lin E, Xiao L, et al. Clinical and prognostic implications of plasma insulin-like growth factor-1 and vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2011 Oct 10;29(29):3892-9.
- (360) Chao Y, Li CP, Chau GY, Chen CP, King KL, Lui WY, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin in patients with resectable hepatocellular carcinoma after surgery. *Ann Surg Oncol* 2003 May;10(4):355-62.
- (361) Jia JB, Zhuang PY, Sun HC, Zhang JB, Zhang W, Zhu XD, et al. Protein expression profiling of vascular endothelial growth factor and its receptors identifies subclasses of hepatocellular carcinoma and predicts survival. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009 Jun;135(6):847-54.
- (362) Xiang Z, Zeng Z, Tang Z, Fan J, Sun H, Wu W, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor-C and nuclear CXCR4 in hepatocellular

carcinoma is correlated with lymph node metastasis and poor outcome. *Cancer J* 2009 Nov-Dec;15(6):519-25.

(363) Strieter RM, Kunkel SL, Elnor VM, Martonyi CL, Koch AE, Polverini PJ, et al. Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol* 1992 Dec;141(6):1279-84.

(364) Xu L, Fidler IJ. Interleukin 8: an autocrine growth factor for human ovarian cancer. *Oncol Res* 2000;12(2):97-106.

(365) Lee YS, Choi I, Ning Y, Kim NY, Khatchadourian V, Yang D, et al. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. *Br J Cancer* 2012 May 22;106(11):1833-41.

(366) Wilson C, Wilson T, Johnston PG, Longley DB, Waugh DJ. Interleukin-8 signaling attenuates TRAIL- and chemotherapy-induced apoptosis through transcriptional regulation of c-FLIP in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2008 Sep;7(9):2649-61.

(367) Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* 2005 Apr;7(2):122-33.

(368) Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007 Jun;132(7):2328-39.

(369) Yahya RS, Ghanem OH, Foyouh AA, Atwa M, Enany SA. Role of interleukin-8 and oxidative stress in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Lab* 2013;59(9-10):969-76.

(370) Tachibana Y, Nakamoto Y, Mukaida N, Kaneko S. Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of chronic hepatitis C. *Cancer Lett* 2007 Jun 18;251(1):36-42.

(371) 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.

(372) Amann T, Bataille F, Spruss T, Muhlbauer M, Gabele E, Scholmerich J, et al. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009 Apr;100(4):646-53.

(373) Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 2008 Oct;18(5):349-55.

(374) Fu XT, Dai Z, Song K, Zhang ZJ, Zhou ZJ, Zhou SL, et al. Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma

cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway. *Int J Oncol* 2015 Feb;46(2):587-96.

(375) Colomiere M, Ward AC, Riley C, Trenerry MK, Cameron-Smith D, Findlay J, et al. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 2009 Jan 13;100(1):134-44.

(376) Yadav A, Kumar B, Datta J, Teknos TN, Kumar P. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Mol Cancer Res* 2011 Dec;9(12):1658-67.

(377) Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, Hamilton DH, Palena C. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res* 2011 Aug 1;71(15):5296-306.

(378) Park SY, Han J, Kim JB, Yang MG, Kim YJ, Lim HJ, et al. Interleukin-8 is related to poor chemotherapeutic response and tumourigenicity in hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 2014 Jan;50(2):341-50.

(379) Weigelt B, Bosma AJ, Hart AAM, Rodenhuis S, van 't Veer, L.J. Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003 Jan 10;88(7):1091-4.

(380) Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008 Jul 1;26(19):3213-21.

(381) de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008 Oct 1;14(19):6302-9.

(382) Kurihara T, Itoi T, Sofuni A, Itokawa F, Tsuchiya T, Tsuji S, et al. Detection of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a preliminary result. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008;15(2):189-95.

(383) Szatanek R, Drabik G, Baran J, Kolodziejczyk P, Kulig J, Stachura J, et al. Detection of isolated tumour cells in the blood and bone marrow of patients with gastric cancer by combined sorting, isolation and determination of MAGE-1, -2 mRNA expression. *Oncol Rep* 2008 Apr;19(4):1055-60.

(384) Beecken WD, Engl T, Engels K, Blumenberg C, Oppermann E, Camphausen K, et al. Clinical relevance of maspin expression in bladder cancer. *World J Urol* 2006 Aug;24(3):338-44.

(385) Woenckhaus M, Bubendorf L, Dalquen P, Foerster J, Blaszyk H, Mirlacher M, et al. Nuclear and cytoplasmic Maspin expression in primary non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2007 May;60(5):483-6.

- (386) Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat* 2009 Jun;115(3):581-90.
- (387) Biggers B, Knox S, Grant M, Kuhn J, Nemunaitis J, Fisher T, et al. Circulating Tumor Cells in Patients Undergoing Surgery for Primary Breast Cancer: Preliminary Results of a Pilot Study. *Annals of Surgical Oncology* 2009 Apr 1;16(4):969-71.
- (388) Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 2008 Mar 10;26(8):1208-15.
- (389) Gerges N, Rak J, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Br Med Bull* 2010;94:49-64.
- (390) Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1996 Oct;14(10):2843-77.
- (391) Basil CF, Zhao Y, Zavaglia K, Jin P, Panelli MC, Voiculescu S, et al. Common cancer biomarkers. *Cancer Res* 2006 Mar 15;66(6):2953-61.
- (392) Fan JL, Yang YF, Yuan CH, Chen H, Wang FB. Circulating Tumor Cells for Predicting the Prognostic of Patients with Hepatocellular Carcinoma: A Meta Analysis. *Cell Physiol Biochem* 2015;37(2):629-40.
- (393) Sanchez-Lorencio MI, Ramirez P, Saenz L, Martinez Sanchez MV, De La Orden V, Mediero-Valeros B, et al. Comparison of Two Types of Liquid Biopsies in Patients With Hepatocellular Carcinoma Awaiting Orthotopic Liver Transplantation. *Transplant Proc* 2015 Nov;47(9):2639-42.
- (394) Mostert B, Jiang Y, Sieuwerts AM, Wang H, Bolt-de Vries J, Biermann K, et al. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *Int J Cancer* 2013 Jul;133(1):130-41.
- (395) Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2009 Jan 7;101(1):61-6.
- (396) Ramirez P, Saenz L, Cascales-Campos PA, Gonzalez Sanchez MR, Llacer-Millan E, Sanchez-Lorencio MI, et al. Oncological Evaluation by Positron-emission Tomography, Circulating Tumor Cells and Alpha Fetoprotein in Patients With Hepatocellular Carcinoma on the Waiting List for Liver Transplantation. *Transplant Proc* 2016 Nov;48(9):2962-5.

- (397) Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. *BMC Cancer* 2011 Oct 4;11:422.
- (398) Kim SS, Cho HJ, Won JH, Bae JI, Kang DR, Lee J, et al. Interleukin-8 level as a prognostic marker in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemoembolization. *Cytokine* 2015 December;76(2):449-57.
- (399) Sakata H, Konishi M, Ryu M, Kinoshita T, Satake M, Moriyama N, et al. Prognostic factors for hepatocellular carcinoma presenting with macroscopic portal vein tumor thrombus. *Hepatology* 2004;51(60):1575-80.
- (400) Yang JD, Campion MB, Liu MC, Chaiteerakij R, Giama NH, Ahmed Mohammed H, et al. Circulating tumor cells are associated with poor overall survival in patients with cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2016 Jan;63(1):148-58.
- (401) Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002 Dec 19;420(6917):860-7.
- (402) Guo BT, Liu XC, Huang Y, Ou HH, Li XH, Yang DH. Positive circulating tumor cells in the peripheral blood may indicate a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2016 Aug 20;36(8):1134-9.
- (403) Yao F, Guo JM, Xu CF, Lou YL, Xiao BX, Zhou WH, et al. Detecting AFP mRNA in peripheral blood of the patients with hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis and hepatitis. *Clin Chim Acta* 2005 Nov;361(1-2):119-27.
- (404) Graziadei IW, Sandmueller H, Waldenberger P, Koenigsrainer A, Nachbaur K, Jaschke W, et al. Chemoembolization followed by liver transplantation for hepatocellular carcinoma impedes tumor progression while on the waiting list and leads to excellent outcome. *Liver Transpl* 2003 Jun;9(6):557-63.
- (405) Li JQ, Zhang YQ, Zhang WZ, Yuan YF, Li GH. Randomized study of chemoembolization as an adjuvant therapy for primary liver carcinoma after hepatectomy. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995;121(6):364-6.
- (406) Ren ZG, Lin ZY, Xia JL, Ye SL, Ma ZC, Ye QH, et al. Postoperative adjuvant arterial chemoembolization improves survival of hepatocellular carcinoma patients with risk factors for residual tumor: A retrospective control study. *World J Gastroenterol* 2004 Oct 1;10(19):2791-4.
- (407) Sawabata N, Funaki S, Hyakutake T, Shintani Y, Fujiwara A, Okumura M. Perioperative circulating tumor cells in surgical patients with non-small cell lung cancer: does surgical manipulation dislodge cancer cells thus allowing them to pass into the peripheral blood? *Surg Today* 2016 Dec;46(12):1402-9.

- (408) Sun C, Liao W, Deng Z, Li E, Feng Q, Lei J, et al. The diagnostic value of assays for circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017 Jul;96(29):e7513.
- (409) Morris KL, Tugwood JD, Khoja L, Lancashire M, Sloane R, Burt D, et al. Circulating biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014 Aug;74(2):323-32.
- (410) Wang Z, Luo L, Cheng Y, He G, Peng B, Gao Y, et al. Correlation Between Postoperative Early Recurrence of Hepatocellular Carcinoma and Mesenchymal Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J Gastrointest Surg* 2018 Apr;22(4):633-9.
- (411) Zhou Y, Wang B, Wu J, Zhang C, Zhou Y, Yang X, et al. Association of preoperative EpCAM Circulating Tumor Cells and peripheral Treg cell levels with early recurrence of hepatocellular carcinoma following radical hepatic resection. *BMC Cancer* 2016 Jul 20;16:506.
- (412) Pulukuri SM, Rao JS. Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor growth and metastasis. *Int J Oncol* 2008 Apr;32(4):757-65.
- (413) Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010 Jun;15(2):201-12.
- (414) Cierna Z, Mego M, Janega P, Karaba M, Minarik G, Benca J, et al. Matrix metalloproteinase 1 and circulating tumor cells in early breast cancer. *BMC Cancer* 2014 Jun 28;14:472.
- (415) Sanchez-Lorencio MI, Saenz L, Ramirez P, Villalba-Lopez 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):623-7.
- (416) Matsunaga Y, Koda M, Murawaki Y. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in hepatocellular carcinoma tissue, compared with the surrounding non-tumor tissue. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2004;115-116:143-50.
- (417) Filmus J, Capurro M. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *FEBS J* 2013 May;280(10):2471-6.
- (418) Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, Ohashi K, Midorikawa Y, Morishita Y, et al. The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2005 Dec;18(12):1591-8.
- (419) Wang HL, Anatelli F, Zhai QJ, Adley B, Chuang ST, Yang XJ. Glypican-3 as a useful diagnostic marker that distinguishes hepatocellular carcinoma from benign hepatocellular mass lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2008 Nov;132(11):1723-8.

- (420) Beale G, Chattopadhyay D, Gray J, Stewart S, Hudson M, Day C, et al. AFP, PIVKAI, GP3, SCCA-1 and follistatin as surveillance biomarkers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *BMC Cancer* 2008 Jul 18;8(1):200.
- (421) 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.
- (422) Tan A, Kim R, El-Gazzaz G, Menon N, Aucejo F. Serum vascular endothelial growth factor level in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation: experience of a single Western center. *Int J Organ Transplant Med* 2012;3(1):42-51.
- (423) Nabih MI, Aref WM, Fathy MM. Significance of plasma osteopontin in diagnosis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Arab J Gastroenterol* 2014;15(3-4):103-7.
- (424) Xie H, Song J, Du R, Liu K, Wang J, Tang H, et al. Prognostic significance of osteopontin in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2007 Feb;39(2):167-72.
- (425) Abu El Makarem MA, Abdel-Aleem A, Ali A, Saber R, Shatat M, Rahem DA, et al. Diagnostic significance of plasma osteopontin in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol* 2011;10(3):296-305.
- (426) 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.
- (427) 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.
- (428) 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.
- (429) Welling TH, Fu S, Wan S, Zou W, Marrero JA. Elevated serum IL-8 is associated with the presence of hepatocellular carcinoma and independently predicts survival. *Cancer Invest* 2012 Dec;30(10):689-97.
- (430) Liu S, Li N, Yu X, Xiao X, Cheng K, Hu J, et al. Expression of intercellular adhesion molecule 1 by hepatocellular carcinoma stem cells and circulating tumor cells. *Gastroenterology* 2013 May;144(5):1031-41.

- (431) Nagai S, Facciuto M, Mori S, Ninomiya M, Rocca JP, Contreras-Saldivar A, et al. Recurrence prediction of hepatocellular carcinoma after liver transplantation by ischemia time and tumor characteristics. *J Hepatol* 2013 Feb 17.
- (432) Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004 Jul;4(7):540-50.
- (433) 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). ppi:E166.
- (434) Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008 Nov 1;14(21):6735-41.
- (435) Chen ZY, Wei W, Guo ZX, Peng LX, Shi M, Li SH, et al. Using multiple cytokines to predict hepatocellular carcinoma recurrence in two patient cohorts. *Br J Cancer* 2014 Feb 4;110(3):733-40.
- (436) 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.
- (437) Li X, Feng GS, Zheng CS, Zhuo CK, Liu X. Expression of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma and effect of transcatheter arterial chemoembolization therapy on plasma vascular endothelial growth factor level. *World J Gastroenterol* 2004 Oct 1;10(19):2878-82.
- (438) Brodsky SV, Facciuto ME, Heydt D, Chen J, Islam HK, Kajstura M, et al. Dynamics of circulating microparticles in liver transplant patients. *J Gastrointest Liver Dis* 2008 Sep;17(3):261-8.
- (439) Scatton O, Zalinski S, Terris B, Lefevre JH, Casali A, Massault PP, et al. Hepatocellular carcinoma developed on compensated cirrhosis: resection as a selection tool for liver transplantation. *Liver Transpl* 2008 Jun;14(6):779-88.
- (440) Cha C, Fong Y, Jarnagin WR, Blumgart LH, DeMatteo RP. Predictors and patterns of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg* 2003 Nov;197(5):753-8.
- (441) Jonas S, Bechstein WO, Steinmuller T, Herrmann M, Radke C, Berg T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001 May;33(5):1080-6.
- (442) von Felden J, Schulze K, Krech T, Ewald F, Nashan B, Pantel K, et al. Circulating tumor cells as liquid biomarker for high HCC recurrence risk after curative liver resection. *Oncotarget* 2017 Oct 27;8(52):89978-87.

(443) 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.

9. ANEXOS

Anexo I. Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia, España).



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 CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 29/05/2017, acta 05/2017 ha evaluado la propuesta del investigador **Dr. Pablo Ramirez Romero** referida al estudio:

Título: Utilidad de la biopsia líquida y otros marcadores tumorales en el trasplante hepático por hepatocarcinoma

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 CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE.**

Lo que firmo en Murcia, a 29 de mayo de 2017

Fdo:



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
 Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

Anexo II. Modelo de Consentimiento Informado Específico para formar parte del estudio.



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE (v.3)

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 Área I* del hospital 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.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, 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 Área I* del *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* hasta su extinción. Este Biobanco forma parte como nodo de la Red Temática de Investigación Cooperativa (RETIC) de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III con la referencia *RD09/0076/00065*, y está en proceso de Registro con el desarrollo de la normativa regional de Biobancos que aplica la normativa nacional.

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 por los Comités de Ética. Dichas muestras y su información asociada quedan disponibles para aquellos investigadores que lo soliciten al biobanco.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



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 de la Investigación (CEI) 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 del Hospital 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.

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 fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos.

*Responsable del fichero : Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia.
 Dirección Postal: Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia*

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como 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
 Responsable del nodo Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia
 Tel.: 968359757 E-mail: juanp.serna@carm.es

Carácter altruista de la donación. La cesión de muestras biológicas que usted realiza al Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca 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.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



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 Director 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.

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 julio 2012



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 Edad: 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 Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea 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 Biobanc-Mur Nodo Área I*, 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.

Confirmando que:

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 *Biobanc-Mur Nodo Área I*, 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. 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
 Red Nacional de Biobancos – ISCIH. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO ANTE TESTIGOS

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 Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del testigo 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 Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante confirma que el donante:

- 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 *Biobanc-Mur Nodo Área I*, 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:
- He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

- 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
 Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES

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 Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del tutor legal 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 Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea 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 Biobanc-Mur Nodo Área I*, 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.

El abajo firmante confirma que:

- Se me ha informado que, llegada la mayoría de edad de mi representado, este tendrá derecho a revocar o modificar este consentimiento, para lo cual deberá estar debidamente informado. En caso de que no ejerza dicho derecho, se considerará que el actual documento de consentimiento informado sigue vigente.
 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:
- He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:
.....
.....
.....
- Me autoriza a firmar en su nombre.

TUTOR	ASENTIMIENTO DEL MENOR CAPACITADO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma	Firma



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



En....., a..... de..... de.....

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 Área I**, 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 julio 2012