

# **TESIS DOCTORAL**

## **Biopsia líquida basada en detección y caracterización de células epiteliales circulantes para la intercepción del carcinoma hepatocelular**

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública



# **UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Autor:**

**Amparo Roa Colomo**

**Directores:**

**Francisco Javier Salmerón Escobar**

**María del Carmen Garrido Navas**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Amparo Roa Colomo  
ISBN: 978-84-1195-301-6  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92338>

***A mis padres, Amparo y Andrés.***

***A mi marido José Luis y a mi hija Amparo.***



## AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los pacientes que forman parte de este estudio. Por la solidaridad con la que han participado, con la intención de apoyar a la ciencia y a la investigación, para ayudar a los futuros pacientes con hepatocarcinoma y para mejorar el pronóstico de esta grave enfermedad. Gracias especialmente a todos aquellos pacientes con hepatocarcinoma que a pesar de su delicada salud, han estado siempre disponibles y dispuestos a colaborar.

A mi tutor y director, el Dr. Javier Salmerón, por pensar en mí para este trabajo y por darme la oportunidad de comenzar a investigar. Por haber hecho que este camino haya sido más fácil gracias a su accesibilidad y agilidad en sus correcciones.

A mi directora, la Dra. M<sup>a</sup> del Carmen Garrido Navas, que me ha guiado de forma excepcional en la fase final del doctorado. Gracias por su total disponibilidad a lo largo de estos años, por su paciencia y celeridad en dar respuesta a mis dudas.

A la Dra. María José Serrano, que dirigió esta tesis doctoral durante los primeros años. Gracias por aportar sus conocimientos científicos a este trabajo y por enseñarme tantas cosas sobre biopsia líquida. Gracias por su empeño en que esta tesis doctoral saliera adelante.

A todo el equipo de Genyo, por su trabajo y dedicación a la ciencia. En especial, gracias a Pilar Molina, por su coordinación conmigo para la recogida y procesamiento de muestras.

Al servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Clínico San Cecilio, donde pasé cinco maravillosos años, aprendiendo y trabajando al máximo. Gracias a todos por acordaros de mí cuando se diagnosticaba un hepatocarcinoma para poder incluirlo en este trabajo.

A la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles López Garrido, hepatóloga del Hospital Virgen de las Nieves, por su ayuda en el reclutamiento de pacientes del grupo quirúrgico. Sin su amabilidad e interés no habríamos podido incluir tantos pacientes en este grupo.

A mis compañeros de residencia, por su ayuda en la recogida de muestras cuando yo no podía hacerme cargo. Gracias por todos los buenos momentos juntos y por animarme a seguir adelante con este trabajo.

A todo el equipo de enfermería de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Clínico San Cecilio, por ayudarme a sacar sangre a tantos pacientes. En especial, gracias a Salvadora Benito que además de ayudarme en cualquier momento con una sonrisa, me enseñó a sacar sangre por mí misma.

A mi marido José Luis, mi mejor compañero de vida y la persona que se alegra de mis logros como si fueran suyos. Gracias por su apoyo a lo largo de estos años y por sobrellevar todas las horas y días que he restado a nuestra familia para poder dedicarme a la elaboración de esta tesis.

A mi hija Amparo, la mayor suerte de mi vida, que me ha acompañado durante el embarazo y sus primeros meses de vida en la redacción de la tesis doctoral. Ha sido un gran esfuerzo para ambas que sin duda, ha merecido la pena.

Finalmente y especialmente, gracias a mis padres, Amparo y Andrés. Por forjar en mí un espíritu de esfuerzo, sacrificio y trabajo, por enseñarme a querer ser cada día mejor y no conformarme. Sin su ayuda incondicional a lo largo de mi vida no habría llegado a este punto en mi carrera y es gracias a ellos que he podido ir cumpliendo metas.



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA  
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA



Universidad de Granada

# **Biopsia líquida basada en detección y caracterización de células epiteliales circulantes para la intercepción del carcinoma hepatocelular**

**AMPARO ROA COLOMO**

**Tesis doctoral**

**Granada, 2024**





# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>17</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.1. EPIDEMIOLOGÍA</b> .....	19
<b>2.1.2. FACTORES DE RIESGO</b> .....	20
2.1.2.1 Virus de la hepatitis B (VHB) .....	20
2.1.2.2 Virus de la hepatitis C (VHC) .....	21
2.1.2.3 Virus de la Hepatitis D (VHD) .....	21
2.1.2.4 Alcohol.....	21
2.1.2.5 Enfermedad del hígado graso no alcohólica EHGNA .....	22
2.1.2.6 Obesidad y diabetes mellitus .....	22
2.1.2.7 Otros .....	22
<b>2.1.3. FACTORES PROTECTORES</b> .....	23
<b>2.1.4. HEPATOCARCINOGENESIS</b> .....	26
<b>2.1.5. PREVENCIÓN Y ESTRATEGIA DE CRIBADO</b> .....	32
<b>2.1.6. PRESENTACIÓN CLÍNICA DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR</b> .....	36
<b>2.1.7. DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR</b> .....	37
<b>2.1.8. ESTADIFICACIÓN Y MANEJO TERAPEUTICO</b> .....	42
2.1.8.1 Evaluación de la función hepática y el estado general.....	42
2.1.8.2 Estadio BCLC-0 .....	45
2.1.8.3 Estadio BCLC-A .....	46
2.1.8.4 Estadio BCLC-B .....	47
2.1.8.5 Estadio BCLC-C .....	48
2.1.8.6 Estadio BCLC-D.....	49
2.1.8.7 Radioembolización transarterial (TARE) .....	49
<b>2.1.9. PRONÓSTICO</b> .....	49
<b>2.1.10. CONCEPTOS DE DOWNSTAGING Y MIGRACIÓN TERAPÉUTICA</b> .....	50
<b>2.1.11. PATRONES DE PROGRESIÓN</b> .....	50
<b>2.2. BIOPSIA LÍQUIDA</b> .....	<b>52</b>
<b>2.2.1. CONCEPTO DE BIOPSIA LÍQUIDA</b> .....	52
<b>2.2.2. TIPOS DE BIOPSIA LÍQUIDA</b> .....	52
<b>2.2.3. VENTAJAS Y APLICACIONES DE LA BIOPSIA LÍQUIDA</b> .....	54
<b>2.2.4. PROCESO DE DISEMINACIÓN TUMORAL</b> .....	55
<b>2.2.5. INTERCEPCIÓN DE CÁNCER</b> .....	56
<b>2.2.6. TÉCNICAS DE ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE CTCs</b> .....	57
2.2.6.1. Técnicas de enriquecimiento y aislamiento celular .....	58
2.2.6.1.1 Técnicas biológicas dependientes de marcador.....	58
2.2.6.1.2 Técnicas físicas independientes de marcador .....	59
2.2.6.2 Técnicas de identificación y caracterización celular .....	60
<b>2.2.7. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTCs) Y CÉLULAS EPITELIALES CIRCULANTES (CECs)</b> .....	61
<b>2.2.8. BIOPSIA LÍQUIDA Y HEPATOCARCINOMA</b> .....	62
<b>2.2.9. RECEPTOR DE ASIALOGLICOPROTEÍNA (ASGR)</b> .....	64
<b>2.2.10. MIR-122-5P</b> .....	66
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>69</b>

4. OBJETIVOS.....	70
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
5.1. DISEÑO .....	71
5.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	71
5.3. TAMAÑO MUESTRAL .....	72
5.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	73
5.4.1. AISLAMIENTO DE CECs .....	73
5.4.2. CUANTIFICACIÓN DE CECs Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA MEDIANTE DETECCIÓN DE ASGR1..	73
5.4.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CECs MEDIANTE INMUNOFISH .....	74
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	75
5.6. FINANCIACIÓN.....	76
6. RESULTADOS .....	77
6.1. DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA COHORTE A ESTUDIO .....	77
6.2. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA Y HEPATOCARCINOMA .....	83
6.3. CORRELACIÓN DE LOS FENOTIPOS DE CÉLULAS EPITELIALES CIRCULANTES CON LOS DATOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS.....	87
6.4. EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LAS CÉLULAS EPITELIALES CIRCULANTES TRAS EL TRATAMIENTO DE LOS CHC .....	91
7. DISCUSIÓN .....	93
7.1. UTILIDAD DE ASGR1 EN CHC.....	93
7.2. UTILIDAD DE miR-122-5p EN CHC .....	95
7.3. ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO CON ASGR1 Y miR-122-5p.....	96
7.4. APLICACIONES CLÍNICAS DE LA CARACTERIZACIÓN DE CECs CON ASGR1 Y miR-122-5p.....	96
7.4.1. CRIBADO DE CHC.....	97
7.4.2. DIAGNÓSTICO DE CHC.....	97
7.4.3. MONITORIZACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD .....	98
7.4.4. SELECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON CRITERIOS EXPANDIDOS DE TRASPLANTE HEPÁTICO .....	99
7.4.5. SELECCIÓN DE PACIENTES CANDIDATOS A TRASPLANTE <i>AB INITIO</i> .....	101
7.5. B-CATENINA COMO NUEVO BIOMARCADOR PRONÓSTICO .....	102
7.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	102
7.7. FUTURO.....	103
8. CONCLUSIONES .....	104
9. ABREVIATURAS .....	105
10. ANEXOS.....	109
10.1. ANEXO I: APROBACIÓN POR EL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN DE GRANADA.....	109
10.2. ANEXO II: CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES CON HEPATOCARCINOMA.....	110
10.3. ANEXO III: CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA.....	112
11. BIBLIOGRAFÍA.....	113
12. DERECHOS Y PERMISOS.....	141

# BIOPSIA LÍQUIDA BASADA EN DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES CIRCULANTES PARA LA INTERCEPCIÓN DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR

## 1. RESUMEN

### Introducción y motivación de la tesis:

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el sexto cáncer más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo. La falta de biomarcadores diagnósticos y pronósticos impide estratificar a los pacientes según su riesgo de desarrollar cáncer, lo que contribuye a su baja supervivencia. El diagnóstico en cirróticos se establece con pruebas de imagen dinámica por lo que la ausencia de biopsia tisular complica el estudio de su biología molecular y la detección de nuevos marcadores pronósticos y dianas terapéuticas. Por este motivo, es interesante el estudio de la biopsia líquida mediante la detección de células epiteliales circulantes (CECs) en sangre periférica de pacientes con cirrosis hepática o CHC, ya que es una forma no invasiva y segura de obtener muestras seriadas del paciente para su diagnóstico y seguimiento.

El objetivo de esta tesis doctoral fue determinar el valor pronóstico de la detección y caracterización de CECs en pacientes con CHC y con cirrosis hepática sin CHC. Se evaluó la heterogeneidad fenotípica y genética de las CECs basada en el receptor de asialoglicoproteína-1 (ASGR1) y la expresión del micro-ARN miR-122-5p como posibles herramientas de diagnóstico y pronóstico en pacientes con CHC y cirrosis hepática.

### Métodos:

Se trata de un estudio observacional prospectivo de cohortes en el que se incluyeron 113 pacientes de los cuales 71 tenían CHC en distintos estadios de la enfermedad y 42 cirrosis hepática sin CHC, a los que se les hicieron determinaciones seriadas de los niveles de CECs. Se extrajeron muestras de sangre periférica y se aislaron las CECs mediante selección inmunomagnética positiva. La caracterización fenotípica se validó mediante doble inmunocitoquímica para citoqueratina (CK) y ASGR1 y la caracterización genética se validó por hibridación in situ con miR-122-5p. Las CECs se visualizaron mediante microscopía confocal.

### Resultados:

Se detectaron CECs en 78 pacientes (69,03%), siendo significativamente más frecuente en pacientes con CHC (54/71; 76,05%) que en pacientes sin CHC (24/42; 57,14%) ( $p=0,023$ ). Destaca la heterogeneidad fenotípica de las CECs en base a ASGR1 tanto intra como interindividualmente. La presencia de CECs<sup>CK+ASGR1-</sup> se relacionó significativamente con la aparición de cáncer ( $p = 0,012$ ) y se observó que existe correlación positiva entre la expresión de ASGR1 y miR-122-5p ya que todas CECs<sup>CK+ASGR+</sup> también mostraron positividad para miR-122-5p, demostrando su origen hepático. Los pacientes con CHC en estadios tempranos mostraron significativamente mayor supervivencia global que los pacientes con CHC avanzado ( $p = 0,018$ ). Sin embargo, esta diferencia sólo se observó en pacientes con CECs ( $p = 0,021$ ). La supervivencia libre de progresión fue significativamente menor en los pacientes con CHC y CECs<sup>CK+ASGR1-</sup> en comparación con los pacientes con cirrosis hepática sin CHC ( $p < 0,0001$ ).

**Conclusión:**

Nuestros resultados resaltan la utilidad clínica de la caracterización de CECs con ASGR1/miR-122-5p en pacientes con cirrosis hepática o CHC, para identificar el origen hepático de las CECs y para detectar fenotipos potencialmente más agresivos (con pérdida de ASGR1/miR-122-5p), lo que serviría como herramienta predictiva y pronóstica.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR

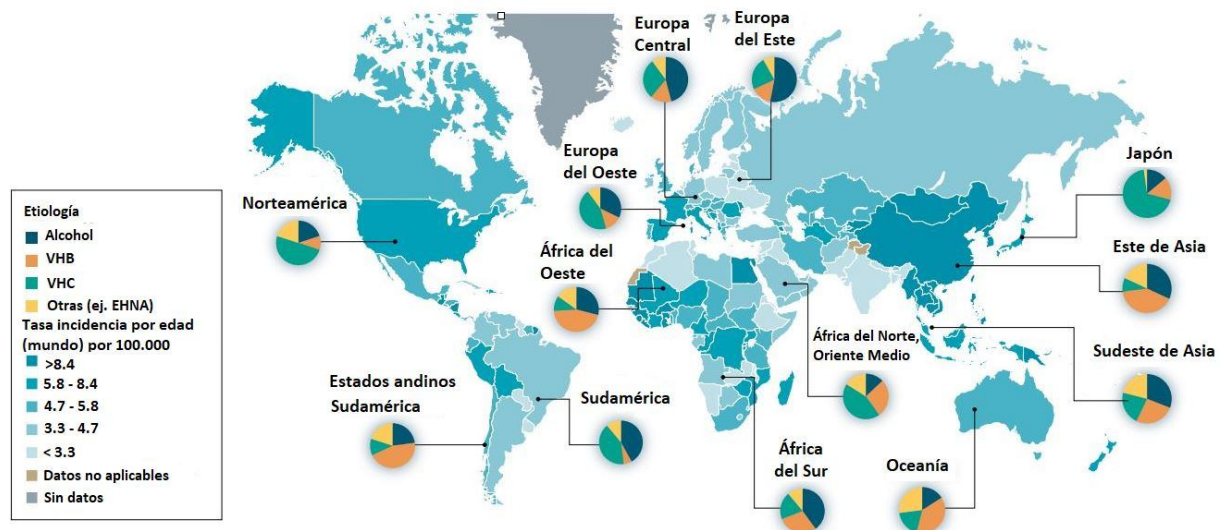
El **carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma (CHC)** es el **tumor hepático primario más frecuente**. Es un tumor derivado del hepatocito que normalmente **se desarrolla en el contexto de una enfermedad hepática crónica**, particularmente, en pacientes con cirrosis hepática (70-90% de los casos).

Aproximadamente el 75% de los tumores hepáticos primarios son CHC, siendo el colangiocarcinoma, el segundo tumor hepático más frecuente<sup>1</sup>.

#### 2.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma hepatocelular es el **sexto cáncer más frecuente** y la **tercera causa de muerte relacionada con el cáncer en el mundo**<sup>2</sup>. En 2020, más de 900.000 personas fueron diagnosticadas en todo el mundo y se espera que la incidencia estimada aumente a 1.4 millones de personas en 2040<sup>3</sup>. En España, según la Red de Registros de Cáncer REDECAN.org, se estimaron 6.604 nuevos casos de CHC en el año 2022 (5.100 en varones y 1.504 en mujeres). La supervivencia a los 5 años es del 21% aproximadamente, por lo que es uno de los tumores gastrointestinales más letales<sup>4</sup>.

Su **distribución mundial** es muy **heterogénea** y se encuentra estrechamente **relacionada** con la **prevalencia** de diferentes **factores de riesgo**. La mayor incidencia y mortalidad de CHC se observa en el este de Asia y África, aunque la incidencia y la mortalidad del CHC está aumentando en diferentes partes de Europa y en EEUU (**Figura 1**)<sup>2</sup>.



**Figura 1. Incidencia de CHC según área geográfica y etiología.** VHB: Virus de la Hepatitis B. VHC: Virus de la Hepatitis C. EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica. Fuente: adaptado de Llovet JM et al. *Hepatocellular carcinoma. Nat Rev Dis Primers. 2021 Jan 21;7(1):6*<sup>2</sup>.

La **mayor incidencia** se observa en el **este de Asia**, siendo Mongolia el país con más CHC en todo el mundo<sup>2</sup>. El virus de la hepatitis B (VHB) es el principal factor etiológico en la mayor parte de Asia (excepto Japón), América del Sur y África. El virus de la hepatitis C (VHC) es el

factor causal predominante en Europa occidental, América del Norte y Japón. El consumo de alcohol es el factor etiológico principal en Europa Central y Oriental. La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), es el factor de riesgo que se postula como causa predominante de CHC en poblaciones desarrolladas en el futuro próximo<sup>2</sup>.

El CHC predomina en **varones**, en una proporción hombre-mujer 3:1 y se presenta con mayor frecuencia **entre los 50 y los 70 años**<sup>5</sup>.

### 2.1.2. FACTORES DE RIESGO

Se han identificado múltiples factores de riesgo de desarrollo de CHC cuya característica común es el **daño sobre el parénquima hepático sano que resulta en cirrosis hepática**. Los pacientes con cirrosis de cualquier etiología tienen riesgo de desarrollar CHC y se estima que un tercio de los pacientes con cirrosis hepática desarrollarán CHC a lo largo de su vida, con una **incidencia anual del 1-6%** según diferentes estudios<sup>6,7,8</sup>.

#### 2.1.2.1 Virus de la hepatitis B (VHB)

La infección crónica por el VHB se ha asociado con un riesgo aumentado de CHC. El **50% de los casos de CHC** en todo el mundo se atribuyen a la infección crónica por VHB<sup>9</sup>. Aunque el CHC **puede desarrollarse en pacientes con infección crónica por VHB sin cirrosis hepática**, la mayoría de los pacientes con VHB que desarrollan CHC tienen cirrosis con una incidencia anual de 3,2 casos por 100 personas/año en pacientes con cirrosis hepática secundaria a VHB versus 0,1 casos por 100 personas/año en pacientes con infección crónica VHB sin cirrosis<sup>10</sup>.

Existen **factores relativos al VHB** que se han asociado a un **incremento del riesgo de CHC**: carga viral de VHB elevada (niveles DNA VHB superiores a 10<sup>6</sup> copias/mL)<sup>11</sup>; antígeno e de VHB (HBe Ag) positivo<sup>12</sup>; niveles de antígeno s de VHB (HBs Ag) superiores a 1.000 IU/mL en pacientes con HBe Ag negativo con baja carga viral<sup>13</sup>; VHB genotipo C<sup>14</sup>; sexo masculino<sup>13</sup>; coinfección con el virus de la hepatitis D (VHD)<sup>15</sup> y el virus de la hepatitis E (VHE)<sup>16</sup>. El aclaramiento de HBs Ag no elimina el riesgo de CHC aunque disminuye su riesgo frente a los pacientes HBs Ag positivo<sup>17</sup>.

Otros factores que incrementan el riesgo de desarrollar CHC en pacientes con infección crónica VHB son: la adquisición del virus a una edad temprana o tardía, uso concomitante de alcohol y tabaco y antecedentes familiares de CHC<sup>18,19,20</sup>.

Estudios retrospectivos realizados predominantemente en Asia indican una reducción del riesgo del 30% de CHC en cirróticos con el uso de los antivirales entecavir y tenofovir, y del 80% con el uso de los mismos en pacientes sin cirrosis, aunque la evidencia en pacientes occidentales aún es limitada<sup>21,22</sup>. Hay que destacar que **los antivirales actuales contra el VHB no eliminan de forma completa el riesgo de CHC, especialmente en pacientes con cirrosis**, en los que incluso una muy baja carga viral (< 2.000 UI/mL) supone un aumento de

riesgo de CHC (Hazard Ratio HR 2,20) comparado con pacientes con DNA del VHB indetectable<sup>23</sup>.

### 2.1.2.2 Virus de la hepatitis C (VHC)

A diferencia del VHB, la infección por VHC se relaciona con CHC en **pacientes que han desarrollado cirrosis hepática o fibrosis avanzada** y supone el **20% de los casos de CHC** en el mundo<sup>9</sup>. Además, tienen mayor riesgo los pacientes con genotipo 1b<sup>24,25</sup>, coinfectados con VHB<sup>26</sup> o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>27</sup>, aquellos pacientes que consumen concomitantemente alcohol<sup>28</sup> y tabaco<sup>29</sup> y aquellos que asocian factores metabólicos como la diabetes mellitus o la obesidad<sup>30</sup>.

El desarrollo de una vacuna profiláctica como prevención primaria de la infección por VHC es un reto debido a la alta variabilidad de la genética viral. Por ello, la **prevención** se basa fundamentalmente en **evitar la transmisión**, en particular por vía parenteral a través de transfusión de hemoderivados o agujas contaminadas. Cuando la infección ya se ha adquirido, el riesgo de complicaciones y la mortalidad asociada al desarrollo de una cirrosis, así como el riesgo de desarrollar CHC, es menor en pacientes que alcanzan respuesta viral sostenida (RVS) tras tratamiento, independientemente del grado de fibrosis de la enfermedad hepática del paciente<sup>31</sup>. A pesar de la mejora en la tasa de RVS con los antivirales de acción directa (AAD), se prevé que la incidencia de CHC aumente aún más hasta 2060<sup>32</sup>. **En pacientes con cirrosis ya establecida, la RVS reduce el riesgo de CHC en comparación con aquellos pacientes que no logran RVS pero no se elimina el riesgo de CHC**<sup>33</sup>. Por este motivo, se recomienda seguimiento en pacientes con fibrosis avanzada y cirrosis hepática, aunque hayan alcanzado la RVS.

### 2.1.2.3 Virus de la Hepatitis D (VHD)

La infección por el VHD está causada por un **virus RNA defectuoso que requiere la presencia del VHB para replicarse** y no puede establecer infección por sí solo. La **coinfección VHB y VHD** se asocia a un **riesgo aumentado de CHC** comparada con la infección por VHB sola (Odds Ratio OR 1,28; IC 95% 1,05-1,57)<sup>34</sup>. Esta asociación fue aún mayor en pacientes coinfectados con VHB-VIH (OR 7,13; IC 95% 2,83-17,92)<sup>35</sup>.

### 2.1.2.4 Alcohol

La relación entre el alcohol y el CHC se establece tanto por su **efecto tóxico directo**, como porque supone un **factor de riesgo** importante para la **cirrosis hepática**, factor predisponente de CHC<sup>36</sup>. En los pacientes con cirrosis hepática alcohólica se estima una incidencia de CHC de 2,9 casos por 100 pacientes/año<sup>37</sup>.

Además, como se ha referido antes, **el alcohol puede actuar de forma sinérgica con otros factores de riesgo coexistentes** como las hepatitis virales<sup>28</sup>, la diabetes mellitus y la obesidad<sup>30</sup>.

Existen dos metaanálisis de estudios de cohortes que evalúan el impacto del consumo de alcohol y el riesgo de CHC. El primero de ellos incluyó 19 estudios y demostró un aumento

del riesgo de CHC dependiente de la dosis (HR 1,16 en pacientes con consumo de más de 3 bebidas alcohólicas diarias)<sup>38</sup>; y el segundo, de 4 estudios, mostró que la abstinencia alcohólica redujo el riesgo de CHC un 6-7% anual. Aún, se cree que se precisan más de dos décadas para reducir el riesgo de CHC al nivel de los que nunca han consumido alcohol cuando ya existe cirrosis establecida<sup>39</sup>. Además, los pacientes con CHC por alcohol suelen diagnosticarse con más frecuencia en fase avanzada, en el seno de una cirrosis descompensada, y en menor proporción en programas de vigilancia, comparado con los de etiología viral<sup>40</sup>.

Al igual que el tabaco, el alcohol es un **factor de riesgo independiente de CHC y otros tumores** (por ejemplo: esófago, estómago)<sup>29,41</sup>.

#### **2.1.2.5 Enfermedad del hígado graso no alcohólica EHGNA**

La EHGNA representa un factor de riesgo de CHC con una **incidencia en aumento, especialmente en países occidentales**<sup>42</sup>. Un 25% de la población mundial presenta EHGNA; el 60% de los pacientes con EHGNA biopsiados presentan esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con una tasa de CHC de 5,29 por 1.000 personas-año<sup>43</sup>. En el estudio de Estes C. et al se utilizó un modelo de Markov para pronosticar la progresión de la EHGNA en Estados Unidos. Según este estudio se espera que la prevalencia de CHC aumente de 10.100 a 24.900 casos durante el período de 2015-2030, un incremento del 146%. Además, se espera un crecimiento de casos de CHC incidentes en un 137% en Estados Unidos, de 5.160 a 12.240 casos en 2030<sup>44</sup>. En España, según un estudio en el que se comparó la incidencia de CHC en pacientes con cirrosis hepática secundaria a EHGNA entre los años 2008-2009 y 2014-2015, se encontró un aumento de enfermedad crónica hepática por depósito de grasa como causa de CHC. Concretamente, los casos prácticamente se triplicaron en 2014-2015 (5,8%) respecto a 2008-2009 (2%)<sup>45</sup>.

#### **2.1.2.6 Obesidad y diabetes mellitus**

La **obesidad** ha sido descrita como **factor de riesgo independiente de CHC**. En un metaanálisis de 11 estudios de cohortes, el riesgo de CHC fue mayor en pacientes con obesidad comparado con aquellos pacientes con peso normal (RR 1,89; IC 95% 1,51-2,36)<sup>46</sup>.

La **diabetes mellitus** se asocia a un **mayor riesgo de prevalencia de CHC**. Según un metaanálisis que incluye 17 estudios de casos-controles y 32 estudios de cohortes existe un aumento estadísticamente significativo del riesgo de prevalencia de CHC entre las personas diabéticas (RR 2,31; IC 95% 1,87-2,84)<sup>47</sup>.

Cabe mencionar que la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 son enfermedades que forman parte del **síndrome metabólico** presente en la mayoría de **pacientes con EHGNA** lo que implica en estos pacientes una **coexistencia de factores de riesgo de CHC**.

#### **2.1.2.7 Otros**

- **Hemocromatosis hereditaria:** se ha demostrado que los **pacientes homocigotos para la variante C282Y en el gen HFE tienen un riesgo aumentado de CHC**, especialmente



alto en pacientes con cirrosis hepática<sup>48</sup>. Los hombres homocigotos para la variante C282Y tienen un mayor riesgo de cáncer hepático (HR 10,5; IC 95% 6,6-16,7;  $p < 0.001$ ) en comparación con hombres sin variantes en el gen *HFE*. En tablas de proyección de vida para hombres homocigotos C282Y hasta los 75 años, el riesgo de presentar cáncer hepático fue del 7,2% (IC 95% 3,9-13,1), en comparación con el 0,6% (IC 95% 0,4-0,7) para hombres sin ninguna variante. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en mujeres<sup>49</sup>.

- **Déficit de alfa1antitripsina:** causado por mutaciones en el gen *SERPINA1*. Se ha asociado con el **incremento de riesgo de cirrosis y de CHC**<sup>50</sup>. No existen estudios recientes que cuantifiquen el grado de desarrollo de CHC en estos pacientes. Sin embargo, se sabe que existen variantes con un aumento de incidencia de CHC como los pacientes homocigotos y heterocigotos con deficiencia de alfa1antitripsina tipo PiZ<sup>50</sup>.
- **Porfiria aguda intermitente:** causada por mutaciones en el gen *HMBS*. Se ha descrito un **aumento de CHC en estos pacientes respecto a la población general**. En un estudio de cohortes en Dinamarca y Suecia publicado en 1999 se describe 70 veces más riesgo de cáncer hepático primario en personas con porfiria aguda intermitente<sup>52</sup>.
- **Porfiria cutánea tarda:** causada por mutaciones en el gen *UROD*. También se ha asociado con un **riesgo aumentado de CHC respecto a la población general** (HR 19,7; IC 95% 8,8-44,0)<sup>53</sup>.
- **Aflatoxina B1:** la ingesta de esta micotoxina que contamina alimentos como el maíz se ha asociado al **desarrollo de CHC** (OR 5,5; IC 95% 1,2-24,5)<sup>54</sup>, especialmente en partes de **África y Asia** donde testar el grano para descartar aflatoxina es menos común y en pacientes con infección crónica por VHB<sup>55</sup>.

### 2.1.3. FACTORES PROTECTORES

- **Estatinas:** estudios observacionales han demostrado que el uso de inhibidores de hidroximetilglutaril-COA-reductasa (estatinas) se ha asociado con un **menor riesgo de CHC**. En un metaanálisis de 10 estudios con 1.45 millones de pacientes, los pacientes que tomaban estatinas tenían un 37% de reducción del riesgo de CHC frente a pacientes que no tomaban estatinas (OR 0,63; IC 95% 0,52-0,76). Estos resultados fueron heterogéneos ( $P=0.01$ ,  $I^2=59\%$ ). Puede deberse a la diferente localización de los estudios: Población asiática ( $n=4$ ) (OR ajustada 0,52; IC 95% 0,42-0,64); Población occidental ( $n=6$ ) (OR ajustada 0,67; IC 95% 0,53-0,85). Así como el diseño del estudio: estudios observacionales ( $n=7$ ) (OR ajustada 0,60; IC 95% 0,49-0,73); y ensayos clínicos ( $n=3$ ) (OR ajustada 0,95; IC 95% 0,62-1,45). Se concluye que el uso de estatinas se asocia con un riesgo reducido de CHC, más fuertemente en las poblaciones asiáticas pero también en las occidentales. Este efecto es mayor en

varones asiáticos con infección crónica VHB, que tienen un alto riesgo de CHC. El efecto es menor en estudios de Estados Unidos y Europa, donde la proporción de individuos con CHC secundario a infección por VHB es menor<sup>56</sup>.

- **Aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos (AINES):** el uso regular a largo plazo de dosis bajas de aspirina (<160 mg diarios) y otros AINES se ha asociado con un **menor riesgo de CHC**. La incidencia acumulada estimada de CHC es del 4% en consumidores de aspirina vs 8% en no consumidores (HR ajustada 0,69; IC 95% 0,62-0,76) y tienen un menor riesgo de mortalidad asociada al hígado a los 10 años (11% en consumidores de aspirina vs 18% en no consumidores; HR ajustada 0,73; IC 95% 0,67-0,81); sin riesgo aumentado de complicaciones gastroenterológicas<sup>57</sup>. Estos datos sugieren que los pacientes con cirrosis hepática que toman aspirina como prevención cardiovascular, pueden obtener un beneficio adicional reduciendo el riesgo de CHC, como también se ha demostrado en la reducción del riesgo del cáncer colorrectal<sup>58</sup>.
- **Metformina:** varios estudios han sugerido que la metformina se asocia a un **menor riesgo de CHC**<sup>59,60</sup>. Por ejemplo, un metaanálisis de 8 estudios observacionales que incluyeron pacientes con diabetes mellitus mostró una reducción de la incidencia de CHC del 50% con el uso de metformina (OR 0,50; IC 95% 0,34-0,73)<sup>61</sup>.
- **Café:** el **consumo regular** de café se ha asociado con un **menor riesgo de CHC** comparado con aquellas personas que no lo consumen o lo hacen ocasionalmente. En un metaanálisis de 12 estudios de cohortes prospectivos se investigó la asociación entre el consumo de café y el riesgo de CHC y se pone de manifiesto su relación inversa. El consumo de café regular tiene un RR de 0,66 (IC 95% 0,55-0,78); el bajo consumo de café tiene un RR de 0,78 (IC 95% 0,66-0,91) y el alto consumo de café tiene un RR 0,50 (IC 95% 0,43-0,58). Si se incrementa el consumo de café una taza por día se obtiene un RR de 0,85 (IC 95% 0,81-0,90)<sup>62</sup>. En otro metaanálisis de 20 estudios de cohortes prospectivos y de casos-controles se describe una disminución del riesgo de cáncer de hígado por consumo de café de 0,69 (IC 95% 0,56-0,85). En este metaanálisis los autores refieren que en varios de los estudios incluidos se encontró una protección significativa contra la aparición de CHC con el consumo de 2 tazas de café al día<sup>63</sup>. El mecanismo biológico entre el consumo de café y la reducción del riesgo de HCC aún no se conoce por completo. Se ha demostrado que la **cafeína** es capaz de prevenir la adhesión y activación de las células estrelladas hepáticas, ejerciendo sus efectos protectores mediante la **estimulación beta oxidativa de la lipólisis, la lipogénesis y la supresión del estrés oxidativo**. También se ha demostrado que **protege contra la progresión de la fibrosis hepática:** en un modelo de rata de fibrosis hepática inducida por alcohol, inhibió la vía de señal de la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP/proteína quinasa A/cAMP, disminuyó los niveles de malondialdehído (MDA) y aumentó la actividad de la glutatión peroxidasa

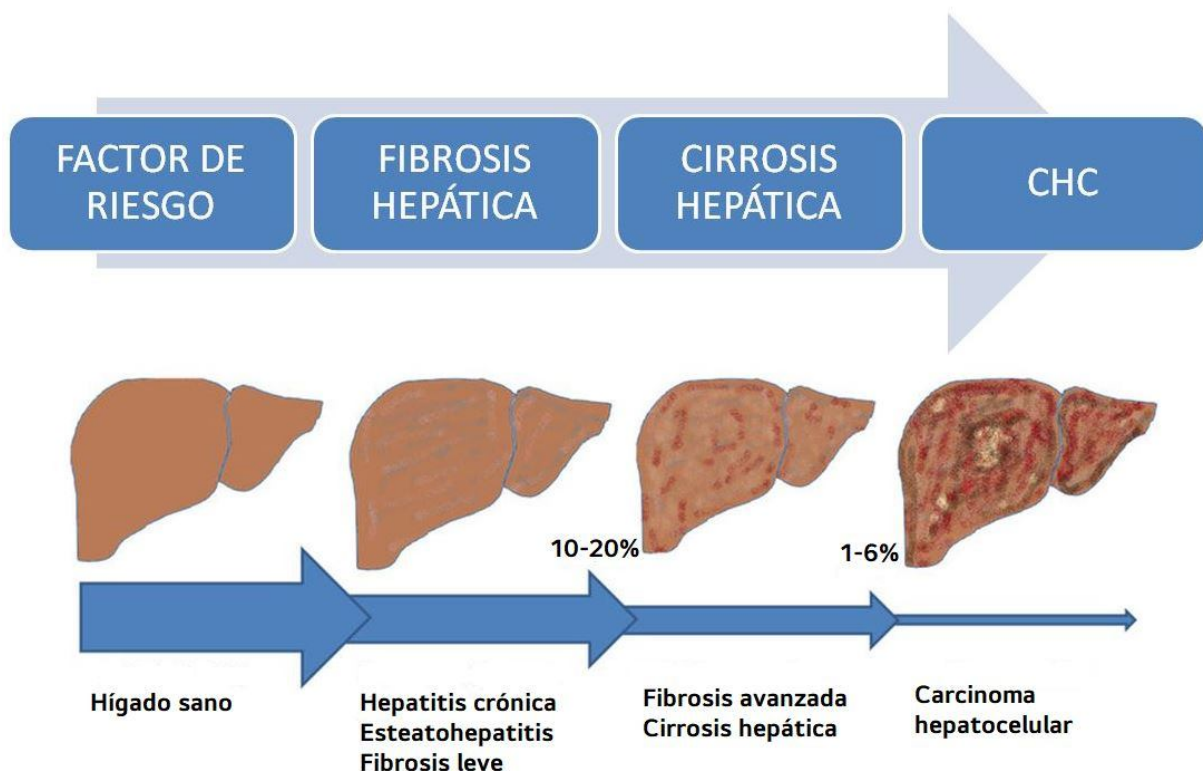
(GPx) en el hígado. Además, se han descrito propiedades quimiopreventivas en la cafeína, incluso en la carcinogénesis hepática. Los estudios *in vitro* demostraron que la cafeína detiene el ciclo celular e inhibe la proliferación celular al bloquear la vía PI3K/Akt<sup>64</sup>. Dos estudios investigaron el efecto de la cafeína en la carcinogénesis hepática *in vivo*, demostrando una incidencia y número reducido de lesiones de CHC en ratas tratadas con cafeína<sup>64</sup>. El café es una de las principales fuentes de antioxidantes en la dieta. Es un fuerte inductor del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), un factor de transcripción que controla la defensa antioxidante, así como las enzimas glutatión sintetasa y glutatión reductasa. Algunos datos demuestran la regulación positiva de las enzimas antioxidantes, en particular la superóxido dismutasa, y la reducción del daño en el ADN causado por el radical de oxígeno reactivo como consecuencia de la administración de café. Entre los efectos beneficiosos de la ingesta de café, parece tener especial importancia la protección frente al estrés oxidativo, que se perfila como un factor clave en la progresión de la fibrosis hepática<sup>64</sup>. Las razones por las que el café tiene efectos beneficiosos solo en la prevención de la hepatocarcinogénesis, y no en otros tipos de cáncer, son difícilmente explicables. El daño por estrés oxidativo, con agotamiento de los antioxidantes y acumulación de daño en el ADN, es uno de los factores clave que promueven la progresión de las enfermedades hepáticas y la evolución a CHC. Además, el daño oxidativo del ADN es un factor de riesgo independiente para CHC<sup>65</sup>. Teniendo en cuenta el papel fundamental del daño por estrés oxidativo en la carcinogénesis hepática, podría explicar por qué el café, una fuente importante de antioxidantes, es particularmente eficaz para prevenir este tumor<sup>64</sup>.

- **Dieta:** el consumo de **carne blanca, pescado, ácidos grasos omega3, verduras y vitamina E** se ha asociado con un riesgo menor de CHC<sup>66,67,68,69</sup>.
- **Ejercicio físico:** estudios observacionales sugieren que la **actividad física** se asocia a un **menor riesgo de cáncer hepático**. Así se demuestra en un estudio prospectivo internacional de cohortes con 15 años de seguimiento, donde la actividad física se asoció con un menor riesgo de CHC comparada con el sedentarismo (HR 0,55; IC 95% 0,38-0,80)<sup>70</sup>. Esto parece tener relación con el efecto beneficioso del ejercicio sobre el metabolismo de la glucosa y el lipídico en el hígado, ya que reduce la resistencia a la insulina. El metanálisis de Golabi et al. (ocho estudios con una duración de 8 a 48 semanas) describió que los ejercicios aeróbicos y de resistencia determinan una reducción de la grasa hepática del 30,2 %<sup>71</sup>.
- **Cirugía bariátrica:** en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica y obesidad, la cirugía bariátrica se ha asociado con **menor tasa de complicaciones hepáticas, incluido el CHC**<sup>72</sup>. Este efecto podría explicarse en parte por la pérdida de peso, aunque no se pueden excluir otros mecanismos contribuyentes (por ejemplo, el aumento de las concentraciones del péptido 1 similar al glucagón, GLP-1, después de

la intervención)<sup>73</sup>. El metanálisis de Lee et al.<sup>74</sup>, analizó los datos de 32 estudios de cohortes (n = 3.093 biopsias hepáticas de pacientes con NAFLD con obesidad que se sometieron a cirugía bariátrica) mostró que la intervención quirúrgica resultó en una reducción del IMC porcentual absoluto del 24,98% (de 48,68 ± 2,92 a 34,2 ± 3,53 kg/m<sup>2</sup>). Esto se acompañó de la resolución de la esteatosis en el 66% de los pacientes, así como la resolución de la inflamación (en el 50 % de los pacientes), la degeneración balonizante (en el 76%) y la fibrosis (en el 40%)<sup>74</sup>. Un metanálisis más reciente de Ramai et al.<sup>75</sup> incluyó nueve estudios (19.514.750 pacientes) e informó que la cirugía bariátrica se asoció con un menor riesgo de CHC (OR combinado no ajustado 0,40; IC 95 % 0,28-0,57 y OR ajustado 0,63; IC 95% 0,53-0,75). Hasta el momento no existe evidencia sobre el tipo específico de intervención quirúrgica que sería más beneficiosa<sup>73</sup>.

#### 2.1.4. HEPATOCARCINOGENÉISIS

La **hepatocarcinogénesis** es un proceso **complejo** y biológicamente **heterogéneo**, que comienza cuando uno o más factores de riesgo mantenidos en el tiempo, desencadenan en un hígado previamente sano, inflamación y fibrosis hepática. **Conforme el grado de fibrosis avanza, es mayor el riesgo de desarrollar hepatocarcinoma (Figura 2)**, siendo la incidencia anual de 1-6% en pacientes con cirrosis hepática previa<sup>6,7,8</sup>.



**Figura 2. Proceso de hepatocarcinogénesis.** El 10-20% de pacientes con hepatitis crónica o fibrosis leve evolucionan a cirrosis hepática, siendo este porcentaje variable en función del factor de riesgo presente. Una vez establecida la cirrosis hepática, la incidencia anual de CHC en cirróticos es del 1-6%<sup>6,7,8</sup>. Fuente: elaboración propia.

La **fibrosis hepática** consiste en el **depósito de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular (MEC) en el parénquima hepático**. El depósito de proteínas de la MEC provoca la disrupción de la arquitectura hepática y es un prerrequisito para el desarrollo de cirrosis, ya que contribuye al desarrollo de nódulos de regeneración<sup>76</sup>.

La **fibrogénesis hepática** es un proceso complejo de **reparación tisular del hígado ante un daño hepatocelular mantenido**, y en el que intervienen de manera activa diversos tipos celulares y citocinas profibrogénicas (**Figura 3**). Después de un daño hepático agudo, las células parenquimatosas del hígado, los hepatocitos, se regeneran y sustituyen el tejido necrótico restableciendo la arquitectura hepática normal. En este proceso se produce un depósito de proteínas de la MEC, en su mayoría colágeno no fibrilar, así como una respuesta inflamatoria. Este colágeno no fibrilar proporciona un sostén para los hepatocitos regenerados y contribuye al mantenimiento de la arquitectura hepática<sup>76</sup>.

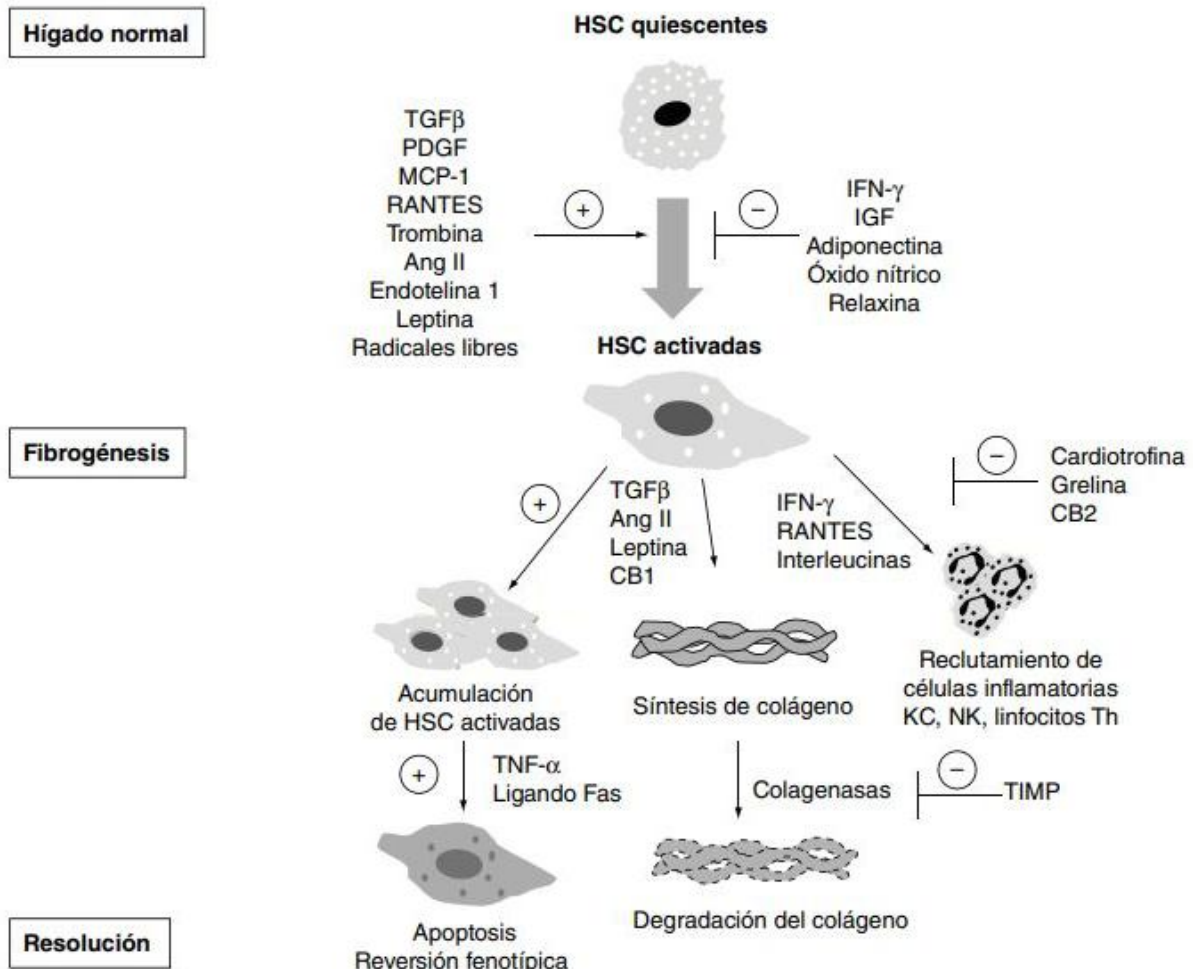
No obstante, si el daño hepático es mantenido, este proceso reparativo se perpetúa, lo que conduce a una disminución en la capacidad de regeneración hepática<sup>76</sup>. Paralelamente, la producción de MEC aumenta y se deposita de forma desorganizada en el lóbulo hepático. La población de hepatocitos es sustituida por una abundante MEC compuesta mayoritariamente por colágeno fibrilar, fibronectina y diversos glucosaminoglicanos. Estas **bandas de colágeno** son muy evidentes en **fases avanzadas** y unen varios espacios porta dando lugar a los denominados **“puentes de fibrosis”**. El desarrollo de estos “puentes de fibrosis” precede a la formación de **nódulos de regeneración** y al desarrollo último de **cirrosis**. La identificación de las **células estrelladas hepáticas (HSC, hepatic stellate cells)** como el **principal tipo celular causante de la síntesis excesiva de colágeno en el hígado fibrótico** ha supuesto uno de los avances más significativos en el conocimiento de la patogenia de la fibrogénesis hepática<sup>77</sup>. En condiciones normales, la principal función de las HSC es el almacenamiento de vitamina A. En el contexto de las hepatopatías crónicas, en cambio, las HSC presentan una transformación fenotípica por la que adquieren contractilidad celular y secretan citocinas proinflamatorias y MEC, características típicas de los miofibroblastos (**ver parte superior de Figura 3**)<sup>76</sup>. A pesar del papel fundamental de las HSC, los avances en el estudio de la fibrogénesis hepática han permitido dilucidar la transformación en miofibroblastos de otros tipos celulares. Éstos comprenden, además de las HSC, fibroblastos portales, fibrocitos circulantes, células derivadas de la médula ósea, así como procesos de transición epitelio-mesénquima (EMT). La contribución relativa de estos tipos celulares es variable, probablemente refleja distintas aportaciones según las distintas etiologías de la fibrogénesis<sup>76</sup>.

Durante el proceso de fibrogénesis hepática se produce una compleja interrelación entre los distintos tipos celulares presentes en el hígado. Así, **los hepatocitos dañados liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros mediadores fibrogénicos que inducen el reclutamiento de células inflamatorias**. Éstas, ya sean linfocitos o células polimorfonucleadas, a su vez están implicadas en la activación de las HSC. Las HSC activadas

secretan quimiocinas y moléculas de adhesión celular, y modulan la activación de linfocitos, estableciéndose de este modo un bucle de retroalimentación positiva. Las **células de Kupffer**, los macrófagos residentes en el hígado, también contribuyen a este proceso liberando citocinas y ROS. Se ha observado que la **respuesta inmune** al daño hepático es un importante **modulador de la fibrogénesis**. Así, las **células natural killer (NK)** disminuyen la fibrogénesis al inducir la apoptosis de las HSC mediante la liberación de interferón (IFN)- $\gamma$  (**ver parte central de Figura 3**). El tipo de patrón linfocitario que infiltra el parénquima también regula la respuesta fibrogénica. Estudios recientes parecen indicar que desequilibrios en la relación de células Th1/Th2 y Treg/Th17 favorecerían la fibrogénesis<sup>76</sup>.

En el hígado fibrótico, las HSC activadas secretan grandes cantidades de **inhibidores tisulares de las colagenasas (TIMP)**. Las TIMP regulan la actividad de las colagenasas, enzimas implicadas en la degradación de las fibras de colágeno. Así, en la fibrogénesis hepática hay un incremento de la expresión de las TIMP y, por tanto, una **inhibición de la actividad de las colagenasas**. Esta inhibición contribuye a la acumulación de colágeno en el contexto de la fibrogénesis (**ver parte inferior de Figura 3**). Además, los cambios en la composición de la MEC estimulan a su vez la transformación de las HSC<sup>76</sup>.

Se ha descrito que la **fibrogénesis hepática** es un proceso **potencialmente reversible**. La **eliminación del agente causal** en diversos modelos experimentales de hepatopatía crónica se asocia a la regresión de la fibrogénesis. En este proceso se produciría un aumento en la actividad de las colagenasas, degradando la MEC acumulada y alterando la interacción entre la MEC y las HSC activadas, favoreciendo su apoptosis. No obstante, se desconocen los mecanismos que posibilitan esta regresión y el grado en que ésta se produce es variable. Es posible que esta **reversibilidad** sea **limitada**, dado que los nódulos de regeneración y las alteraciones en la microcirculación hepática que se producen en las fases avanzadas de la fibrogénesis son fenómenos difícilmente reversibles<sup>76</sup>.



**Figura 3. Mecanismos celulares de la fibrosis hepática.** El daño hepático estimula la activación de las células hepáticas estrelladas (HSC). Las HSC activadas se acumulan y producen grandes cantidades de MEC que se depositan en el parénquima hepático alterando su arquitectura y reclutando células inflamatorias. La fibrosis puede resolverse a través de la degradación del colágeno y de la desaparición de HSC activadas bien por apoptosis bien al producirse una reversión de las HSC activadas hacia HSC quiescentes. Ang II: angiotensina II; CB1: receptor de cannabinoides 1; CB2: receptor de cannabinoides 2; IFN-γ: interferón gamma; IGF: factor de crecimiento insulínico; KC: células de Kupffer; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; NK: células natural killers; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; RANTES: células T reguladas y normales expresadas y secretadas; TGFβ: factor de crecimiento transformante beta; TIMP: inhibidores tisulares de las colagenasas; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa. Fuente: De Odena G; Bataller R. *Fibrogénesis hepática: fisiopatología. Gastroenterol Hepatol. 2012;35(Supl 2):3-9*<sup>76</sup>.

La **inflamación continua** que supone el proceso de fibrosis hepática **ocasionalmente daña el ADN** en los hepatocitos del hígado en regeneración, lo que **aumenta las posibilidades de alteración genética que se relaciona con la carcinogénesis**<sup>78</sup>. La hepatocarcinogénesis es un proceso gradual y heterogéneo durante el cual se alteran múltiples genes. Todavía no se ha logrado con éxito un modelo experimental de hepatocarcinogénesis humana, como la transformación neoplásica *in vitro* de hepatocitos humanos, pero se han establecido varias líneas celulares de hepatocitos humanos inmortalizados<sup>79</sup>.

A continuación se describen algunas **alteraciones moleculares estudiadas en el CHC (Figura 4)**:

- Genes supresores de tumores:
  - **TP53**: este gen tiene funciones cruciales en el control del ciclo celular, la regulación transcripcional y la apoptosis. La alteración del gen *TP53* ocurre con poca frecuencia en el CHC en comparación con otros tumores sólidos. Epidemiológicamente, mutaciones en *TP53* se encontraron con frecuencia en el CHC inducido por aflatoxina (50 %), pero fue poco común en el CHC no inducido por aflatoxina (28–42 %) <sup>79</sup>.
  - **Rb/p16**: El gen del retinoblastoma (*RB1*) es un regulador negativo del ciclo celular a través de su capacidad para unirse al factor de transcripción E2F y suprimir la transcripción de genes relacionados con la fase S. Se han encontrado mutaciones de Rb en solo el 15% de los casos de CHC. Sin embargo, la pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *Loss Of Heterozygosity*) de 13q, donde se encuentra el gen *RB1*, ocurre con mayor frecuencia en CHC (25-48%). El gen *CDKN2A*, también conocido como gen inhibidor 2A de la cinasa dependiente de ciclina, que codifica para la proteína p16, es el regulador de la vía del retinoblastoma. La inactivación de *RB1* o *CDKN2A* se encontró en el 81% de los CHC. Se produjeron alteraciones del gen *CDKN2A* por hipermetilación del promotor o LOH de 9p en CHC <sup>79</sup>.
  - **PTEN**: El homólogo de fosfatasa y tensina (*PTEN*) es un gen supresor de tumores ubicado en el cromosoma 10q. Regula negativamente la vía de señalización de la fosfoinositida 3-quinasa/Akt, que está implicada en la regulación de la supervivencia celular. Se encontró ausencia o expresión reducida de *PTEN* en el 40% de los casos de CHC <sup>79</sup>.
  - **RUNX3**: El factor de transcripción 3 relacionado con Runx (*RUNX3*), ubicado en el cromosoma 1p36, es un posible gen supresor de tumores para CHC, ya que se observó una disminución de la expresión de ARNm de *RUNX3* en el 50-92% de los casos de CHC. La importancia de la disminución de la expresión de *RUNX3* está relacionada con la disfunción de la regulación del ciclo celular, la disminución de la apoptosis, la mejora de la angiogénesis y el desarrollo de la transición epitelio-mesenquima <sup>79</sup>.
- **Oncogenes**: El papel de los oncogenes en el CHC parece ser menos importante que el de los genes supresores de tumores, a diferencia de otros tipos de cáncer. **C-MYC**, ubicado en el cromosoma 8q, es un protooncogén potente en el CHC y otros tipos de cáncer. Codifica una proteína implicada en el metabolismo de los ácidos nucleicos y en la mediación de la respuesta celular a los factores de crecimiento. Se ha descrito correlación de la expresión de *C-MYC* y el tamaño del tumor <sup>80</sup>. Mutaciones en los 3 principales protooncogenes ras (**H-RAS**, **K-RAS** y **N-RAS**) se encontraron solo en

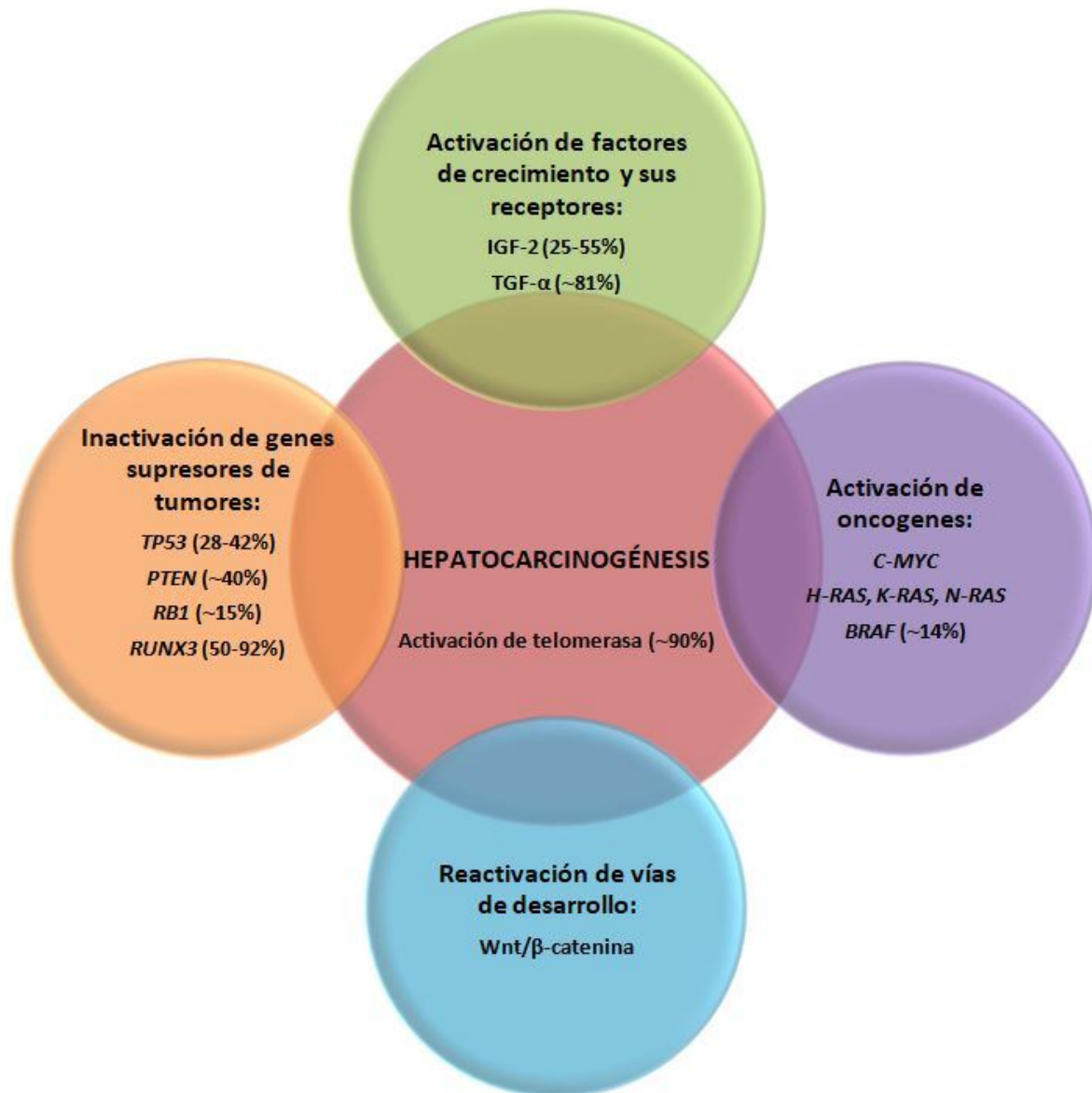


algunos casos de CHC<sup>79</sup>. En el CHC relacionado con cloruro de vinilo se encontraron mutaciones de **K-RAS**<sup>81</sup>. Se han descrito mutaciones puntuales activadoras del gen **BRAF** en el 14% de los casos de CHC<sup>82</sup>.

- **Reactivación de vías de desarrollo:** La vía **Wnt/β-catenina** juega un papel esencial en el desarrollo del hígado y la activación de esta vía se observa en el CHC. El gen **APC**, relacionado con la poliposis adenomatosa familiar, es un regulador crucial de la carcinogénesis intestinal y también está involucrado en la hepatocarcinogénesis. La expresión de **APC** está reducida en el CHC. Esta reducción induce la activación de la vía de señalización de la β-catenina. También se han observado mutaciones en la vía de la β-catenina en CHC, que contribuyen a la activación de la vía de señalización Wnt<sup>79</sup>.
- **Factores de crecimiento y sus receptores:** La expresión del **factor de crecimiento transformante-α (TGF-α)** está aumentado en el 81% de los casos de CHC. El TGF-α estimula la proliferación de células de CHC al activar la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico<sup>79</sup>.
- La vía de señalización del **factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2)** también está involucrada en la hepatocarcinogénesis. LOH o mutaciones en el receptor de IGF-2 se encontraron en el 25-55% de los CHC. La alteración de este receptor está relacionada con la sobreexpresión del mitógeno IGF-2, debido a que el receptor induce la degradación del IGF-2. El receptor de IGF-2 también activa el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β), un regulador negativo del crecimiento celular, al unirse al complejo latente de TGF-β<sup>79</sup>.
- **Actividad de la telomerasa y longitud de los telómeros:** El telómero es una región de ADN repetitivo al final de cada cromosoma, que contribuye a la estabilidad e integridad del cromosoma. La longitud del telómero se mantiene gracias a la actividad de la telomerasa, que es un complejo de ribonucleoproteínas compuesto por la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) y una secuencia de cebador de ARN. Sin TERT, la longitud del telómero disminuye gradualmente con cada división celular. Si las células se dividen sin telómeros, perderían el extremo de sus cromosomas, produciéndose inestabilidad genética. Por lo tanto, la longitud de los telómeros limita la vida útil de las células somáticas normales. Se ha encontrado actividad TERT en la mayoría de los cánceres humanos y en el 90% de los CHC<sup>79</sup>.

**La heterogeneidad en los mecanismos de hepatocarcinogénesis y la alteración de diversos genes explican la complejidad de este proceso.** Dado que la frecuencia de alteración de cada gen individual es relativamente baja, la **acumulación de alteraciones de genes relacionados con el cáncer parece ser necesaria para la hepatocarcinogénesis.** La hepatocarcinogénesis está estrechamente asociada con la cirrosis hepática en la que hay inflamación persistente y división celular de los hepatocitos. La inflamación continua induce

el daño oxidativo del ADN, y luego la reparación del ADN se acompaña ocasionalmente de una incorrecta reparación, lo que resulta en una mayor frecuencia de mutación. La activación constante de la división celular y las mayores posibilidades de errores en la replicación del ADN son factores importantes para el desarrollo de CHC<sup>79</sup>.



**Figura 4. Alteraciones moleculares y genéticas producidas en el CHC.** Se indica en porcentaje la frecuencia de aparición de dichas alteraciones en el CHC. Fuente: adaptado de Shiraha H, Yamamoto K, Namba M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). *Int J Oncol.* 2013 Apr;42(4):1133-8<sup>79</sup>.

### 2.1.5. PREVENCIÓN Y ESTRATEGIA DE CRIBADO

La **eliminación de los factores de riesgo** asociados a la aparición de CHC son claves para disminuir su incidencia y mortalidad. La **vacunación universal del VHB o el tratamiento antiviral frente al VHC** en fases previas al desarrollo de cirrosis hepática, constituyen ejemplos de estrategias de prevención coste-efectivas<sup>83,84</sup>, mientras que el cribado de CHC ha demostrado utilidad en el diagnóstico precoz de la enfermedad.

El **cribado** en oncología se define como la realización de una prueba diagnóstica de forma repetida con el objetivo de la **detección precoz de una neoplasia** y así disminuir la mortalidad asociada a la misma<sup>85</sup>. Teniendo en cuenta que la única posibilidad de aplicar tratamientos con intención curativa es diagnosticando la enfermedad en una fase asintomática y dado que esta opción es únicamente factible si se efectúa cribado en la población en riesgo, **se recomienda ofrecer cribado en pacientes con cirrosis hepática que serían tratados si fueran diagnosticados de CHC.**

Deben considerarse **candidatos a cribado todos los pacientes con cirrosis hepática independientemente de la etiología**. En pacientes afectados de hepatopatía crónica por VHC con cirrosis establecida, la obtención de RVS tras tratamiento con interferón o con AAD no elimina el riesgo de desarrollar CHC<sup>86,87</sup>. Por lo tanto, en estos pacientes también se debe recomendar cribado de CHC. Estudios de USA y Japón sugieren que existe riesgo de desarrollar CHC en pacientes con fibrosis en puente en ausencia de cirrosis<sup>88,89</sup>. Estaría indicado el cribado de CHC en pacientes con fibrosis hepática significativa (F2), pero no hay evidencia para recomendar cribado en pacientes con VHC y RVS sin fibrosis avanzada<sup>90</sup>. Respecto a los pacientes con hepatitis crónica por VHB, el cribado se considera coste-eficaz si el riesgo de CHC es superior a 0,2%/año<sup>91</sup>. Los pacientes asiáticos infectados por VHB deberían incluirse en programas de cribado por encima de los 40 años en el caso de los varones y de los 50 años en mujeres<sup>92</sup>. Esta recomendación se hace extensiva también a los pacientes africanos o afroamericanos<sup>92</sup>, así como en aquellos casos en que además de la infección el paciente tenga un antecedente familiar de primer grado de CHC o coinfección con VHD. Los pacientes con cirrosis hepática deben realizarse cribado independientemente de la actividad replicativa del VHB. Por último, existe escasa información respecto al riesgo de CHC en pacientes afectados de EHGNA, pero aquellos que ya han desarrollado una cirrosis deben ser considerados para cribado<sup>93</sup>. El mismo concepto aplica a hemocromatosis hereditaria y otras entidades que evolucionan a cirrosis<sup>90</sup>.

Se consideran **candidatos** para cribado los pacientes **cirróticos en clase funcional Child Pugh A y B** (ver punto 1.8 Estadificación y Manejo Terapéutico). Los pacientes con mala función hepática o con descompensaciones que condicionan mal pronóstico vital (encefalopatía hepática recurrente, ascitis refractaria, hemorragia variceal no controlada, peritonitis bacteriana espontánea, malnutrición, etc.) deben evaluarse para trasplante hepático<sup>94</sup>. En ellos, la detección de CHC no cambiará la indicación de trasplante, a menos que se excedan los criterios de inclusión en lista de espera y el CHC constituya una contraindicación al trasplante. Dado que en estos pacientes el trasplante se debe considerar por insuficiencia hepática con mal pronóstico a corto plazo, la detección de CHC y su posible tratamiento no tendrá impacto clínicamente significativo en la supervivencia. Por tanto, **no tiene sentido efectuar cribado para detección precoz si el trasplante no es factible**<sup>90</sup>.

**El cribado debe realizarse mediante ecografía abdominal.** Se trata de una técnica no invasiva, aceptada por la población, con una sensibilidad de 60-80% y una especificidad

superior al 90% para la detección precoz de CHC<sup>95</sup>. Es una técnica operador-dependiente, por lo que se requiere que se involucren en el cribado ecografistas expertos con capacitación acreditada. No se aconseja mantener cribado con tomografía computarizada (TC) de abdomen o resonancia magnética (RM) hepática bianual, dado el riesgo de iatrogenia por la radiación ionizante en el primer caso, además de su menor disponibilidad y mayor coste.

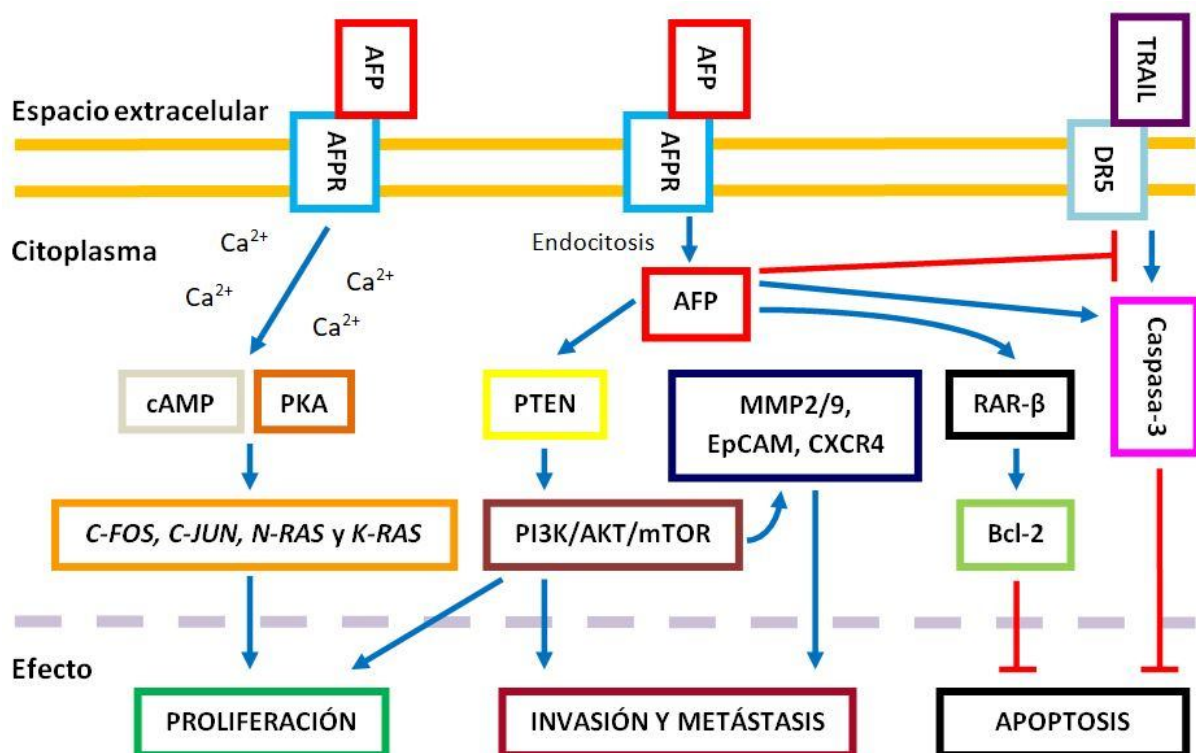
Existen múltiples estudios de cohortes<sup>96,97,98</sup> y de coste eficacia<sup>99,100,101</sup> que refuerzan la utilidad de **establecer seguimiento mediante ecografía cada seis meses**. Se dispone de un único estudio prospectivo y aleatorizado efectuado en China. Incluyó aproximadamente 20.000 pacientes con infección crónica por VHB y los aleatorizó a recibir cribado mediante ecografía cada seis meses y determinación de AFP versus no cribado. A pesar de la baja adherencia (< 60%), la supervivencia de los pacientes incluidos en el programa de cribado fue de 66% a un año, 53% a tres años y 46% a cinco años vs. 31%, 7%, y 0%, respectivamente, en pacientes sin cribado<sup>102</sup>. Los datos referentes a velocidad de crecimiento tumoral y progresión hasta un tamaño detectable por técnicas de imagen son limitados. Series antiguas sugieren que el tiempo para doblar el volumen tumoral oscila entre dos y cuatro meses<sup>103,104</sup>. Estos resultados aportan la base racional para efectuar cribado cada seis meses. Asimismo, este intervalo fue el que se utilizó en el único ensayo clínico aleatorizado que ha demostrado el beneficio del cribado de CHC con ecografía en pacientes con hepatopatía crónica<sup>102</sup>. Existen estudios que describen que un intervalo de 12 meses se asocia a menor supervivencia<sup>105</sup> y un ensayo clínico aleatorizado demostró que el cribado mediante ecografía cada 3 meses no mejora el diagnóstico ni el tratamiento del CHC respecto a realizarlo cada 6 meses<sup>106</sup>. Además, estudios coste-eficacia sugieren que el intervalo de seis meses es más coste-eficaz respecto otras alternativas<sup>107</sup>.

Respecto a los **marcadores tumorales**, el más evaluado ha sido la **alfafetoproteína (AFP)**. Se describió por primera vez como marcador tumoral en pacientes con cáncer hepático por Tatarinov en 1964<sup>108</sup>. Se trata de una glicoproteína que contiene globulina alfa1 y su nivel aumenta durante el embarazo debido a su producción en el hígado fetal. La elevación de AFP desaparece 3 semanas después del nacimiento<sup>109</sup>.

**En el adulto, la AFP juega un papel importante en la inducción de la transformación maligna de las células cancerosas**, regulando la proliferación celular, la migración, la apoptosis y el escape inmunitario. **El comportamiento maligno de la AFP está mediado principalmente por sus receptores (AFPR)**, que están presentes en la superficie celular y su expresión en las células está asociada a la presencia de AFP. Estos hallazgos implican que durante el desarrollo y la carcinogénesis, la expresión de AFPR no solo está acompañada por la expresión de AFP, sino que también puede mediar la endocitosis de AFP extracelular que desempeña un papel en la inducción del crecimiento y la diferenciación de las células que promueven su carcinogénesis<sup>110</sup>. La AFP puede unirse a los AFPR y activar la vía de la proteína quinasa A (PKA) 3', 5'-adenosín monofosfato cíclico (cAMP) e inducir la entrada de Ca<sup>2+</sup>, lo que aumenta el cAMP intracelular y la PKA, mejora la síntesis de ADN y promueve la

expresión de los oncogenes *C-FOS*, *C-JUN*, *N-RAS* y *K-RAS*, estimulando el crecimiento de células de cáncer de hígado. Además, después de unirse a los AFPR, la AFP desencadena señales que promueven el crecimiento y la endocitosis de AFP. La AFP endocitada (también llamada AFP citoplasmática) puede interactuar con *PTEN* y activar la vía PI3K/AKT/mTOR, que promueve el comportamiento maligno de las células del CHC mediante la regulación positiva de la expresión proteica de mTOR<sup>110</sup>.

**La AFP también puede mejorar el efecto antiapoptótico de las células cancerosas.** La AFP citoplasmática aumenta la resistencia a los factores apoptóticos al afectar las vías de señalización de TGF- $\beta$  y p53/Bax/caspasa-3. La AFP puede competir con el ácido transretinoico (ATRA) para unirse al receptor  $\beta$  del ácido retinoico (RAR- $\beta$ ), lo que promueve la expresión de Bcl-2 e inhibe la apoptosis. Además, la AFP puede inhibir la expresión del receptor de muerte 5 (DR5) y unirse a la caspasa-3, lo que da como resultado la inhibición de la apoptosis de las células tumorales inducida por el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). La AFP también puede promover la invasión y metástasis de las células del CHC mediante la regulación positiva de la expresión de la metaloproteinasas de matriz (MMP) 2/9, la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y el receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4), y la desactivación de AFP inhibe significativamente las capacidades de migración e invasión de las células de CHC<sup>110</sup>. En la **Figura 5** se esquematiza la implicación de AFP y AFPR en la carcinogénesis de las células.



**Figura 5.** Diagrama esquemático de la unión de alfa-fetoproteína (AFP) a los receptores de AFP (AFPR) que promueven la transformación maligna de las células de cáncer de hígado. Fuente: adaptado de Lin B et al. *Alpha-Fetoprotein Binding Mucin and Scavenger Receptors: An Available Bio-Target for Treating Cancer. Front Oncol. 2021 Feb 25;11:625936.*

Los AFPR aún no se han identificado claramente debido a su complejidad, estructura polimérica y composición de carbohidratos, pero según los informes de sus funciones en tumores, los AFPR pueden pertenecer a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), mucina (MUC), familias de receptores scavenger (SR) y otros receptores de superficie celular<sup>110</sup>.

Pese a todo lo explicado anteriormente, **la AFP es inadecuada para la detección precoz de CHC** a pesar de su implicación en la transformación tumoral hepatocitaria. Esto es porque los tumores de pequeño tamaño hasta en un 66% de los casos tienen una alfafetoproteína normal y la mayor parte de casos con concentraciones de AFP elevadas presentan tumores en estadio avanzado sin opción a tratamiento curativo<sup>111</sup>. Además, un 40% de los CHC avanzados presentan una alfafetoproteína normal<sup>112</sup>. También se ha demostrado que la AFP puede estar elevada en pacientes con hepatopatía crónica sin CHC<sup>109</sup>. Todo ello remarca la **escasa sensibilidad y especificidad** de este marcador. Por lo tanto, está demostrado que la AFP no es una herramienta de cribado eficaz para detección precoz de CHC y debe desaconsejarse su uso<sup>113</sup>. Sin embargo, en la práctica clínica habitual actual es el único biomarcador disponible para el diagnóstico de CHC.

En resumen, con la evidencia científica existente, actualmente el cribado de hepatocarcinoma se realiza mediante ecografía abdominal cada 6 meses. En nuestro país, se han comunicado porcentajes de adherencia al cribado bajos, oscilando entre el 43% y 50%<sup>114</sup>. Dado el impacto que tiene el cribado de CHC en la supervivencia de los pacientes, es importante insistir en la adherencia al cribado a los pacientes candidatos al mismo. Asimismo, es precisa la búsqueda de un biomarcador útil, accesible y no invasivo que facilite el diagnóstico precoz de CHC.

#### 2.1.6. PRESENTACIÓN CLÍNICA DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR

Existen muchos pacientes que no tienen **síntomas asociados al tumor**, especialmente aquellos que han estado en seguimiento regular en programa de cribado de CHC y este se detecta en un estadio precoz. Dado que la mayoría de los casos aparecen en el seno de una cirrosis hepática, los síntomas y hallazgos en la exploración física son debidos más a la cirrosis hepática subyacente que a la enfermedad tumoral *per se*. Así, con frecuencia se presenta como una **descompensación de su enfermedad cirrótica de base** (sangrado de varices o ascitis).

Pacientes en **estadios avanzados** pueden presentar **dolor** abdominal en hemiabdomen superior, **pérdida de peso, saciedad precoz o masa palpable** en hipocondrio derecho<sup>115</sup>.

Ocasionalmente, los pacientes con CHC pueden desarrollar **síndromes paraneoplásicos** que habitualmente se asocian a estadios avanzados y a un peor pronóstico: hipoglucemia, eritrocitosis, hipercalcemia, diarrea, manifestaciones cutáneas como dermatomiositis, pénfigo foliáceo, signo de Leser-Trélat (aparición súbita de múltiples queratosis seborreicas), pitiriasis rotunda, etc<sup>116,117</sup>.

Aunque no es lo más frecuente, también es posible el diagnóstico de CHC debido al **sangrado intraperitoneal** secundario a la rotura del tumor<sup>118</sup>, **ictericia obstructiva** secundaria a la invasión del árbol biliar o la compresión del conducto intrahepático, **fiebre** en relación a la necrosis central tumoral y absceso hepático piógeno, aunque esta última forma de presentación es muy rara<sup>119</sup>.

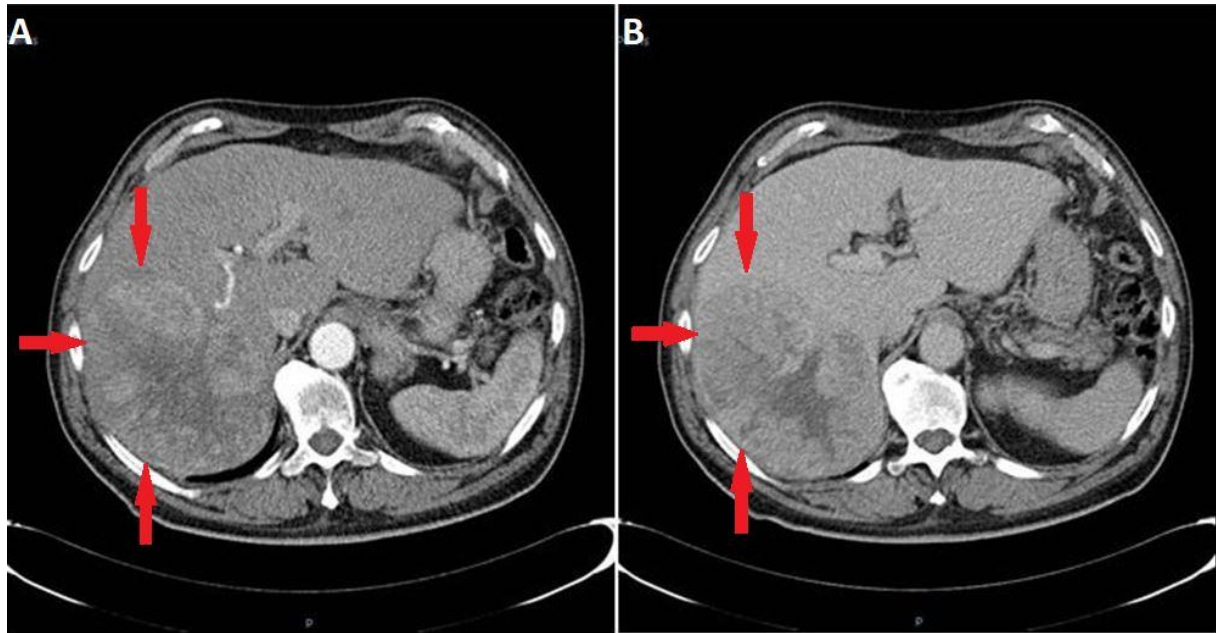
**El CHC es frecuentemente diagnosticado en estadios avanzados** debido a la ausencia de síntomas en estadios precoces y a la poca adhesión en determinados grupos de pacientes al programa de cribado (por ejemplo, los pacientes con cirrosis hepática alcohólica). En estos casos es más frecuente el diagnóstico de **metástasis extrahepáticas**, presentes en un 10-15% de los pacientes al diagnóstico<sup>120</sup>. Son más frecuentes en pacientes con tumores mayores a 5cm y con invasión vascular<sup>121</sup>. **La localización más frecuente de las metástasis extrahepáticas es, por este orden: pulmón, adenopatías intraabdominales, hueso<sup>122</sup> y glándula adrenal.** Las adenopatías perihepáticas no deben asumirse como metastásicas ya que en pacientes con cirrosis hepática secundaria a VHC y VHB es frecuente encontrar adenopatías benignas en la porta hepatis y el espacio portocava.

#### 2.1.7. DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

El diagnóstico de CHC puede resultar difícil. El **objetivo principal** es **detectar los tumores** cuando tienen un **tamaño inferior a 2 cm**, de forma que los pacientes tengan opciones de acceder a un tratamiento curativo y todas las opciones terapéuticas disponibles. La tasa de supervivencia a los 5 años de pacientes con tumores en estadio precoz que reciben tratamiento supera el 70%<sup>123</sup>.

En los pacientes afectados de cirrosis hepática, la probabilidad de que un nódulo de nueva aparición detectado mediante ecografía sea un CHC es muy elevada, especialmente si su diámetro excede los 10 mm<sup>124</sup>. Por tanto, si el nódulo detectado alcanza o supera este límite, es recomendable proseguir los estudios para llegar a un diagnóstico definitivo.

El CHC presenta una vascularización predominantemente arterial (neovascularización), así como una disminución progresiva de radicales portales a medida que avanza el proceso de hepatocarcinogénesis<sup>125</sup>, a diferencia del parénquima hepático en donde la vascularización es mixta: arterial y portal. Esto determina el **patrón vascular típico del CHC**, caracterizado por una **intensa captación de contraste en la fase arterial tardía, seguida de un lavado de la lesión en fases venosas (Figura 6)**. Esto se manifiesta en las técnicas de imagen por una mayor densidad/intensidad de señal de la lesión en la fase dinámica arterial tardía del estudio (washin) y una menor densidad/intensidad de señal de la lesión con respecto al parénquima hepático de vecindad en la fase portal y/o tardía (washout). Este patrón característico, favorecido por la alta probabilidad pre-test del CHC en pacientes con hepatopatía crónica, ha mostrado una especificidad próxima al 100% para el diagnóstico de CHC, cuando se ha correlacionado con el análisis anatomopatológico de explantes, piezas de resección quirúrgica o biopsias percutáneas<sup>124,126,127</sup>.



**Figura 6. Patrón vascular típico de CHC.** Lesión en lóbulo hepático derecho de 14 cm heterogénea y de bordes irregulares (flechas). En la **imagen A** (fase arterial tardía) se observa una mayor intensidad de señal de la lesión (washin) y en la **imagen B** (fase portal) una menor intensidad de señal de la lesión con respecto al parénquima hepático de vecindad (washout). Fuente: imagen consentida y cedida de paciente diagnosticado de CHC en Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada.

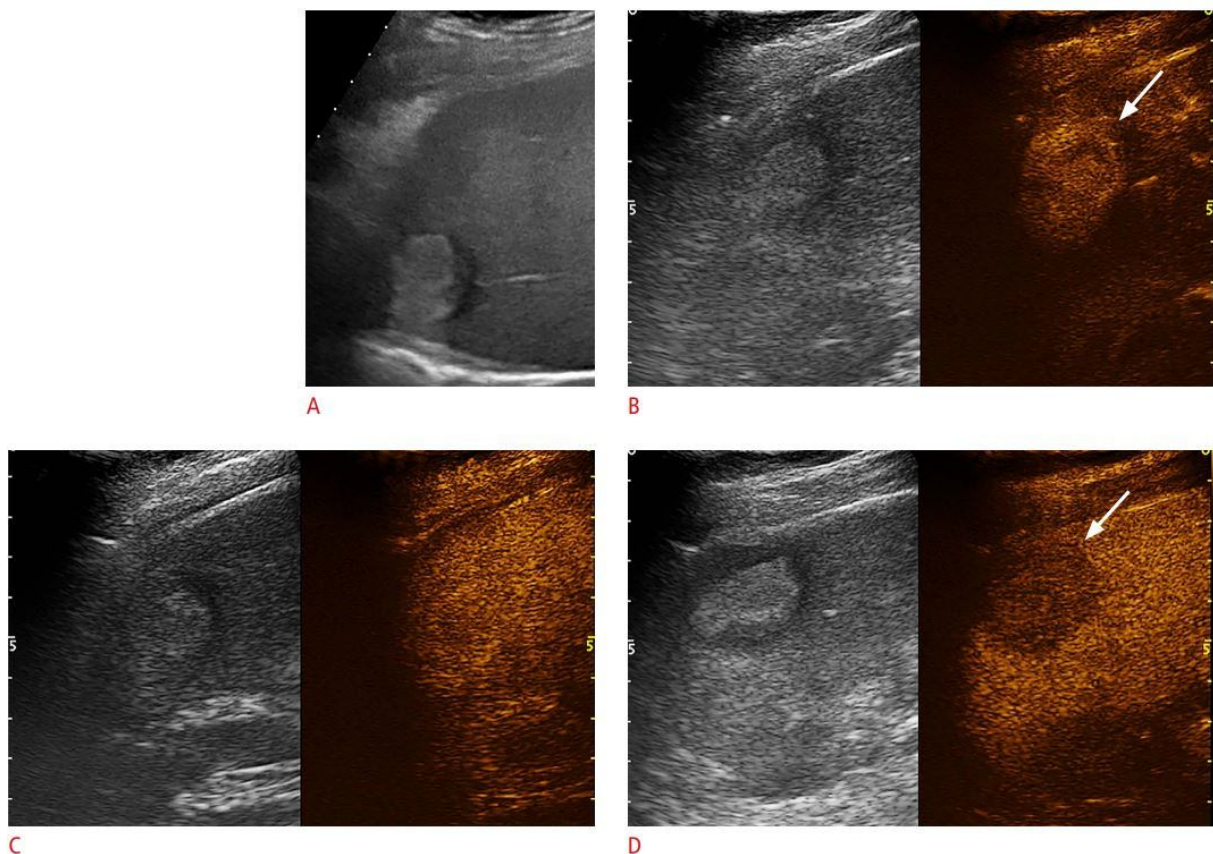
De esta forma, es posible **establecer el diagnóstico de CHC sin necesidad de confirmación histológica** cuando un nódulo de 1 cm de tamaño o más, detectado en un paciente con hepatopatía crónica, muestra en un estudio dinámico de imagen (TC o RM) intensa captación de contraste en fase arterial seguida de lavado en fase portal (y/o venosa si se trata de una TC o de una RM con contraste extracelular).

El **ácido gadoxético** es un **contraste combinado de RM**, con un componente extracelular que permite la adquisición de estudios en fases dinámicas, y un componente hepatobiliar que hace que los hepatocitos normofuncionantes capten el contraste en fase retardada<sup>128</sup>. Este contraste en particular es captado por las células muy precozmente, por lo que las imágenes obtenidas más allá de la fase dinámica portal no deben ser interpretadas como fases venosas tardías, ya que son en realidad fases transicionales con un componente mixto extracelular y hepatobiliar<sup>128</sup>. La RM con ácido gadoxético con la lectura del lavado venoso limitado a la fase dinámica portal para evitar posibles sobrediagnósticos es una técnica aceptada que puede ser empleada en el diagnóstico no invasivo del CHC. No obstante, la escasez de estudios prospectivos comparativos de su precisión diagnóstica con respecto a la RM obtenida con contraste extracelular hace que en el momento actual no se disponga de suficiente evidencia científica que apoye la recomendación de su uso como primera técnica diagnóstica, por delante de la RM con contraste extracelular<sup>90</sup>.

Cuando el patrón vascular de un nódulo es atípico en la TC o la RM, y no muestra hallazgos de imagen que sugieran que se pudiera tratar de un proceso maligno, se ha propuesto el uso de la **ecografía con contraste (CEUS)** como test de segunda línea en la última actualización



de las guías de la European Association for the Study of the Liver (EASL)<sup>129</sup>. El nivel de evidencia es moderado y el grado de recomendación es débil. La justificación para esta incorporación es el reciente refinamiento de los criterios ecográficos que favorece el diagnóstico diferencial entre CHC y colangiocarcinoma intrahepático (CCI). El patrón vascular del CHC en la CEUS sería la captación arterial homogénea de la lesión y un lavado lento y moderado, que se produce más allá de los 60 segundos después de la inyección del contraste (**Figura 7**), en contraposición con el CCI que mostraría captación arterial predominantemente periférica y lavado rápido e intenso. Estos nuevos criterios de la CEUS para el diagnóstico de CHC han sido adoptados por el American College of Radiology (ACR), que ha desarrollado los criterios CEUS–LIRADS versión 2017<sup>130</sup>, que están pendientes de validación prospectiva que permita conocer su precisión diagnóstica. Aunque en casos puntuales la CEUS puede ser de ayuda en estos momentos no hay evidencia científica suficiente que justifique su utilización rutinaria después de una TC o RM no diagnósticas. Por tanto, y en un intento de no demorar el diagnóstico, **cuando el patrón vascular de la lesión no es típico, la confirmación del diagnóstico de CHC debe basarse en la biopsia de tejido**<sup>90</sup>.



**Figura 7. Patrón vascular del CHC en la CEUS.** CHC en una mujer de 65 años con cirrosis hepática secundaria a hepatitis C. **Imagen A:** Plano basal subcostal derecho ascendente oblicuo que revela una lesión principalmente hiperecoica rodeada por un borde hipoeicoico periférico de 4 cm en el sexto segmento hepático. **Imagen B:** La lesión aparece marcadamente hipervascular durante la fase arterial (flecha). **Imagen C:** La lesión no es apreciable 83 segundos después de la inyección de hexafluoruro de azufre. **Imagen D:** Muestra un claro lavado a los 240 segundos (flecha). Fuente: Imagen del artículo Bartolotta TV et al. Contrast-enhanced ultrasound of hepatocellular carcinoma: where do we stand? *Ultrasonography*. 2019 Jul;38(3):200-214<sup>131</sup>.

Estos criterios no invasivos basados en la detección del patrón vascular específico de CHC han sido validados externamente en Europa<sup>124,127,132</sup>, Norteamérica<sup>133</sup> y Asia<sup>134</sup> y son solo aplicables en pacientes con cirrosis hepática establecida o bien en pacientes con infección por VHB de larga evolución adquirida en periodo perinatal/infancia. En el resto de los pacientes, es necesario un estudio anatomopatológico para obtener un diagnóstico definitivo de la lesión.

El ACR propuso en el año 2011 el **sistema LI-RADS (Liver Imaging Reporting and Data System)** para la lectura de las imágenes de TC y RM, con la finalidad de **estandarizar la interpretación de los informes de TC y RM hepática en pacientes con hepatopatía crónica**, y seguidamente establecer una recomendación clínica según el grado de sospecha de que la lesión detectada correspondiera a un CHC. La última actualización ha sido en 2018 y clasifica las observaciones en ocho grandes categorías: LR-NC (no categorizable), LR-1 (definitivamente benigno), LR-2 (probablemente benigno), LR-3 (probabilidad intermedia para CHC), LR-4 (probablemente CHC), LR-5 (definitivamente CHC), LR-TIV (lesiones con alta probabilidad de malignidad e invasión tumoral de la vena) y LR-M (lesiones con alta probabilidad de ser neoplasias malignas diferentes de CHC)<sup>135</sup>.

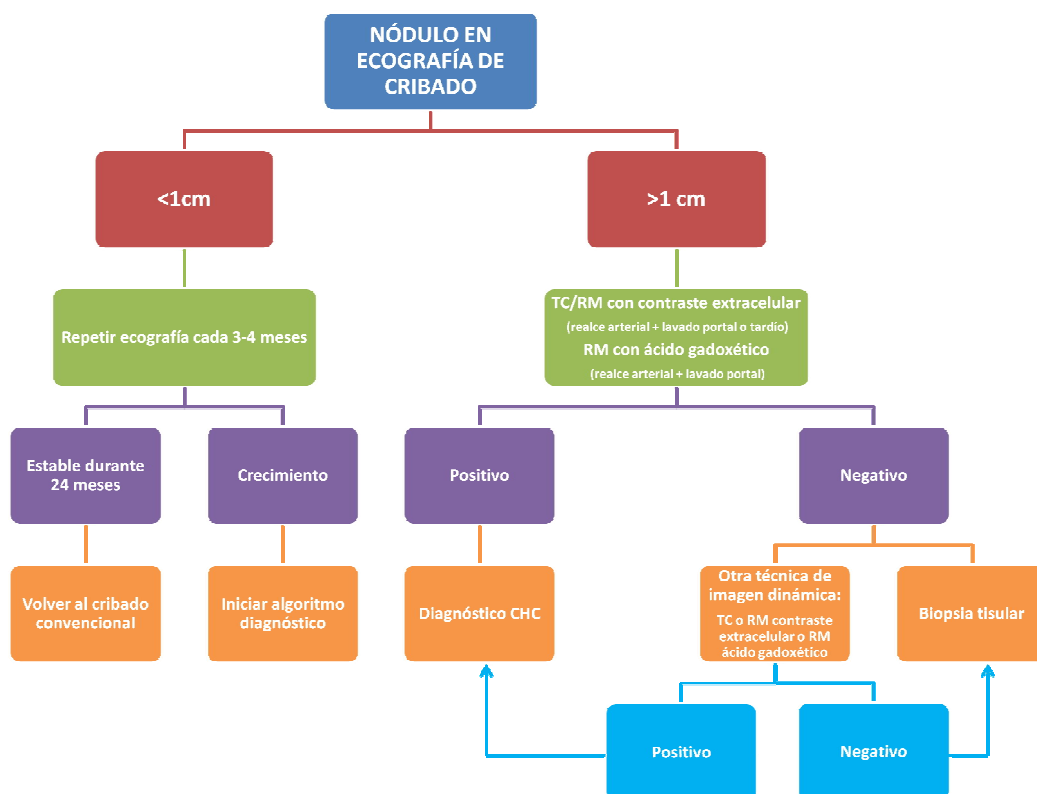
La lectura sistemática de los estudios de imagen según los criterios LI-RADS puede proporcionar una homogeneización de la lectura de los diferentes hallazgos y observaciones. No obstante, el impacto clínico de la correlación de las distintas categorizaciones con la toma de decisiones no está justificada, ya que las categorizaciones LR 2-4 tienen todas ellas un riesgo no despreciable de CHC, y por tanto, seguir controles evolutivos de la lesión en lugar de indicar una biopsia, podría conllevar una demora en el diagnóstico y con ello, un peor pronóstico de los pacientes<sup>90</sup>.

La **tomografía por emisión de positrones (PET)** con 18F-fluorodeoxiglucosa (18FDG) es de **bajo rendimiento** para el diagnóstico del CHC, especialmente en el caso de las lesiones bien diferenciadas de pequeño tamaño, que suelen ser PET-negativas. Otros radio-trazadores como la 11C-Colina, han mostrado resultados iniciales esperanzadores, pero no comparables con los de la TC o la RM<sup>136</sup>.

A pesar del perfeccionamiento de las técnicas de imagen, en un número relevante de casos es preciso realizar una punción del nódulo hepático para llegar al diagnóstico de CHC. Sin embargo, **el rendimiento diagnóstico de una biopsia en estos nódulos de pequeño tamaño no es óptimo, dado que existe una tasa de falsos negativos cercana al 30%**<sup>124</sup>. Ello puede depender de un error de muestreo y de la dificultad de realizar un diagnóstico diferencial entre nódulos displásicos y CHC muy iniciales mediante la escasa muestra obtenida a través de una biopsia percutánea<sup>125</sup>. Por tanto, **ante una biopsia negativa** no se puede descartar el diagnóstico de CHC y se debe **valorar la necesidad de obtener una nueva biopsia o bien realizar un seguimiento estrecho de la lesión**<sup>90,129,137</sup>.

Algunos autores han alertado sobre el **riesgo de diseminación local** tras punción de estos nódulos. Sin embargo, la incidencia de esta complicación es muy baja, **inferior al 0,1%**<sup>138,139</sup>, y siempre se debe valorar el riesgo asociado a la punción con el riesgo de aplicar tratamiento en pacientes sin CHC confirmado con criterios validados. Existe controversia sobre la recomendación de realizar biopsias para confirmación diagnóstica con la finalidad de obtener material histológico que permitan evaluar diferentes marcadores moleculares. Aunque es indiscutible la necesidad de obtener muestras para poder avanzar en el conocimiento de las vías moleculares asociadas al CHC, dado que las técnicas radiológicas permiten confirmar el diagnóstico de CHC en un relevante número de pacientes, la obtención sistemática de biopsias de tejido debería realizarse en el contexto de un proyecto de investigación con el consentimiento informado del paciente y la aceptación por parte de los comités éticos de cada centro<sup>90,129,140</sup>.

Finalmente, en el caso de **nódulos menores de 1 cm**, dada la baja probabilidad de que sea de naturaleza maligna<sup>124</sup> y la dificultad que supone su correcta caracterización, se recomienda realizar un seguimiento estrecho mediante una **ecografía cada 3-4 meses** con la finalidad de detectar su posible crecimiento, para entonces aplicar los criterios diagnósticos ya expuestos. Si tras dos años no se detecta crecimiento, se debe volver al cribado habitual cada seis meses<sup>90</sup>. El **algoritmo diagnóstico** y de seguimiento de lesiones en pacientes con cirrosis hepática se resume en la **Figura 8**.

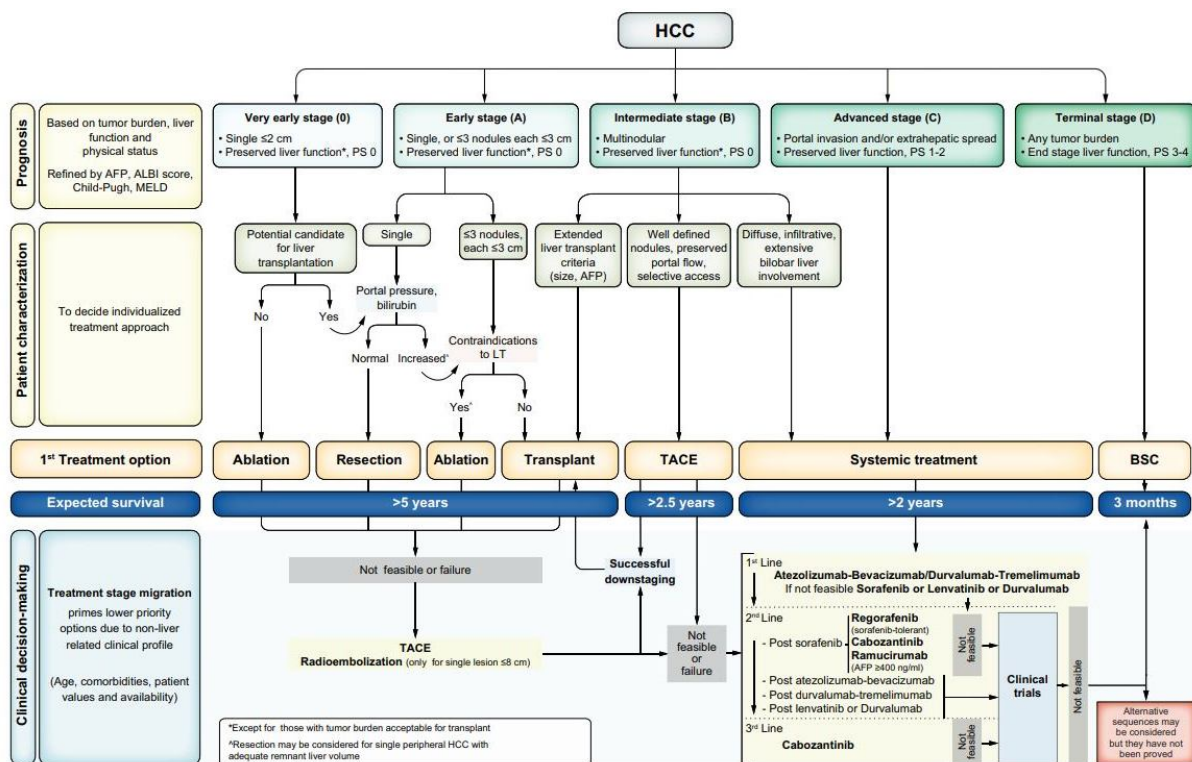


**Figura 8. Algoritmo diagnóstico de carcinoma hepatocelular durante el seguimiento mediante cribado en pacientes con cirrosis hepática o con hepatitis crónica VHB.** Fuente: adaptado de Reig M, et al. *Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update of the consensus document of the AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI, and SETH.* Med Clin (Barc). 2021 May 7;156(9):463.e1-463.e30<sup>90</sup>.

## 2.1.8. ESTADIFICACIÓN Y MANEJO TERAPEUTICO

En los últimos años han aparecido novedades importantes en el estadiaje y tratamiento del CHC que han permitido una mejora en el manejo de esta enfermedad. A pesar de que estos avances han cambiado completamente la historia natural de la enfermedad, existen aún muchas áreas en las que se precisan avances para poder mejorar.

El algoritmo terapéutico más utilizado en el mundo es el elaborado por el grupo **Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)**, del Hospital Clínic de Barcelona. Fue publicado por primera vez en 1999 y desde entonces ha tenido varias actualizaciones, la más reciente en 2022 (**Figura 9**):



**Figura 9. Algoritmo de hepatocarcinoma del grupo BCLC. Actualización 2022.** Fuente: Reig M et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. J Hepatol. 2022 Mar;76(3):681-693<sup>141</sup>.

Este algoritmo establece **5 estadios** que van **del 0 al D**. Para establecer el estadio al que pertenece cada paciente, se evalúan de forma individual factores pronósticos como la **carga tumoral, la función hepática y el estado general** del paciente.

### 2.1.8.1 Evaluación de la función hepática y el estado general

La evaluación de la **función hepática** es fundamental y se realiza a través del cálculo de diferentes escalas. Las más utilizadas son el Child Pugh score, ALBI score y MELD score que a continuación se explican.

La **clasificación de Child Pugh**<sup>142</sup> es un modelo pronóstico de enfermedad hepática que permite estratificar el riesgo quirúrgico y la gravedad de los pacientes con cirrosis hepática. Combina tanto parámetros de laboratorio: bilirrubina total, albúmina y el índice

internacional normalizado (o INR de su acrónimo en inglés International Normalized Ratio); como variables clínicas subjetivas: la presencia de encefalopatía hepática y ascitis. Cada criterio se puntúa del 1-3, siendo el número 3 el que indica el daño más grave, como se indica en la **Tabla 1**.

Variable	1 punto	2 puntos	3 puntos
<b>Bilirrubina (mg/dL)</b>	<2 *CEP / CBP <4	2-3 *CEP / CBP 4-10	>3 *CEP / CBP >10
<b>Albúmina sérica (g/L)</b>	>3,5	2,8-3,5	<2,8
<b>INR / actividad de protrombina</b>	<1,7 / >50%	1,8-2,3 / 30-50%	>2,3 <30%
<b>Ascitis</b>	Ausente	Leve	Moderada-Grave (Refractaria)
<b>Encefalopatía hepática</b>	Ausente	Grado I-II	Grado III-IV

**Tabla 1. Sistema de puntuación de la escala Child-Pugh.** CEP: Colangitis esclerosante primaria. CBP: Cirrosis biliar primaria. \*En la CEP y la CBP las referencias de bilirrubina se cambian para reflejar el hecho de que en estas enfermedades, lo característico es una elevación de la bilirrubina directa o conjugada. El límite superior para el primer punto es 4 mg/dl y el límite superior de los 2 puntos es 10 mg/dl. Fuente: adaptado de Ortiz Chimbo DS et al. *Introducción a las enfermedades hepáticas*. En: Rosales Zabal JM, editor. *Manual de Hepatología*. Primera edición. Sociedad Andaluza de Patología Digestiva; 2022. p. 10-17<sup>142</sup>.

Usando la sumatoria de puntos de la escala, se clasifica a los pacientes en las **clases A, B y C según Child Pugh (Tabla 2)**:

Puntos	Clase	Supervivencia al cabo de 1 año	Supervivencia al cabo de 2 años
<b>5-6</b>	A	100%	85%
<b>7-9</b>	B	81%	57%
<b>10-15</b>	C	45%	35%

**Tabla 2. Interpretación de resultados de la escala Child-Pugh<sup>142</sup>.**

La **puntuación de albúmina-bilirrubina (ALBI)<sup>143</sup>** es una medida simple y objetiva de la función hepática desarrollada recientemente y basada en los niveles séricos de albúmina y bilirrubina total para evaluar el pronóstico de pacientes con CHC, independientemente del grado de fibrosis subyacente.

Se calcula mediante una ecuación<sup>144</sup>:

$$\text{ALBI score} = (\log_{10} \text{bilirrubina } [\mu\text{mol/L}] \times 0,66) + (\text{albúmina } [\text{g/L}] \times -0,085)$$

Y los resultados se interpretan de la siguiente forma (**Tabla 3**):

ALBI score	Grado	Mediana de supervivencia
$\leq -2,60$	1	18,5-85,6 meses
$-2,60 < \text{ALBI score} \leq -1,39$	2	5,3-46,5 meses
$> -1,39$	3	2,3-15,5 meses

**Tabla 3: Interpretación de los resultados de la escala ALBI<sup>143</sup>.**

El **sistema MELD** del acrónimo inglés MELD, "**Model for End-stage Liver Disease**" está validado como un riguroso factor pronóstico a la hora de determinar la supervivencia en pacientes con enfermedad hepática avanzada y se utiliza para priorizar a los pacientes en lista de espera de trasplante hepático<sup>145</sup>. La puntuación MELD incorpora tres variables analíticas en una fórmula matemática logarítmica: creatinina, bilirrubina e INR; y abarca una puntuación total desde 6 a 40 puntos<sup>142</sup>.

$$\text{MELD Score} = 3,78 [\text{Log Bilirrubina mg/dL}] + 11,2 [\text{Log INR}] + 9,57 [\text{Log Creatinina mg/dL}] + 6,4$$

Hay que tener varias consideraciones: cuando cualquier valor sea inferior a 1, se reemplaza por 1 en la fórmula para evitar que existan puntuaciones menores que 0 y si los pacientes han sido dializados dos veces en los últimos 7 días, el valor de creatinina debería ser 4<sup>142</sup>.

La interpretación de la puntuación MELD indica (**Tabla 4**):

Valor	Probabilidad de mortalidad a los 3 meses
$\geq 40$	71.3%
30-39	52.6%
20-29	19.6%
10-19	6%
$< 9$	1.9%

**Tabla 4: Interpretación de los resultados del sistema MELD<sup>146</sup>.**

Otro factor fundamental a la hora de establecer el estadio de cada paciente es evaluar su estado general/funcional y su calidad de vida, concepto conocido como **Performance Status (PS)**. El PS habitualmente se evalúa según la **escala ECOG**.

La escala ECOG diseñada por el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de Estados Unidos y validada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se publicó en 1982 y es una

forma práctica de medir la calidad de vida de un paciente con cáncer cuyas expectativas de vida cambian en el transcurso de meses, semanas e incluso días.

La principal función de esta escala es objetivar la **calidad de vida** del paciente o PS. Valora la evolución de las capacidades del paciente en su vida diaria manteniendo al máximo su autonomía (**Tabla 5**). La escala ECOG se puntúa de 0 a 5 y sus valores son<sup>147</sup>:

<b>ECOG 0</b>	El paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.
<b>ECOG 1</b>	El paciente presenta síntomas que le impiden realizar trabajos arduos, aunque se desempeña normalmente en sus actividades cotidianas y en trabajos ligeros. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.
<b>ECOG 2</b>	El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.
<b>ECOG 3</b>	El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria como por ejemplo el vestirse.
<b>ECOG 4</b>	El paciente permanece encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria, como por ejemplo la higiene corporal, la movilización en la cama e incluso la alimentación.
<b>ECOG 5</b>	Fallecido

**Tabla 5: Interpretación de la escala ECOG<sup>147</sup>.**

Es importante resaltar en la evaluación del PS en el CHC que **se deben incorporar los síntomas relacionados con el tumor, pero no síntomas basales presentes antes del diagnóstico de cáncer relacionado con enfermedades y comorbilidades preexistentes<sup>141</sup>**. Esto puede ser difícil de diferenciar cuando el deterioro del PS está relacionado con la disfunción hepática, que puede o no estar relacionada con la carga tumoral.

### **2.1.8.2 Estadio BCLC-0**

Una vez realizada la valoración global del paciente en función de la carga tumoral, la función hepática y el PS, se clasifican en el **estadio muy precoz o estadio BCLC-0** aquellos pacientes con un **tumor único menor de 2cm sin invasión macrovascular ni extensión extrahepática, con función hepática preservada y sin síntomas atribuibles al tumor (ECOG-PS 0)**. En estos pacientes debemos evaluar si son potenciales candidatos a **trasplante hepático ortotópico (THO)**. En caso de no ser candidatos a THO (ya sea por edad avanzada o existencia de alguna otra contraindicación) serían candidatos a **ablación percutánea con radiofrecuencia**, que se ha asociado con una supervivencia similar a la **resección quirúrgica<sup>148,149,150</sup>**. Aquellos

pacientes que sí sean potenciales candidatos para THO, pero no presentan signos de hipertensión portal clínicamente significativa ni aumento de bilirrubina, serán evaluados para resección quirúrgica. Sin embargo, aquellos pacientes con signos de hipertensión portal o aumento de bilirrubina, deberán ser evaluados para THO. En este último caso se podría considerar la resección en aquellos tumores únicos periféricos con un volumen de remanente hepático adecuado. Patrones de anatomía patológica indicativos de riesgo aumentado de recurrencia como invasión vascular microscópica y satelitosis deben hacer considerar el trasplante debido al alto riesgo de recurrencia<sup>141</sup>.

### **2.1.8.3 Estadío BCLC-A**

En el **estadio precoz o estadio BCLC-A** se clasifican aquellos pacientes con un **tumor único, independientemente de su tamaño, o 3 nódulos todos menores de 3 cm, sin invasión macrovascular ni extensión extrahepática y sin síntomas relativos al tumor (ECOG-PS 0)**. La función hepática debe estar preservada y no haber alcanzado previamente al diagnóstico de CHC criterios de THO, debido a que el diagnóstico de CHC podría convertirse en un criterio de exclusión de THO si excede los criterios de inclusión o si el THO está contraindicado por factores no relacionados con el tumor, no habría alternativa terapéutica efectiva y deberían ser clasificados como BCLC-D<sup>141</sup>.

El enfoque de tratamiento para pacientes con BCLC-A varía según el número de tumores y el grado de deterioro de la función hepática.

En el caso de **tumores únicos**, es fundamental evaluar la presencia de **hipertensión portal clínicamente significativa**, definida por el gradiente de presión venoso central superior a 10 mmHg. Cuando existe hipertensión portal clínicamente significativa, se debe considerar **THO**. Ante la ausencia de hipertensión portal clínicamente significativa, debe plantearse la **resección quirúrgica**, considerando el tamaño tumoral, la localización y la presencia de factores predictores de recurrencia como invasión microvascular y presencia de lesiones satélite, características que harían considerar el THO si están presentes<sup>141</sup>.

En el caso de **tumores multifocales** que cumplan los **criterios de Milán (hasta 3 nódulos, todos menores o iguales a 3 cm)** se debe plantear el **trasplante**, dado el alto riesgo de recurrencia de la ablación y la resección quirúrgica en estos casos. Si el trasplante no es factible, se debate si el pronóstico de la ablación o la resección es mejor que el de la quimioembolización transarterial (TACE, transarterial chemoembolisation). Además, en la última actualización del algoritmo del BCLC 2022, también aparece la radioembolización transarterial (TARE) como alternativa a la TACE en tumores únicos menores o iguales a 8 cm, cuando no es factible la realización de THO (**ver apartado 1.8.7**). Se necesitan estudios prospectivos para definir qué opción terapéutica es la más adecuada en caso de contraindicación para THO<sup>141</sup>.



#### 2.1.8.4 Estadío BCLC-B

En el **estadío intermedio o BCLC-B** están incluidos pacientes con **CHC multifocal que exceda criterios de BCLC-A con función hepática preservada, ECOG-PS 0 y sin invasión vascular ni extrahepática**. Debido a que este grupo es muy heterogéneo, la versión de **BCLC 2022**<sup>141</sup> **estratifica el estadío BCLC-B en tres subgrupos**.

El **primer subgrupo** está compuesto por pacientes con nódulos bien definidos que podrían ser **candidatos a THO si cumplen criterios de THO extendidos**. En cuanto a los criterios ampliados para THO en CHC, los criterios compuestos que consideran la biología tumoral y la respuesta a los tratamientos neoadyuvantes reemplazarán los criterios morfológicos convencionales para definir la viabilidad del trasplante<sup>151</sup>. Por ejemplo, un adecuado **downstaging** (ver apartado 1.10) o buena respuesta al tratamiento locorregional y criterios de buen pronóstico biológico como **AFP inferior a 1.000 ng/dL**. Los niveles elevados de AFP predicen un alto riesgo de recidiva y por lo tanto, menor supervivencia. Actualmente el corte de 1.000 ng/dL se aplica como criterio de exclusión de THO en estos casos<sup>141</sup>.

En el **segundo subgrupo** se incluyen pacientes **sin criterios de THO pero con adecuado flujo portal y nódulos definidos, con accesibilidad a las arterias nutricias del tumor**. Estos pacientes son candidatos a **Quimioembolización Transarterial (QUETA)**<sup>141</sup>, más conocida por sus siglas en inglés **TACE (Transarterial Chemoembolization)**. Esta técnica consiste en la cateterización selectiva de la arteria hepática, y supraselectiva de arterias nutricias tumorales, y en la inyección de un agente quimioterápico conjuntamente con la oclusión del flujo arterial mediante una sustancia embolizante. Se considera contraindicada en pacientes con descompensación de la cirrosis y/o afectación multicéntrica de ambos lóbulos hepáticos que impidan una intervención selectiva, ausencia de flujo portal (trombosis o flujo hepatofugal), fístula arteriovenosa no tratable, anastomosis bilio-entérica o stent biliar y un aclaramiento de creatinina < 30 mL/min. Dentro del término TACE se incluyen **dos técnicas: TACE convencional (TACEc) y TACE con partículas precargadas (DEB-TACE)**. La TACEc consiste en inyectar intraarterialmente una emulsión viscosa formada por un quimioterápico (doxorubicina o cisplatino) mezclado con Lipiodol, seguida de la embolización del vaso aferente tumoral con partículas de alcohol polivinílico, poliacrilamida o esponja de gelatina. Como alternativa a la TACEc se desarrollaron las microesferas precargadas con fármacos (DEB-TACE) que consiguen una oclusión vascular simultánea a la administración del quimioterápico, lo que impide el lavado del mismo, reduciendo el paso a la circulación sistémica y minimizando los efectos secundarios. Las partículas están calibradas en diferentes tamaños y se seleccionan según la medida arterial y del tumor, incrementando la homogeneidad de la embolización.

El **tercer subgrupo del estadío BCLC-B** incluye **pacientes que no cumplen criterios extendidos de THO ni criterios de TACE y aquellos con nódulos difusos, infiltrativos o con afectación bilobar**. Estos pacientes serían candidatos a **tratamiento sistémico**<sup>141</sup> (sorafenib, atezolizumab-bevacizumab, etc).

### 2.1.8.5 Estadío BCLC-C

El estadío avanzado o estadío BCLC-C incluye **pacientes con invasión vascular o extensión extrahepática con ECOG-PS  $\leq 2$  y función hepática preservada**. Estos pacientes deben ser evaluados para recibir **tratamiento sistémico (Figura 10)**. Los fármacos utilizados actualmente en primera línea son **atezolizumab-bevacizumab, durvalumab-tremelimumab** y si no es factible, **sorafenib, lenvatinib o durvalumab** en monoterapia.

La combinación de **atezolizumab con bevacizumab** es actualmente la **primera elección** en tratamiento de **primera línea** y ha demostrado **mayor supervivencia comparado con sorafenib**, como se demuestra en la fase III del ensayo clínico IMbrave150 (NCT03434379)<sup>152</sup>. Los pacientes candidatos a atezolizumab-bevacizumab han de tener una cirrosis hepática compensada y ausencia de riesgo de hemorragia en gastroscopia, con varices esofágicas tratadas endoscópicamente y sin historia previa de sangrado variceal.

En la fase III del ensayo HIMALAYA (NCT03298451) se ha observado que una dosis de tremelimumab añadida a durvalumab aumenta significativamente la supervivencia frente a sorafenib y el durvalumab en monoterapia no es inferior a sorafenib en primera línea<sup>153</sup>.

Los fármacos utilizados en segunda línea tras progresión de la enfermedad o toxicidad a primera línea son: regorafenib (en pacientes que han tolerado sorafenib), cabozantinib (independientemente de la tolerancia a sorafenib) y ramucirumab si los niveles de AFP son mayores a 400 ng/dL independientemente de la tolerancia a sorafenib. Cabozantinib también es eficaz en tercera línea. Los pacientes que hayan recibido en primera línea atezolizumab-bevacizumab, durvalumab-tremelimumab, lenvatinib o durvalumab deberán entrar en ensayos clínicos en segunda línea<sup>141</sup>.



**Figura 10. Estrategia terapéutica en el tratamiento sistémico del CHC en estadio avanzado.** AFP: alfafetoproteína. Fuente: elaboración propia.

#### 2.1.8.6 Estadío BCLC-D

Finalmente, se clasifican en el **estadio terminal o BCLC-D** aquellos pacientes con **síntomas avanzados relacionados con el cáncer (ECOG-PS >2) y/o deterioro de la función hepática** sin opción a THO ya sea por la carga tumoral o no. En estos casos se debe realizar un **tratamiento sintomático y cuidados paliativos**<sup>141</sup>.

#### 2.1.8.7 Radioembolización transarterial (TARE)

Otro tratamiento disponible en la actualidad es la **radioembolización transarterial o TARE (Transarterial Radioembolization)**, también conocida como radioterapia interna selectiva. Consiste en la administración intraarterial selectiva de microesferas cargadas con un compuesto radiactivo, generalmente Itrio90, a través de un acceso percutáneo. El Itrio90 es un emisor  $\beta$  puro que se caracteriza por una vida media corta (64,2 h) y una penetración tisular limitada (promedio de 2,5 mm, máximo de 11 mm). A diferencia de otros tratamientos embolizantes como la TACE, la radioembolización no ejerce un efecto macroembólico: por lo tanto, tanto los beneficios como los efectos tóxicos del tratamiento dependen de la radiación transportada por las microesferas y no de ningún efecto isquémico. Entre sus desventajas mencionar que es una técnica compleja que requiere su realización en centros especializados y su alto coste<sup>154</sup>. Hasta el momento no ha demostrado superioridad en términos de supervivencia frente a la TACE, tampoco su combinación con terapia sistémica como sorafenib. Su uso se reserva como **alternativa a la TACE en tumores únicos menores o iguales a 8cm**<sup>141</sup>.

#### 2.1.9. PRONÓSTICO

De acuerdo con la propuesta del BCLC, la **supervivencia media** esperada en los pacientes con CHC es de más de 5 años, 2.5 años, 2 años y 3 meses para los estadios BCLC-0/A, BCLC-B, BCLC-C y BCLC-D, respectivamente (**Figura 9**)<sup>141</sup>.

La causa de muerte de los pacientes sometidos a **resección hepática** con intención curativa del CHC es la **recidiva (85%)**. Hasta un 20% de las muertes se deben a fallo hepático o a complicaciones de la hipertensión portal. Según varios estudios de la literatura, tras la resección hepática por CHC en pacientes en estadio BCLC 0 y A, la recurrencia del CHC a 1, 2, 3, 4 y 5 años es de 30, 52, 62, 69 y 79 %, respectivamente, y la supervivencia a 5 años es de 30-50 %<sup>155,156,157</sup>. Esto es debido a la presencia de metástasis intrahepáticas (recidivas verdaderas) o a la aparición de tumores *de novo*. Es por este motivo que cobra importancia la detección de **factores predictores de recurrencia temprana** como niveles de AFP de más de 1.000 ng/dL, resección no anatómica, invasión micro o macrovascular, márgenes de resección positivos, tumores poco diferenciados y presencia de lesiones satélite, características que harían considerar el THO si están presentes.

**Los pacientes sometidos a THO incrementan la supervivencia hasta un 60-80% con baja recurrencia tumoral (10-20%) a los 5 años.** La tasa de supervivencia al año es del 90% y del 75% a los 5 años en los pacientes que cumplen los criterios de Milán (tumor único o hasta 3 nódulos menores o iguales a 3 cm)<sup>158</sup>.

El **beneficio de la TACE** respecto a la supervivencia se basa en dos ensayos clínicos y un metaanálisis<sup>159,160,161</sup>, que demostraron que la TACE es superior respecto a placebo en pacientes con CHC intermedio (BCLC-B), obteniendo una **mediana de supervivencia** con el tratamiento de aproximadamente **20 meses**<sup>162</sup>. La modalidad de tratamiento que demostró este beneficio en la supervivencia fue la TACE convencional. Respecto a la DEB-TACE, se han publicado varios estudios sobre el beneficio del uso de las partículas precargadas. Un ensayo clínico multicéntrico comparó el uso de partículas DC Bead con doxorubicina (adriamicina) y TACE convencional con doxorubicina (adriamicina), y demostró que la TACE con microesferas fue menos hepatotóxica y tuvo menos efectos adversos sistémicos. Con la DEB-TACE con partículas precargadas se ha obtenido una respuesta radiológica objetiva cercana al 80%, aparentemente superior a la TACEc<sup>162</sup>. En pacientes bien seleccionados y con un tratamiento protocolizado usando estas esferas se han reportado medianas de supervivencia de entre 40-50 meses<sup>163,164</sup>.

En cuanto al **tratamiento sistémico**, el **sorafenib** demostró un **incremento** moderado pero **significativo de la supervivencia frente a placebo** en pacientes con buena función hepática (estudio SHARP [NCT00105443], 10,7 vs 7,9 meses<sup>165</sup>; y estudio Asia-Pacífico [NCT00492752], 6,5 vs 4,2 meses<sup>166</sup>). Los nuevos fármacos de terapia sistémica para el tratamiento de CHC se han comparado con sorafenib en términos de eficacia y supervivencia, ya que es el fármaco utilizado desde hace más tiempo. Son necesarios más estudios con estos nuevos fármacos para obtener conclusiones en términos de seguridad, pronóstico y supervivencia.

#### 2.1.10. CONCEPTOS DE DOWNSTAGING Y MIGRACIÓN TERAPÉUTICA

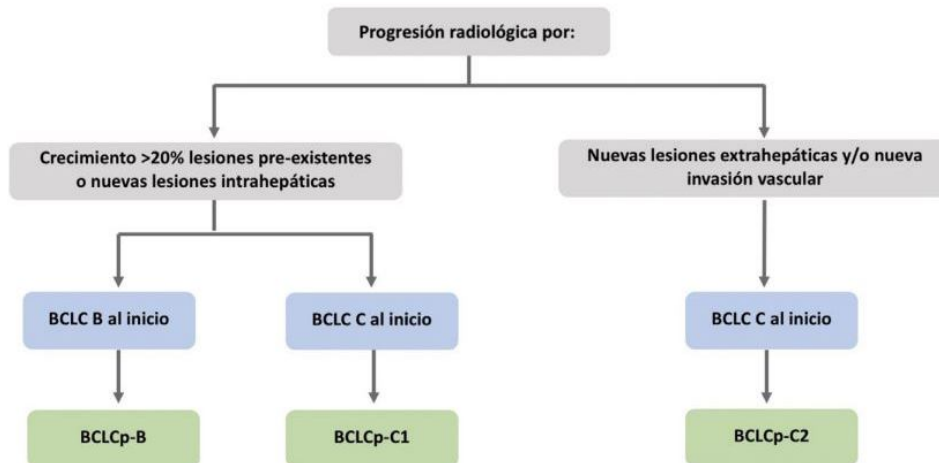
Se conoce como **“downstaging”** a la **respuesta favorable al tratamiento locorregional con una regresión estable de las lesiones hepáticas a los 6 meses**, cumpliendo los límites de los criterios de Milán en pacientes que previamente los excedían. El downstaging **identifica un subgrupo de candidatos a TOH** con resultados de supervivencia y recurrencia comparables a los criterios convencionales<sup>167,168</sup>.

Por otro lado, el concepto de **“migración terapéutica”** se aplica cuando un paciente por un motivo específico precisa un cambio en la recomendación terapéutica que precisaría por su BCLC basal, justificando así la **consideración de una terapia correspondiente a un estadio más avanzado**<sup>141</sup>. Por ejemplo, esto ocurre en pacientes con progresión intratable ya sea por fallo terapéutico o progresión con la terapia administrada, pero que aún se clasifican dentro de su estadio inicial BCLC. En estos pacientes se debe considerar una terapia correspondiente a un estadio más avanzado.

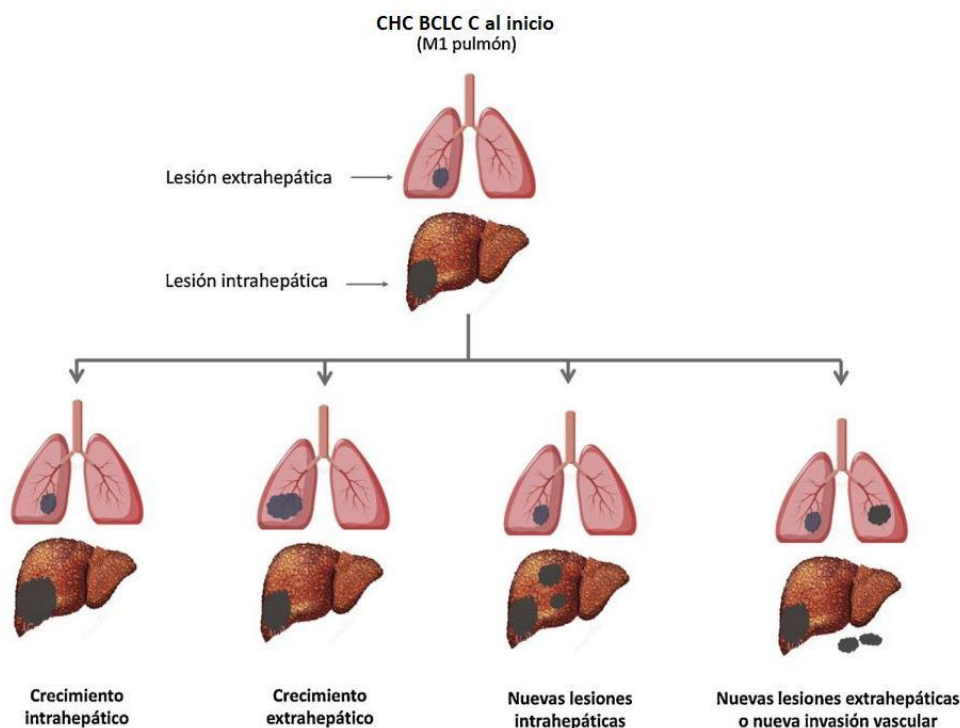
#### 2.1.11. PATRONES DE PROGRESIÓN

En el contexto de los pacientes con CHC avanzado en tratamiento con sorafenib se desarrolló una clasificación complementaria a la clasificación BCLC y que se denomina **BCLC al momento de la progresión**<sup>169</sup>. Esta clasificación es aplicable a los pacientes con CHC en

tratamiento sistémico que desarrollan progresión radiológica, pero mantienen el estado general y la función hepática conservada. **Los pacientes se clasifican según el estadio de BCLC basal (Figura 9) y el patrón de progresión radiológica (Figuras 11 y 12)**<sup>90</sup>. Los pacientes que comienzan un tratamiento sistémico en estadio BCLC-B y desarrollan nuevas lesiones dentro del hígado se denominan BCLCp-B; aquellos que comienzan el tratamiento sistémico en estadio BCLC-C y desarrollan nuevas lesiones dentro del hígado o crecen las lesiones preexistentes independientemente de la localización se denominan BCLCp-C1 y finalmente, aquellos pacientes que desarrollan nuevas lesiones fuera del hígado, independientemente del estadio de BCLC basal se denominan BCLC-C2.



**Figura 11: Clasificación BCLC según la progresión radiológica.** Fuente: Reig M et al. *Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update of the consensus document of the AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI, and SETH. Med Clin (Barc).* 2021 May 7;156(9):463.e1-463.e30<sup>90</sup>.



**Figura 12: Patrones de progresión del carcinoma hepatocelular.** Fuente: adaptado de Reig M et al. *Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update of the consensus document of the AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI, and SETH. Med Clin (Barc).* 2021 May 7;156(9):463.e1-463.e30<sup>90</sup>.

## 2.2. BIOPSIA LÍQUIDA

### 2.2.1. CONCEPTO DE BIOPSIA LÍQUIDA

La Sociedad Internacional de Biopsia Líquida (ISLB por sus siglas en inglés), creada en Granada en 2017, define la **biopsia líquida** como un **test mínimamente invasivo** que se realiza **utilizando un fluido corporal** (sangre, orina, semen, líquido cefalorraquídeo) y que permite la **detección de biomarcadores celulares o moleculares** con el fin de **obtener información diagnóstica, pronóstica o predictiva** de una enfermedad<sup>170</sup>.

El crecimiento y desarrollo de la biopsia líquida ha sido exponencial en los últimos años, existiendo actualmente una gran cantidad de trabajos científicos acerca de la biopsia líquida en casi todos los tipos de tumores sólidos. En nuestro caso, la enfermedad sobre la que se aplica es el carcinoma hepatocelular (CHC), pero no es un concepto limitado a la oncología como se ha demostrado en varios trabajos recientes<sup>171,172</sup>.

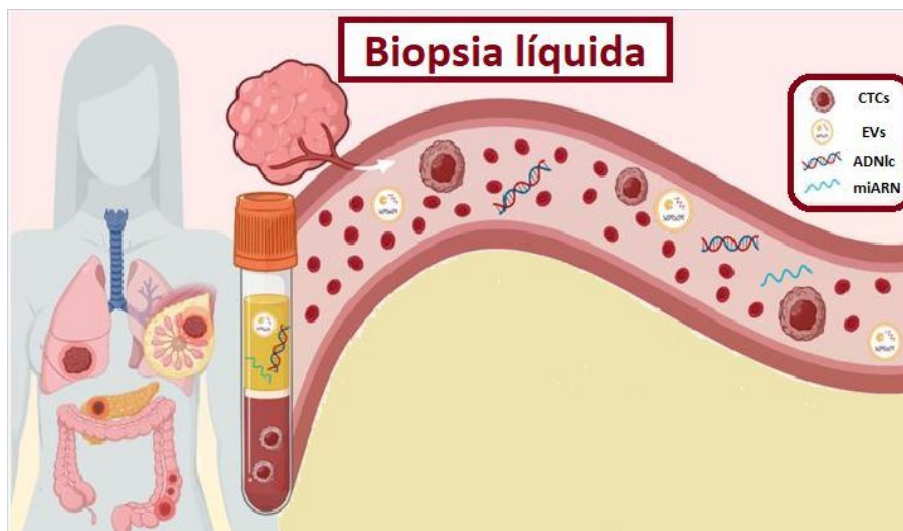
### 2.2.2. TIPOS DE BIOPSIA LÍQUIDA

Existen distintos tipos de biopsia líquida (**Figura 13**):

- **Células tumorales Circulantes (CTCs):** las CTCs fueron descritas por primera vez por el profesor Ashworth en 1869<sup>173</sup>. **Son células que se desprenden del tumor primario y que se someten al proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, ver el apartado 2.4) para entrar en la circulación sanguínea y linfática**, pudiendo así desarrollar tumores secundarios y metástasis a distancia<sup>174,175</sup>. Las CTCs están presentes en la sangre periférica de los pacientes con cáncer y se han estudiado en diversos tipos de tumores como: cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, CHC, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, etc<sup>176</sup>. Se han desarrollado diferentes métodos de aislamiento y detección de CTCs que se describen y desarrollan en el apartado 2.6.
- **ADN tumoral circulante (ADNtc): fragmentos de ADN que se desprenden de las células tumorales a medida que se destruyen y que se encuentran en el torrente sanguíneo.** El ADNtc comprende una parte del ADN libre circulante (ADNlc), que también incluye ADN originado de otras fuentes celulares, principalmente ADN resultante de la muerte de células hematopoyéticas<sup>177</sup>. Es importante distinguir el ADNtc del total de ADNlc, para lo cual se debe demostrar la existencia de mutaciones específicas del tumor. Además, la fracción de ADNtc en plasma es muy variable, desde un valor <0,01% hasta constituir la mayor parte del ADNlc plasmático total<sup>177</sup>. La vida media del ADNtc en plasma es muy corta, estimada en < 2 horas, por lo tanto, los niveles de ADNtc en plasma están sujetos a cambios dinámicos<sup>177</sup>.
- **MicroARN (miARN): pequeños fragmentos de ARN reguladores no codificantes** con tamaño de 17 a 25 nucleótidos, **capaces de modificar la expresión genética a nivel pos-transcripcional**. Su estudio es complejo, ya que se sabe que un mismo microARN puede tener función pro y antitumoral dependiendo del contexto del tipo celular<sup>178</sup>.

Son difíciles de estudiar porque pueden viajar libres en la sangre o dentro de vesículas extracelulares y no existen protocolos estandarizados para su estudio. Además, existen dificultades técnicas para medir sus niveles de expresión. En los últimos años su estudio ha cobrado importancia ya que pueden ser una herramienta clínica complementaria para el diagnóstico y pronóstico de distintas enfermedades, como se describe en el artículo de Rodríguez-Martínez et al, basado en la utilidad de los miARN en el cáncer de mama<sup>179</sup>. Este punto se desarrolla en el apartado 2.10 sobre el miR-122-5p.

- **Vesículas extracelulares (EVs):** poblaciones heterogéneas de **vesículas con membrana bicapa lipídica** que varían en tamaño de 30 a 10.000 nm de diámetro, se producen de forma natural y son liberadas por todos los tipos de células. **Destaca su función en la comunicación intercelular, principalmente a través de su capacidad para transferir contenido biológico (proteínas, lípidos o ácidos nucleicos), a las células receptoras.** Desempeñan un papel importante en la regulación de procesos fisiológicos como la reparación de tejidos, el mantenimiento de las células madre y la coagulación. En los procesos fisiopatológicos, han adquirido un papel importante en la investigación contra el cáncer<sup>180</sup>. Dentro de las vesículas extracelulares, destacan los exosomas. Son vesículas extracelulares que transportan cargas moleculares de células donantes a células receptoras y que desempeñan un papel crucial en la mediación de la comunicación intercelular. Grandes cantidades de exosomas enriquecen los fluidos corporales y están involucrados en numerosos procesos fisiológicos y patológicos lo que lo convierte en un marcador adecuado para la biopsia líquida<sup>181</sup>.



**Figura 13. Tipos de biopsia líquida.** La biopsia líquida obtenida de la sangre periférica contiene diferentes componentes tumorales como células tumorales circulantes (CTCs), ADN libre circulante (ADNlc), vesículas extracelulares (EVs) y microARN (miARN). Estos elementos se pueden aislar para identificar diferentes alteraciones genéticas específicas para un tumor, por ejemplo: mutaciones puntuales, variaciones en el número de copias, reordenamientos estructurales o patrones epigenéticos. Fuente: adaptado de Palacín-Aliana I et al. *Clinical Utility of Liquid Biopsy-Based Actionable Mutations Detected via ddPCR*. *Biomedicines*. 2021 Jul 28;9(8):906<sup>182</sup>.

### 2.2.3. VENTAJAS Y APLICACIONES DE LA BIOPSIA LÍQUIDA

La biopsia líquida tiene múltiples ventajas sobre la biopsia tisular (**Tabla 6**)<sup>183</sup>. Destaca que las **muestras son fáciles de obtener**, de forma **mínimamente invasiva**<sup>184</sup>. Esto permite obtener resultados en poco tiempo y de forma repetida. También permite obtener muestras de localizaciones inaccesibles o en pacientes que por su fragilidad o comorbilidad no pueden someterse a determinados procedimientos, siendo la biopsia líquida una opción más conservadora.

Otra ventaja es que permite la **monitorización en tiempo real de las alteraciones genéticas y moleculares** que van aconteciendo a lo largo de la enfermedad del paciente. Nos permite realizar el análisis molecular del tumor a lo largo del tiempo, detectando los posibles cambios y mutaciones que pueda sufrir<sup>185</sup>. Esta caracterización más profunda del perfil biológico tumoral del paciente nos lleva a la **medicina de precisión**, el objetivo actual en Oncología. Así, en función de esta información molecular, se puede estratificar a los pacientes en función de su pronóstico y establecer el tratamiento más adecuado.

También permite realizar **cribado de una enfermedad en pacientes con alto riesgo** de desarrollarla y estratificar a los pacientes según su riesgo. Puede resultar útil para establecer un diagnóstico temprano, orientar terapéuticamente, realizar el seguimiento de respuesta a una terapia, detectar enfermedad mínima residual y predecir recaídas... en definitiva, la biopsia líquida tiene un gran **valor pronóstico**<sup>186</sup>.

Biopsia líquida	Biopsia tisular
Mínimamente invasiva	Invasiva
Más rápida	Menos rápida
Repetible	Difícil de repetir
Alta sensibilidad	Menor sensibilidad
Menor coste en aislamiento de muestras	Mayor coste en aislamiento de muestras
Sin validación clínica	Validada clínicamente (Gold standard)
Sin evaluación histológica	Permite evaluación histológica
Monitorización del tumor en el tiempo	Imposibilidad de evaluar evolución tumoral
Monitorización en tiempo real de respuesta al tratamiento	Imposibilidad de evaluar respuesta en tiempo real a tratamiento
Demuestra la heterogeneidad tumoral	No demuestra la heterogeneidad tumoral

**Tabla 6. Comparación entre biopsia líquida y biopsia tisular.** Fuente: adaptado de *Underwood JJ et al. Liquid biopsy for cancer: review and implications for the Radiologist. Radiology 2020 294:1, 5-17*<sup>183</sup>.



En el caso concreto del **CHC**, el diagnóstico en cirróticos se establece en pruebas de imagen dinámica (TC o RM). **La ausencia de biopsia tisular hace que se disponga de pocas muestras de tumor.** Además, cuando los pacientes con CHC son operados y se realiza resección o trasplante, suelen haber recibido previamente tratamientos locorregionales como radiofrecuencia o quimioembolización. Esto **complica el estudio de la biología molecular** del tumor y la detección de nuevos marcadores pronósticos y dianas terapéuticas. Por este motivo, **es interesante el estudio de la biopsia líquida en el CHC, ya que es una forma no invasiva y segura de obtener muestras seriadas del paciente para su diagnóstico y seguimiento.** La detección de CTCs podría cambiar por completo el manejo clínico de los pacientes con CHC, permitiendo un diagnóstico precoz<sup>187</sup>, evaluación pronóstica<sup>186,187,188</sup> y tratamiento<sup>188</sup> de manera individualizada.

#### 2.2.4. PROCESO DE DISEMINACIÓN TUMORAL

El **proceso de diseminación tumoral** o la capacidad de las células tumorales de desprenderse del tumor primario y colonizar otros órganos, es una de las principales características de los tumores con **capacidad invasiva**. Las células de los tumores malignos tienen capacidad de diseminarse por vía sanguínea y/o linfática y anidar en otros órganos desarrollando tumores secundarios. Este proceso, denominado **metástasis**, supone la principal causa de muerte debida al cáncer<sup>189</sup>.

El proceso metastásico puede ocurrir desde estadios muy tempranos del desarrollo del tumor, pudiendo desembocar posteriormente en el establecimiento de nuevos focos tumorales originando así la enfermedad metastásica<sup>190</sup> (en el caso del CHC, pueden ser nuevos focos intrahepáticos o a distancia).

Para el estudio de la biopsia líquida es fundamental comprender el proceso de diseminación tumoral y **transición epitelio-mesénquima (EMT)**.

**La EMT inicia el proceso de metástasis.** En la EMT las células epiteliales pierden su organización polarizada y adquieren **capacidades migratorias e invasivas**. Para que ocurra la invasión la mayoría de las células tumorales que se originan a partir de tumores sólidos deben someterse a EMT para perder la adhesión célula a célula y adquirir motilidad<sup>191</sup>. Por lo tanto, la EMT ha sido reconocida como un evento celular prometastásico que promueve la invasión de las células tumorales y la progresión de tumores malignos. Los resultados experimentales observados en el CHC respaldan la idea de que la EMT desempeña un papel fundamental en la metástasis del CHC<sup>191</sup>. La **pérdida de E-cadherina**, un marcador típico de las células epiteliales, es una de las características clave del proceso de EMT y se ha visto implicada en la metástasis tumoral<sup>192</sup>. Existen una serie de factores de transcripción represores directos de la E-cadherina, incluida la  **$\beta$ -catenina**, un componente clave de la vía de señalización canónica de Wnt<sup>191</sup>. Curiosamente, la  $\beta$ -catenina es una proteína de doble función que está implicada en la regulación transcripcional y en la adhesión célula a célula. En las células epiteliales normales, la mayor parte de la  $\beta$ -catenina forma un complejo de adhesión con la E-cadherina y se localiza en las uniones adherentes célula-célula en la

membrana. En las células tumorales, una porción de la  $\beta$ -catenina se separa del complejo y se traslada al núcleo para realizar su función reguladora de la transcripción. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales la  $\beta$ -catenina se separa del complejo de membrana E-cadherina/ $\beta$ -catenina y se traslada al núcleo siguen siendo en gran parte desconocidos<sup>191</sup>.

Una vez que las **células tumorales migran a los vasos sanguíneos**, se convierten en **células tumorales circulantes (CTCs)**<sup>193</sup>. El estudio de Qi et al. reveló que un recuento de CTCs >16 y un porcentaje de CTCs mesenquimales  $\geq 2\%$  antes de la resección de CHC se asociaron significativamente a la aparición de recurrencia tumoral temprana, recidiva intrahepática multinodular y metástasis pulmonares<sup>194</sup>. En la monitorización postoperatoria de CTCs en 10 pacientes se encontró que la mayoría tenía un mayor recuento de CTCs y mayor porcentaje de CTCs mesenquimales antes de que apareciera la recurrencia nodular clínicamente detectable<sup>194</sup>. Sin embargo, la heterogeneidad espacial de las características fenotípicas y moleculares de las CTCs dentro del sistema circulatorio sigue sin estar clara. El estudio de Sun et al. se realizó en 73 pacientes con CHC localizado. Se extrajo sangre de vena periférica, arteria periférica, venas hepáticas, vena cava inferior infrahepática y vena porta, antes de la resección del tumor. Los resultados demostraron que el estado de EMT de las CTCs era heterogéneo en los diferentes compartimentos vasculares<sup>195</sup>. Las CTCs eran predominantemente epiteliales en el momento de la liberación pero cambiaron a fenotipo mesenquimal durante el tránsito hematógeno a través de las vías de señalización relacionadas con Smad2 y  $\beta$ -catenina<sup>195</sup>. La activación del proceso de EMT en el tumor primario se correlacionó con el número total de CTCs en la vena hepática, en lugar de subconjuntos de CTCs epiteliales o mesenquimales. El análisis de seguimiento sugirió que las CTCs y la carga de microémbolos tumorales circulantes en las venas hepáticas y la circulación periférica pronostican la aparición de metástasis pulmonar postoperatoria y la recurrencia intrahepática, respectivamente<sup>195</sup>.

### 2.2.5. INTERCEPCIÓN DE CÁNCER

Actualmente, solo la mitad de los pacientes que desarrollan cáncer se pueden curar<sup>172</sup>. Esto es debido que en muchas ocasiones el diagnóstico se realiza en estadios avanzados. A pesar de que el diagnóstico y tratamiento del cáncer ha mejorado, es necesario establecer estrategias para prevenir el cáncer y diagnosticarlo en estadios tempranos, incluso pretumorales. El concepto de **“intercepción de cáncer”** nace de esta premisa y fue acuñado por Elisabeth H. Blackburn en 2011<sup>196</sup>.

La intercepción del cáncer es una necesidad históricamente insatisfecha limitada por los escasos avances tecnológicos. Sin embargo, en los últimos años las nuevas tecnologías basadas en biopsia líquida para analizar células premalignas circulantes y ADN libre circulante, se están utilizando para estudiar cómo anticiparse a la enfermedad<sup>172</sup>.

Es preciso distinguir entre intercepción del cáncer e intercepción de la metástasis. La **intercepción del cáncer** implica la identificación de individuos en riesgo de desarrollar cáncer por tener un perfil biológico específico, así como el desarrollo de tratamientos de

medicina dirigida y personalizada<sup>172</sup>. Por otro lado, la **intercepción de la metástasis** consiste en identificar aquellos pacientes con cáncer y riesgo de desarrollar metástasis con la intención de prevenir la diseminación tumoral a distancia<sup>172</sup>.

Los esfuerzos en investigación se han centrado en la forma de interceptar la metástasis durante décadas, pero hoy día sabemos que una vez la enfermedad es metastásica, la probabilidad de cura disminuye drásticamente<sup>197</sup>. Es por ello que la tendencia actual es la detección de pacientes con riesgo de desarrollar cáncer y su estratificación, para poder ofrecer tratamientos personalizados e individualizados en función del riesgo de cada paciente. Actualmente, es posible la detección de cáncer en estadios tempranos basándonos en el uso de biopsia líquida, lo que está ayudando a desarrollar la intercepción del cáncer. Esto se ha demostrado en diferentes tumores sólidos como el cáncer de pulmón, especialmente en cáncer de pulmón de células no pequeñas<sup>198</sup>, cáncer de mama<sup>199</sup>, cáncer colorrectal<sup>200</sup> y cáncer renal<sup>201</sup>, entre otros.

#### 2.2.6. TÉCNICAS DE ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE CTCs

El análisis de CTCs en sangre periférica requiere 3 pasos generales:

**1º Fase inicial preparatoria o preanalítica:** centrifugación, lavado y/o adición de conservadores celulares que evitan la entrada de las CTCs en apoptosis en 72-96 horas.

**2º Fase de enriquecimiento o aislamiento celular:** en los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas de aislamiento de CTCs basándose en sus propiedades biológicas o físicas. Las **técnicas biológicas (dependientes de marcador)** se basan en la unión antígeno-anticuerpo utilizando anticuerpos contra biomarcadores tumor-específicos. Las **técnicas físicas (independientes de marcador)** dependen de las propiedades físicas de las CTCs como son el tamaño, la densidad, la carga eléctrica, la capacidad migratoria y la deformabilidad de las células<sup>188</sup>. Las diferentes técnicas de aislamiento de CTCs se comentan más detalladamente a continuación en este mismo apartado (**ver punto 2.6.1**).

**3º Fase de identificación y caracterización celular:** tras el aislamiento, la identificación y caracterización celular se basa en distintas técnicas sobre las proteínas y/o ácidos nucleicos de las CTCs para demostrar su origen y estudiar las diferentes moléculas que se deseen investigar (**ver punto 2.6.2**).

El principal reto en la detección de **CTCs** en sangre periférica radica en que su **presencia es extremadamente baja** (1 célula tumoral epitelial entre  $10^5$ - $10^6$  células hematopoyéticas). Tras identificarlas como **células epiteliales** (lo que se explica a continuación), el segundo reto consiste en demostrar que se han originado en el órgano que estamos estudiando para evitar falsos positivos (en nuestro caso, demostrar su origen hepático).

Como se ha comentado anteriormente, durante la última década han surgido diferentes **plataformas de aislamiento de CTCs**, que con sus particularidades propias, todas cuentan

con un enfoque clínico, rápido, altamente sensible, selectivo, específico y mínimamente invasivo<sup>202</sup>.

### **2.2.6.1. Técnicas de enriquecimiento y aislamiento celular**

#### **2.2.6.1.1. Técnicas biológicas dependientes de marcador**

El enfoque más empleado para el aislamiento de CTCs es utilizar **marcadores inmunológicos**, por ejemplo, anticuerpos para unirse selectivamente a antígenos celulares. Las células tumorales expresan marcadores de superficie celular diferentes a las células sanguíneas y, por lo tanto, se pueden separar de las células del sistema circulatorio. Más específicamente, **las CTCs expresan marcadores epiteliales** como moléculas de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y citoqueratina (CK) en grados variables, pero no CD45, un marcador diferencial de células hematopoyéticas<sup>202</sup>. Los anticuerpos pueden conjugarse con nanopartículas magnéticas o inmovilizarse en las paredes de chips microfluídicos para la captura de CTCs (**selección positiva de CTCs** a través de marcadores epiteliales) o utilizando marcadores sanguíneos (**selección negativa**). Este enfoque también se denomina **aislamiento basado en afinidad**<sup>202</sup> y es el más utilizado.

**EpCAM** es una **glicoproteína transmembrana** conocida principalmente por mediar en los contactos de células homotípicas en los tejidos epiteliales. Debido a que la expresión de EpCAM se limita a los epitelios normales y malignos, se ha utilizado como marcador diagnóstico para la detección de células de carcinoma en órganos mesenquimales como la sangre, la médula ósea o los ganglios linfáticos<sup>203</sup>. Sin embargo, esta proteína está presente en algunos tejidos sanos como células de origen hematopoyético y se ha demostrado que **durante el proceso de EMT tiene una regulación a la baja, en la que muchas células pierden la expresión de EpCAM**<sup>203</sup>. Por estos motivos, para algunos autores no es un marcador perfecto debido a la deficiencia obvia de que la detección de CTCs basada en EpCAM podría pasar por alto las CTCs que se han sometido a EMT, especialmente, en tumores en estadios avanzados<sup>204</sup>.

En un esfuerzo por superar estos inconvenientes, se han utilizado otros marcadores epiteliales concomitantes como las CK<sup>203</sup>, cuya utilidad ha sido demostrada en numerosas publicaciones<sup>204,205,206</sup>. Las **CK** son los marcadores epiteliales utilizados en nuestro trabajo. Son componentes integrales del **citoesqueleto** de las células epiteliales normales y tumorales, concretamente, forman los **filamentos intermedios**<sup>207</sup>. Por lo tanto, tienen una localización citoplasmática. **Son elegidas como criterio de identificación de células tumorales epiteliales localizadas en tejidos hematopoyéticos, porque las células sanguíneas no las expresan**<sup>207</sup>.

Entre las **plataformas comercializadas** dependientes de marcador destacan:

- **CellSearch® (Janssen Diagnostics)**: es la plataforma de aislamiento, cuantificación y caracterización celular comercializada más utilizada y la única aprobada por la FDA.

Se trata de un sistema semiautomático que utiliza perlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo de EpCAM para la detección de células EpCAM<sup>+</sup><sup>208,209</sup>.

- **IsoFlux™ (Fluxion):** es un sistema semiautomático que combina el uso de canales microfluídicos con control de flujo con la tecnología de perlas inmunomagnéticas para aislar las CTCs<sup>210</sup>.
- **MACS® (Miltenyi Biotec):** a diferencia de los anteriores, es un sistema manual. Permite el enriquecimiento inmunomagnético de CTCs a través de anticuerpos contra marcadores de superficie celular o por un anticuerpo anti-pan CK intracelular<sup>211,212</sup>.

#### 2.2.6.1.2. Técnicas físicas independientes de marcador

Dado que las CTCs expresan EpCAM y CK en diferentes grados, y algunas muestran una completa regulación a la baja de estas proteínas, se han desarrollado y probado estrategias alternativas para aislar y enumerar las CTCs en función de sus propiedades biofísicas. Estas plataformas discriminan CTCs en función de características físicas como el tamaño, la densidad, la deformabilidad y las propiedades eléctricas de las células<sup>202</sup>.

Para ello, se han desarrollado técnicas de separación en función del tamaño y deformabilidad celular, como la detección basada en la **filtración**, técnicas basadas en gradientes de densidad como la **centrifugación** y técnicas basadas en la separación según la diferente polarización de las partículas celulares como la **dielectroforesis**.

En la **Tabla 7** se resumen las ventajas y desventajas de las técnicas de aislamiento de CTCs según las propiedades físicas de las células y se indican algunos ejemplos de sistemas que funcionan mediante estas técnicas.

Método	Ventajas	Desventajas	Ejemplo
<b>Microfiltración</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesamiento rápido de grandes volúmenes.</li> <li>• Alta eficiencia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja pureza.</li> <li>• Obstrucción de la membrana.</li> <li>• Diferente tamaño de CTCs.</li> <li>• Dificultad para separar las CTCs del filtro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ISET®</li> <li>• Genesis System</li> <li>• Parsortix®</li> </ul>
<b>Centrifugación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Barato.</li> <li>• Fiable.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de CTCs grandes y agregados celulares.</li> <li>• Baja pureza.</li> <li>• Se requieren técnicas de enriquecimiento adicionales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ficoll-Paque™</li> </ul>
<b>Dielectroforesis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aislamiento unicelular.</li> <li>• Alta viabilidad celular.</li> <li>• Alta eficiencia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Volumen limitado.</li> <li>• Baja pureza en algunos dispositivos.</li> <li>• Las propiedades eléctricas de la celda pueden verse afectadas durante el procedimiento.</li> <li>• Hay que controlar un gran número de parámetros simultáneamente.</li> <li>• Precio elevado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DEPArray™</li> </ul>

**Tabla 7. Ventajas, desventajas y ejemplos de métodos de detección de CTCs independientes de marcador.**  
 Nota: adaptado de Habli Z et al. *Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities. Cancers (Basel).* 2020 Jul 17;12(7):1930<sup>202</sup>.

### 2.2.6.2. Técnicas de identificación y caracterización celular

Una vez aisladas las CTCs se procede a cuantificarlas mediante microscopio. La **cuantificación de CTCs** tiene el potencial de identificar pacientes con mayor riesgo de recurrencia. La evidencia preliminar indica que el estado y el recuento de las CTCs tienen potencial para el diagnóstico, la estadificación y el pronóstico tempranos, lo que es de gran importancia para el ajuste oportuno y la optimización del tratamiento<sup>213</sup>.

Las CTCs se **caracterizan fenotípicamente** mediante microscopio o citometría de flujo con análisis de imagen. La principal ventaja de la citometría de flujo frente al microscopio es la

posibilidad de utilizar más marcadores (por ejemplo, el citómetro de flujo con análisis de imagen ImageStream®X tiene 12 canales, 1 ó 2 para campo claro y 9 ó 10 para fluorescencia)<sup>214</sup>. Las CTCs tienen las características moleculares de las células tumorales primarias. Se puede utilizar un análisis completo de la información compartida por la población de CTCs para juzgar el origen y el diagnóstico de los tumores<sup>213</sup>. Las CTCs también portan mutaciones adquiridas diferentes de las que se encuentran en los sitios de exfoliación, que pueden usarse para controlar la resistencia a los fármacos tumorales y la adquisición de potencial metastásico. La combinación de estos dos tipos de datos puede proporcionar información única sobre la heterogeneidad del tumor a nivel del genoma, el transcriptoma, el proteoma y la función del tumor<sup>213</sup>.

En cuanto a la **caracterización genética o secuenciación genética** de las células, **las CTCs se pueden secuenciar individualmente o en grupo**. La **secuenciación de células únicas** utiliza diferentes tecnologías para determinar el orden de los nucleótidos en el ADN o ARN de células individuales. El análisis molecular de CTCs proporciona información sobre la heterogeneidad tumoral más allá de las aberraciones genómicas que no se encuentran en el ADNtc.

Las tecnologías actuales son costosas y sufren pérdida de células durante el manejo del bajo número de CTCs. Además, las diferentes características físicas y biológicas de los grupos de CTCs a menudo generan dificultades para analizarlos a través de las plataformas comerciales actuales. El análisis molecular unicelular de las CTCs ofrece ventajas y un nuevo enfoque de pronóstico para la identificación de mecanismos de resistencia a la terapia dirigida y permite a los investigadores obtener información crucial sobre los mecanismos metastásicos y las alteraciones genómicas responsables de la resistencia a los medicamentos, mejoría del tratamiento y del manejo del cáncer<sup>215</sup>. Sin embargo, el análisis molecular unicelular o secuenciación de célula única es muy caro y costoso a nivel de análisis de datos por lo que es difícil implementarlo en la práctica clínica.

A partir de este punto, en función de lo que se desee estudiar se pueden realizar estudios proteómicos, multiómicos, cultivos *in vitro*, etc.

### 2.2.7. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTCs) Y CÉLULAS EPITELIALES CIRCULANTES (CECs)

Como se ha mencionado anteriormente, las CTCs son células procedentes de un tumor epitelial primario que circulan en la sangre. Su origen es epitelial y este hecho nos ayuda a distinguirlas frente al resto de componentes celulares de la sangre. Sin embargo, se ha demostrado la presencia de células de origen epitelial o **células epiteliales circulantes (CECs) en pacientes con enfermedades premalignas**, como es el caso de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)<sup>171</sup> y enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (diverticulosis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, endometriosis colónica...)<sup>216</sup>, lo que sugiere que las CECs tienen un **importante valor diagnóstico y pronóstico** en el contexto de la **intercepción de cáncer**<sup>172</sup>. Este hecho ha sido **poco evaluado en pacientes con cirrosis**

**hepática**<sup>217</sup>. De hecho, en la mayoría de estudios que incluyen pacientes con cirrosis hepática, las CTCs/CECs no fueron detectadas<sup>218</sup> o descritas en niveles muy bajos<sup>219</sup>, posiblemente debido a la selección de pacientes o a la metodología de aislamiento celular utilizada.

Dado que nuestro trabajo se centra tanto en el estudio del CHC ya establecido como de la intercepción de cáncer en pacientes cirróticos con alto riesgo de desarrollar CHC, nos parece más correcto hablar de CECs y es la terminología que se utilizará a lo largo de nuestro estudio.

### 2.2.8. BIOPSIA LÍQUIDA Y HEPATOCARCINOMA

En el caso del CHC varios estudios pequeños han examinado la presencia de CTCs en estos pacientes basándose en la expresión de EpCAM, con tasas de detección que oscilan entre aproximadamente el 30% al 80% dependiendo de la metodología y población<sup>220,221,222</sup>. Sin embargo, **son escasas las publicaciones respecto al valor pronóstico y diagnóstico de las CTCs en pacientes con CHC**<sup>223</sup>.

De ellas la mayoría se tratan de estudios con un número de pacientes reducido que han empleado diferentes metodologías para la detección de CTCs, sin realizar además un seguimiento de sus niveles en distintos momentos evolutivos antes y/o después de la cirugía y del tratamiento administrado<sup>223</sup>. A pesar de la **falta de homogeneidad**<sup>224,225,226</sup>, sus resultados apuntan a que la presencia de CTCs constituye un factor de mal pronóstico y a que están relacionadas con la aparición de metástasis en otros órganos y con el desarrollo de resistencias, y por tanto, falta de respuesta en estos pacientes.

La metodología de aislamiento basada en EpCAM conocida como CellSearch® ha sido ampliamente utilizada. Así, niveles elevados de expresión de EpCAM se encontraron solo en CHC metastásico en comparación con lesiones primarias y con invasión vascular<sup>227</sup>. También, la elevación de la expresión de los niveles de EpCAM se ha relacionado con mal pronóstico<sup>228</sup>. Se está investigando si el uso de metodologías alternativas para aislamiento de CTCs como las basadas en el tamaño<sup>194,229</sup>, o incluyendo otros biomarcadores como el glicicano-3<sup>230</sup>, podrían superar las limitaciones de CellSearch®.

Son necesarios nuevos estudios que confirmen el valor pronóstico y predictivo de la presencia de CTCs en pacientes con CHC, así como las implicaciones que los cambios en sus niveles pueden tener en la evolución de los mismos<sup>231</sup>.

Los últimos estudios publicados al respecto han puesto de manifiesto la **importancia de analizar** no sólo la presencia o cuantificación de estas células sino también **las características genéticas y fenotípicas** de las mismas. Se ha demostrado que **las CTCs del CHC presentan una gran heterogeneidad**<sup>232,233</sup>, y que sólo algunas de ellas con particulares características de células progenitoras serán capaces de sobrevivir y dar lugar a metástasis.



La **heterogeneidad intratumoral del CHC** impone un gran desafío para detectar extensamente las mutaciones del tejido tumoral y generalmente resulta en una subestimación del número de mutaciones<sup>232</sup>. Además, el muestreo repetido de biopsias de tejido no es factible clínicamente. Pueden surgir nuevas mutaciones durante el proceso de desarrollo del cáncer y también pueden adquirirse a lo largo del tratamiento. **Las biopsias de tejido tradicionales pueden tener un sesgo de muestreo en el perfil mutacional** y provocar una evaluación inexacta de la enfermedad<sup>232</sup>. La biopsia de tejido solo nos permite evaluar los cambios genéticos de un área focal de un tumor o un subconjunto de células tumorales en tejidos cancerosos humanos que tienen una gran heterogeneidad, incluido el CHC<sup>232</sup>.

Por lo tanto, **el análisis de CTCs proporciona una forma alternativa para el descubrimiento de mutaciones que se puede aplicar a la detección temprana del cáncer, el control de la recurrencia y la evaluación del tratamiento**. La biopsia líquida ofrece un medio no invasivo para estudiar la información genómica del CHC<sup>232</sup>.

Aunque las CTCs pueden reflejar la heterogeneidad tanto intratumoral como entre pacientes, la dificultad de capturar CTCs en grandes cantidades reduce la representatividad de la variedad de CTCs para la heterogeneidad del tumor primario<sup>232</sup>. Esto se ve obstaculizado aún más por la falta de biomarcadores comunes para aislar las CTCs debido a la gran **diversidad entre pacientes en los CHC**<sup>232</sup>. Dado que el ADNtc tiende a liberarse de las células tumorales necróticas u apoptóticas, se produce un sesgo en el estudio de la heterogeneidad ya que da más información de células tumorales necróticas o apoptóticas. Por otra parte, el hecho de que una parte de las CTCs sea más propensa a la apoptosis una vez que pasa al torrente sanguíneo, podría conducir a una captura sesgada de CTCs intactas obteniendo mejores resultados<sup>232</sup>.

Por lo tanto, la **evaluación de la heterogeneidad molecular de los tumores primarios y metastásicos** mediante el uso de CTCs puede ser un enfoque racional, ya que las muestras circulantes se derivan de múltiples sitios tumorales en un paciente<sup>233</sup>. En base a la suposición de que diferentes clones tienen una tendencia similar a diseminarse o arrojar ADN a la circulación, el aislamiento de CTCs podría revelar una imagen completa del paisaje genético de manera longitudinal y dinámica. Sin embargo, esta idea está prácticamente inexplorada en el CHC<sup>233</sup>.

La heterogeneidad intertumoral e intratumoral del CHC hace que la identificación y verificación de las alteraciones genéticas sea un desafío. Los estudios futuros deben evaluar en detalle las alteraciones genéticas en diferentes regiones geográficas, dentro y entre diferentes tumores en pacientes individuales y cronológicamente a lo largo de la progresión del tumor<sup>233</sup>. Esta información aclarará los cambios genéticos evolutivos involucrados en la hepatocarcinogénesis y la progresión del cáncer y, por lo tanto, facilitará la identificación de los impulsores genéticos clave del CHC.

### 2.2.9. RECEPTOR DE ASIALOGLICOPROTEÍNA (ASGR).

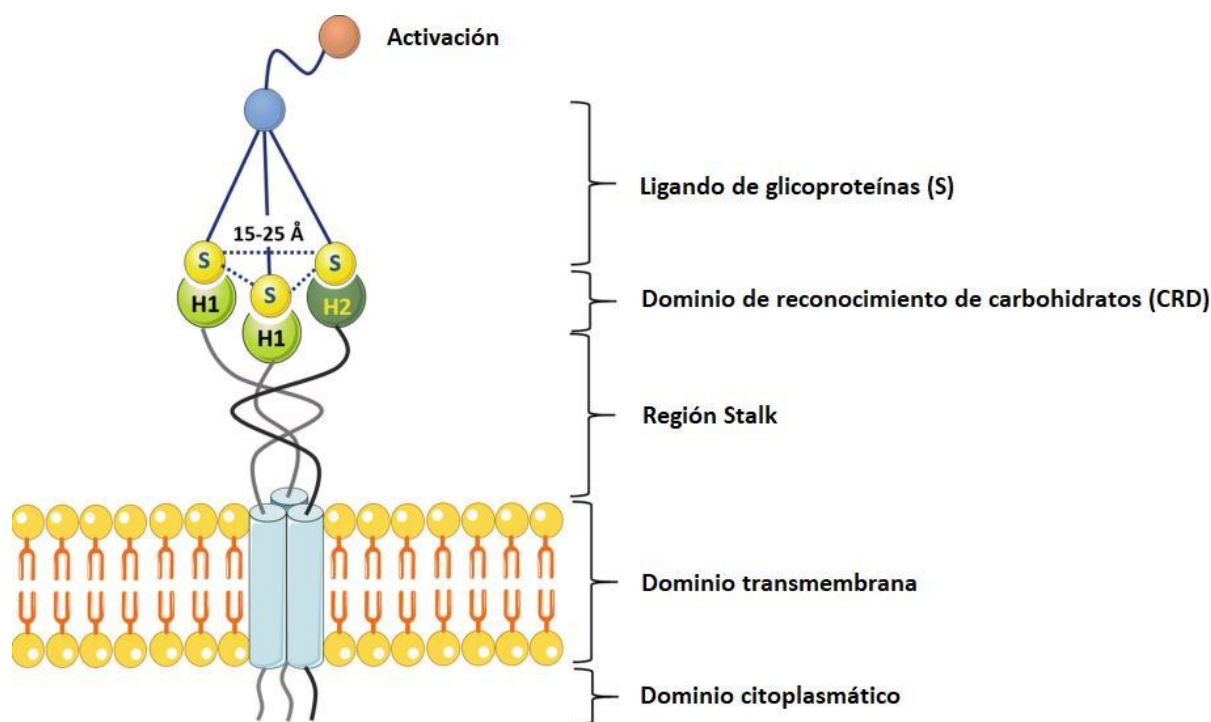
Entre los **marcadores fenotípicos** que destacan en la identificación y caracterización de células tumorales de origen hepático destaca el **receptor de asialoglicoproteína (ASGR)**. Se trata de uno de los receptores de superficie que los hepatocitos expresan en mayor cantidad, y está involucrado en la endocitosis de glicoproteínas desialiladas presentes en el suero sanguíneo. Como se describe en varios estudios, se podría considerar un **nuevo marcador para el aislamiento de CTCs de origen hepático**<sup>234,235,236</sup>.

Como se ha dicho anteriormente, **ASGR** es un receptor **abundante específico de los hepatocitos** que en la mayoría de los mamíferos **reconoce, internaliza y elimina glicoproteínas a las que se les ha eliminado un ácido siálico terminal del extremo de la proteína y que han expuesto residuos terminales de galactosa o N-acetilgalactosamina**<sup>234,237</sup>.

En el estudio de Li et al.<sup>234</sup> existe inmunotinción de ASGR en tejido hepático normal, tejido de CHC y tejido hepático adyacente, pero no existe inmunotinción en varios tejidos extrahepáticos examinados (colon, pulmón, carcinoma renal y cáncer de mama), lo que confirma su especificidad y origen hepático. Dado que los hepatocitos normales no circulan, a menos que se conviertan en tumorales, las células que lo expresan en sangre son células de CHC circulantes<sup>234</sup>.

El receptor de asialoglicoproteína contiene **dos subunidades, el receptor de asialoglicoproteína 1 (ASGR1) y el receptor de asialoglicoproteína 2 (ASGR2)**. Ambas subunidades se encuentran codificadas en el cromosoma *17p13.1*. Pueden formar diferentes formas cuaternarias, como dímeros, trímeros, tetrámeros para permitir la unión específica al sustrato o la endocitosis. ASGR1 es la subunidad principal y tiene 46 kDa<sup>238</sup> y 9 exones<sup>239</sup>. ASGR2 es la subunidad menor y tiene 50 kDa<sup>238</sup> y 11 exones<sup>240</sup>.

Los receptores de asialoglicoproteínas humanos se componen de **dos unidades, H1 y H2**. Cada una de estas unidades tiene su **extremo N-terminal dentro del citoplasma** de una célula hepática y un **dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) en el lado extracelular**<sup>238</sup> (**Figura 14**). El CRD funciona para unirse a asialoglicoproteínas a través de una interacción mediada por iones de calcio. En particular, los grupos hidroxilo de los azúcares terminales (generalmente galactosa) de la asialoglicoproteína forman enlaces de hidrógeno con el CRD del receptor de asialoglicoproteína; el posicionamiento adecuado y la facilitación de estos enlaces de hidrógeno se deben a la presencia de  $Ca^{2+}$ <sup>237</sup>.



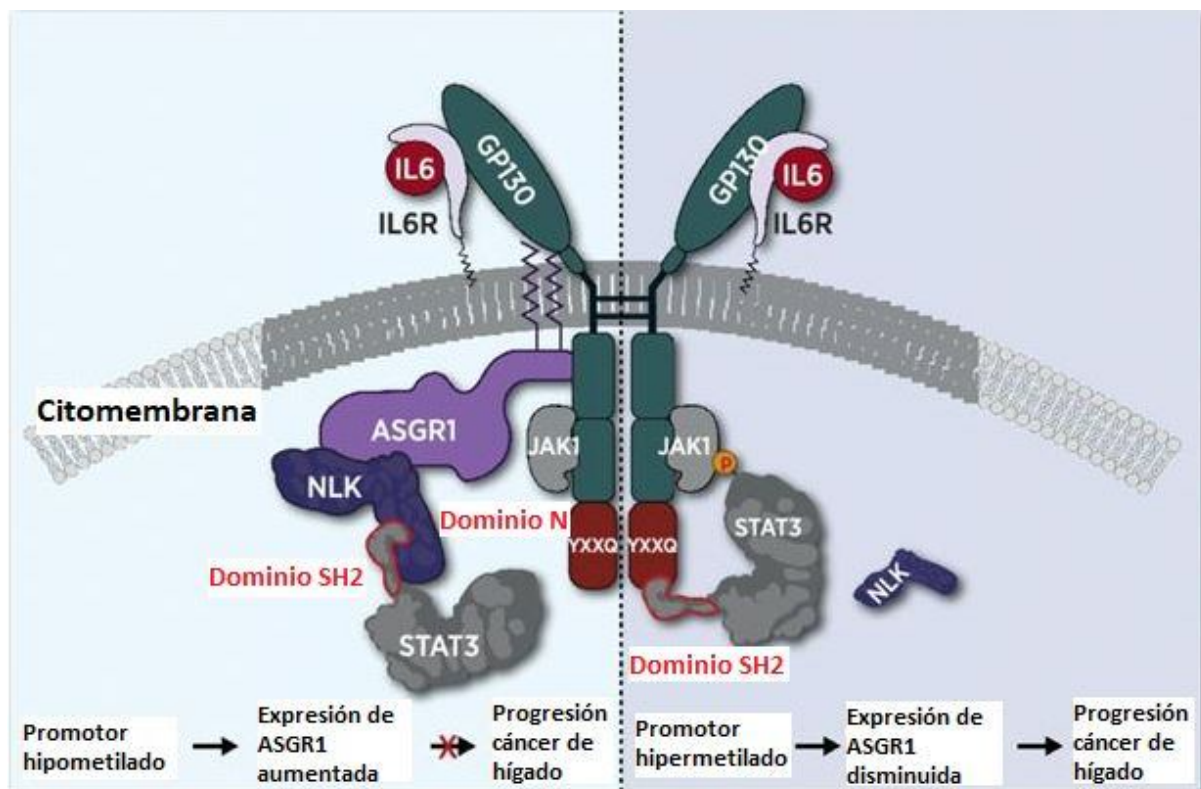
**Figura 14. Estructura de receptor de asialoglicoproteína (ASGR).** Proteína transmembrana lectina de tipo C, dependiente de calcio y específica de carbohidratos, presente en la membrana plasmática de los hepatocitos. S: ligando de asialoglicoproteínas. CRD: dominio de reconocimiento de carbohidratos. H1 y H2: unidades del receptor de asialoglicoproteína. Fuente: adaptado de Das S et al. *Asialoglycoprotein Receptor and Targeting Strategies*. In: Devarajan P, Dandekar P, D'Souza A. *Targeted Intracellular Drug Delivery by Receptor Mediated Endocytosis*. AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series, vol 39. Springer; 2019. p. 353–381<sup>241</sup>.

Recientemente, se ha estudiado **ASGR1** en el contexto de **enfermedades cardiovasculares**<sup>242,243</sup>, demostrando que su inhibición reduce la hipercolesterolemia y aterosclerosis<sup>242</sup> debido al aumento de excreción de colesterol<sup>243</sup>. También hay estudios que demuestran que ASGR1 es un **receptor de SARS-CoV-2**<sup>244,245</sup>, hallazgo que demuestra un impacto previamente no apreciado del tipo de célula diana en la neutralización mediada por anticuerpos<sup>245</sup>.

En el ámbito de la **Hepatología**, ASGR1 ha sido utilizado como **diana de tratamientos**. Por ejemplo, en el estudio de Monestier et al.<sup>246</sup> se estudió ASGR1 para el tratamiento de la **enfermedad de Wilson** y en el trabajo de Zhang et al.<sup>247</sup> se utilizó ASGR1 como receptor de proteína R-spondin mutada (RSPO F105R/F109A) para estudiar la **regeneración hepática**.

En el contexto de **CHC**, el papel de **ASGR1 como supresor tumoral** fue propuesto en primer lugar por su **interacción con LASS2** (longevity assurance homolog 2 of yeast LAG1)<sup>248</sup>. Según este estudio, ASGR1 interactúa directamente con LASS2. La eliminación de LASS2 atenúa los efectos inhibitorios de ASGR1 sobre la migración e invasión de células de CHC *in vitro*. ASGR1 disminuye la actividad de la V-ATPasa en las células de CHC, y esto se revierte con la eliminación de LASS2. Este estudio concluye que los pacientes con CHC con niveles bajos de LASS2 tienen peor pronóstico, mientras que aquellos con niveles altos de ASGR1 y LASS2 tienen mejor pronóstico<sup>248</sup>.

Más recientemente, **ASGR1** se ha descrito como **supresor tumoral regulado por la metilación de ADN**. Según Zhu et al.<sup>249</sup> **la expresión de ASGR1 se regula negativamente en el CHC y se correlaciona con el tamaño, el grado y la supervivencia del tumor**. Los experimentos de pérdida y ganancia funcional mostraron que ASGR1 suprime la progresión del cáncer de hígado *in vivo* e *in vitro*. En conjunto, estos resultados confirman que ASGR1 anula la progresión del CHC al promover la unión de NLK a STAT3 e inhibir la fosforilación de STAT3<sup>249</sup> (**Figuras 15 y 16**). Estos datos confirman los hallazgos descritos por Witzigmann et al.<sup>250</sup> cuyo trabajo describe que **la expresión de ASGR1 está aumentada en pacientes cirróticos y disminuye significativamente con el aumento del grado de CHC**.



**Figura 15. ASGR1 inhibe la activación de STAT3 y funciona como supresor tumoral en el cáncer de hígado mediante la unión de la quinasa similar a Nemo (NLK).** La secuenciación de ARN y la espectrometría de masas mostraron que ASGR1 inhibe la fosforilación de tirosina de STAT3 al interactuar con la quinasa similar a Nemo (NLK). NLK se unió al dominio SH2 de STAT3 de una manera dependiente de ATP y compitió con la glicoproteína 130 (GP130), suprimiendo finalmente la fosforilación de STAT3 mediada por GP130/JAK1. ASGR1 alteró la fuerza de unión de NLK y STAT3 al interactuar con GP130. Además, la región del dominio de NLK fue crucial para unir STAT3 y frenar su fosforilación. Fuente: adaptado de Zhu X et al. *Asialoglycoprotein Receptor 1 Functions as a Tumor Suppressor in Liver Cancer via Inhibition of STAT3*. *Cancer Res.* 2022 Nov 2;82(21):3987-4000<sup>249</sup>.

### 2.2.10. MIR-122-5P

Los **microARN (miARN)** son pequeñas moléculas de **ARN no codificante** con una longitud aproximada de 23 nucleótidos. Los miARN sirven como **reguladores postranscripcionales de la expresión génica al unirse a la región 3' no traducida del ARN mensajero (ARNm)**<sup>251,252</sup>. La biogénesis de los miARN está controlada minuciosamente. Por lo tanto, **la aparición de**

**una desregulación sutil de cualquier paso en la biogénesis de los miARN puede conducir a la tumorigénesis.** Estudios previos han demostrado que la desregulación de miARN específicos contribuye a la progresión de la hepatocarcinogénesis<sup>253,254</sup>. Por lo tanto, estas moléculas pueden representar biomarcadores prometedores para el diagnóstico de CHC<sup>255</sup>.

Los **miARN circulantes** son miARN **secretados en la sangre** periférica a través de exosomas o filtrados pasivamente de células rotas, que **pueden empaquetarse en cuerpos apoptóticos, microvesículas (MV), partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) o formar complejos con proteínas argonauta (AGO)**<sup>256,257</sup>. La mayoría de los miARN séricos provienen de las células sanguíneas circulantes y algunos son liberados por las plaquetas<sup>258</sup>. Los miARN circulantes tienen una mayor resistencia a la degradación de la ARNasa, temperatura u otros factores externos, que los miARN tisulares, ya que están empaquetados por estas bicapas lipídicas y forman complejos con proteínas<sup>257</sup>. Chen et al. describieron que los niveles de miARN en suero son estables, reproducibles y consistentes entre individuos de la misma especie<sup>259</sup>.

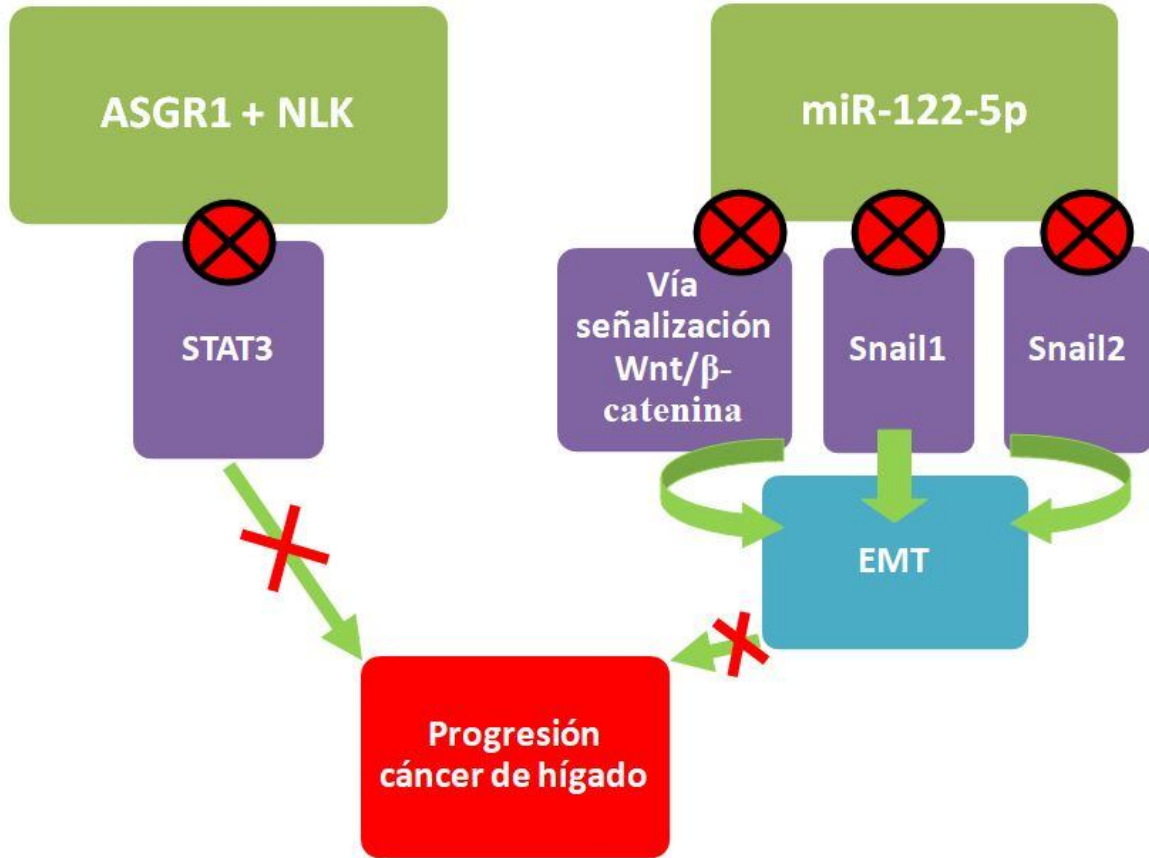
En la actualidad, cada vez más investigadores prestan atención a la **función de los miARN circulantes en las enfermedades hepáticas**. La mayoría de los indicadores estudiados se utilizan para distinguir a las personas sanas de los pacientes con CHC, pero no para diferenciar entre CHC y grupos de alto riesgo, como pacientes con cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas. Por lo tanto, se necesita más evidencia experimental<sup>260</sup>.

Entre los marcadores existentes para la **caracterización genética de las CTCs**, destaca el **miR-122**, un microARN involucrado en múltiples procesos fisiológicos hepáticos y transformación maligna hepatocitaria<sup>261</sup>.

El miR-122-5p se ha relacionado con la **supresión de la proliferación celular y su regulación positiva con la represión de la EMT** por la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina a través de Snail  $\frac{1}{2}$  (**Figura 16**)<sup>262</sup>. Su regulación negativa tanto en pacientes con CHC como en líneas celulares de CHC tiene una correlación inversa con la expresión de ciclina G1<sup>263</sup>. Jin et al. describieron que el miR-122-5p junto con otros cuatro miRNAs circulantes son una herramienta diagnóstica de CHC<sup>264</sup> y recientemente, se ha demostrado su papel pronóstico en el estudio de Wang et al. donde la supervivencia de los pacientes con CHC fue mayor en aquellos con mayor expresión de miR-122-5p<sup>265</sup>.

En la **Figura 16** se esquematiza la función de supresión tumoral de ASGR1 y miR-122-5p en el CHC.

# ASGR1 y miR-122-5p: FUNCIÓN DE SUPRESIÓN TUMORAL



**Figura 16. Función de supresión tumoral de ASGR1 y miR-122-5p.** En la parte izquierda de la figura se observa como la interacción de ASGR1 con la quinasa similar a Nemo (NLK) inhibe la fosforilación de tirosina de STAT3, impidiendo la progresión de cáncer de hígado. En la parte derecha de la figura se representa como miR-122-5p actúa inhibiendo la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, Snail1 y 2, reprimiendo así la transición epitelio-mesénquima y la progresión tumoral. *Fuente: elaboración propia.*

### 3. HIPÓTESIS

La presencia de ciertos **niveles de CTCs** y de sus **características fenotípicas y/o genéticas** en la sangre periférica de pacientes con hepatocarcinoma constituye un **factor de mal pronóstico** que se asocia al estado de extensión de la enfermedad y por tanto, a la aparición de recidivas y a peores tasas de supervivencia.

Poco se sabe de lo que ocurre en la etapa pretumoral. La **caracterización genética y fenotípica de las CECs en etapa pretumoral y de las CTCs en etapa tumoral** permitirá detectar diferentes **subpoblaciones de células, estratificando a los pacientes con riesgo de desarrollar CHC** e identificando aquellos pacientes con mayor riesgo y que podrían beneficiarse de un seguimiento más estrecho con el objetivo de llevar a cabo un diagnóstico precoz, accediendo así a tratamientos con intención curativa.

La identificación de diferentes subpoblaciones de CECs/CTCs también tendrá una importante implicación a nivel de **pronóstico** y a lo largo del seguimiento post-tratamiento para detectar la **aparición de recidivas**.

Dada la función de supresión tumoral de ASGR1 y miR-122-5p explicada en los apartados 2.9 y 2.10 respectivamente, la **caracterización fenotípica** de las células mediante la **expresión positiva de ASGR1** permitirá identificar el origen hepático de las mismas y la **caracterización genética** mediante la **expresión positiva de miR-122-5p** permitirá identificar daño hepático.

#### 4. OBJETIVOS

El **objetivo general** consiste en **determinar el valor pronóstico de la detección y caracterización de CECs** en pacientes con CHC y en pacientes con cirrosis hepática sin CHC.

Los **objetivos específicos** son:

**1. Usar el receptor de asialoglicoproteína 1 (ASGR1) y el miR122-5p** como marcadores para la **caracterización de CECs procedentes de pacientes con CHC.**

1.1. Identificar el origen hepático de las CECs.

1.2. Caracterizar fenotípicamente las CECs usando ASGR1 como marcador específico del hígado.

1.3. Caracterizar genéticamente las CECs para la expresión de miR-122-5p como marcador específico del hígado.

**2. Determinar si los niveles de CECs en pacientes con CHC:**

2.1 En pacientes susceptibles de ser **operados**: antes y después de la cirugía **se asocian con la aparición de recidivas.**

2.2 En pacientes **no operables** definen la **progresión** de la enfermedad y la **supervivencia global.**

**3. Determinar si la caracterización genética y fenotípica de CECs** ayudaría a **estratificar el riesgo de desarrollar CHC en pacientes cirróticos.**



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. DISEÑO

**Estudio observacional prospectivo de cohortes** en el que se incluyeron a pacientes diagnosticados de **hepatocarcinoma** y a pacientes **con cirrosis hepática sin hepatocarcinoma** (reclutados entre septiembre de 2017 y septiembre de 2020), a los que se les hicieron **determinaciones seriadas de los niveles de CTCs** tras la aprobación por el Comité Ético de Investigación (CEI) de Granada (**Anexo I**).

En estos pacientes se realizó un **seguimiento** de al menos 3 años y máximo 5 años (para todos aquellos que alcanzaron tal supervivencia) o de una duración igual a su supervivencia (si salieron del estudio por diferentes causas) y en ellos además de las exploraciones clínicas e instrumentales estándar, se realizaron **determinaciones de CTCs** en los siguientes tiempos:

- **Grupo 1 (Quirúrgico):** muestra basal, 1 mes post-cirugía, 6 meses post-cirugía, 12 meses post-cirugía.
- **Grupo 2 (No quirúrgico):** muestra basal, 1 mes post muestra basal, 6 meses post muestra basal, 12 meses post muestra basal.
- **Grupo 3 (Cirrosis hepática):** muestra basal.

### 5.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

- **Grupo 1:** Pacientes con diagnóstico de **hepatocarcinoma** y que no habían recibido tratamiento previo, que fueron sometidos a **tratamiento quirúrgico** con intención curativa entre septiembre de 2017 y septiembre de 2020, en el Hospital Universitario Clínico San Cecilio (Granada) y Hospital Virgen de las Nieves (Granada).
- **Grupo 2:** Pacientes con diagnóstico de **hepatocarcinoma** no sometidos a cirugía que recibieron **otros tratamientos** tras la extracción basal en el Hospital Universitario Clínico San Cecilio (Granada) y Hospital Virgen del Rocío (Sevilla).
- **Grupo 3:** Pacientes con **cirrosis hepática** sin diagnóstico de hepatocarcinoma sometidos a **cribado de hepatocarcinoma** con ecografía abdominal cada 6 meses en el Hospital Universitario Clínico San Cecilio (Granada).

Ajustándose a los siguientes **criterios de inclusión y exclusión:**

#### **Criterios de inclusión:**

- **Para los grupos 1 y 2:** pacientes diagnosticados de CHC no tratado previamente, en cualquier estadio BCLC.
- **Para el grupo 3:** pacientes diagnosticados de cirrosis hepática Child Pugh A sin CHC en seguimiento en programa de cribado con ecografía cada 6 meses.
- **Para todos los grupos:** mayores de 18 años.

- **Para todos los grupos:** firma de consentimiento informado (**Anexos II y III**).

**Criterios de exclusión:**

- **Para los grupos 1 y 2:** pacientes con CHC tratado previamente.
- **Para el grupo 3:** pacientes con CHC y pacientes con cirrosis hepática Child Pugh B y C.
- **Para todos los grupos:** menores de 18 años.
- **Para todos los grupos:** rechazo de consentimiento informado.

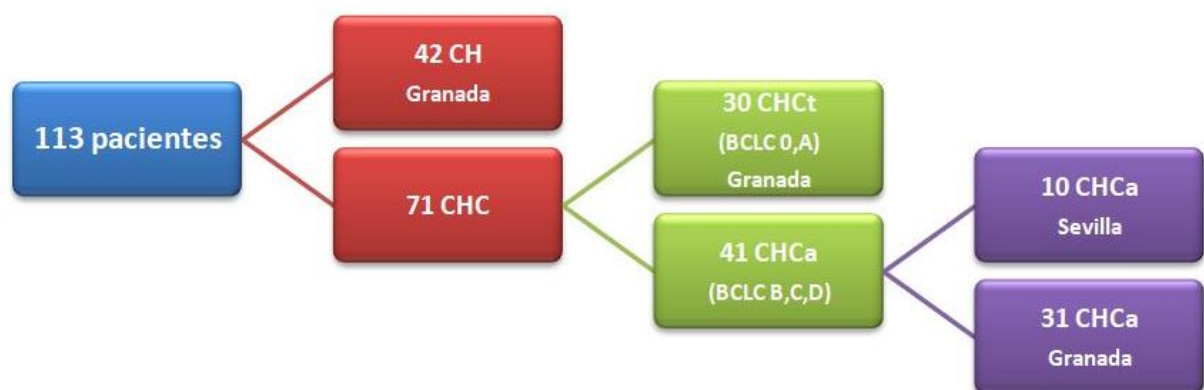
### 5.3. TAMAÑO MUESTRAL

Se reclutaron un total de **113 pacientes**:

- **42 pacientes con cirrosis hepática** sin hepatocarcinoma (**CH**) en estadio Child Pugh A, sometidos a cribado ecográfico de hepatocarcinoma cada 6 meses.
- **71 pacientes con CHC** que no habían recibido tratamiento previamente (62 con cirrosis hepática). De estos 71 pacientes, **16** fueron sometidos a **tratamiento quirúrgico** (resección o THO) y **55** fueron sometidos a **otros tratamientos no quirúrgicos** (radiofrecuencia, TACE, tratamiento sistémico, paliativos).

Los 113 pacientes se distribuyeron en **3 cohortes para el análisis de las CECs (Figura 17):**

- **Cirróticos (CH):** 42 pacientes.
- **Hepatocarcinomas en estadio temprano (CHCt)** con BCLC 0 y A al diagnóstico: 30 pacientes.
- **Hepatocarcinomas en estadio avanzado (CHCa)** con BCLC B, C y D al diagnóstico: 41 pacientes.



**Figura 17. Pacientes incluidos en el estudio y procedencia.** CH: cirrosis hepática. CHC: hepatocarcinoma. CHCt: hepatocarcinoma en estadio temprano (BCLC 0 y A). CHCa: hepatocarcinoma en estadio avanzado (BCLC B, C y D).

## 5.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

### 5.4.1. AISLAMIENTO DE CECs

Se extrajeron **muestras de sangre periférica (15 ml)** en tubos vacutainer K2-EDTA a los pacientes incluidos en el estudio. Las muestras de sangre fueron **procesadas en las 4 horas posteriores** a su extracción en el laboratorio de Biopsia Líquida e Intercepción del Cáncer del centro Genyo.

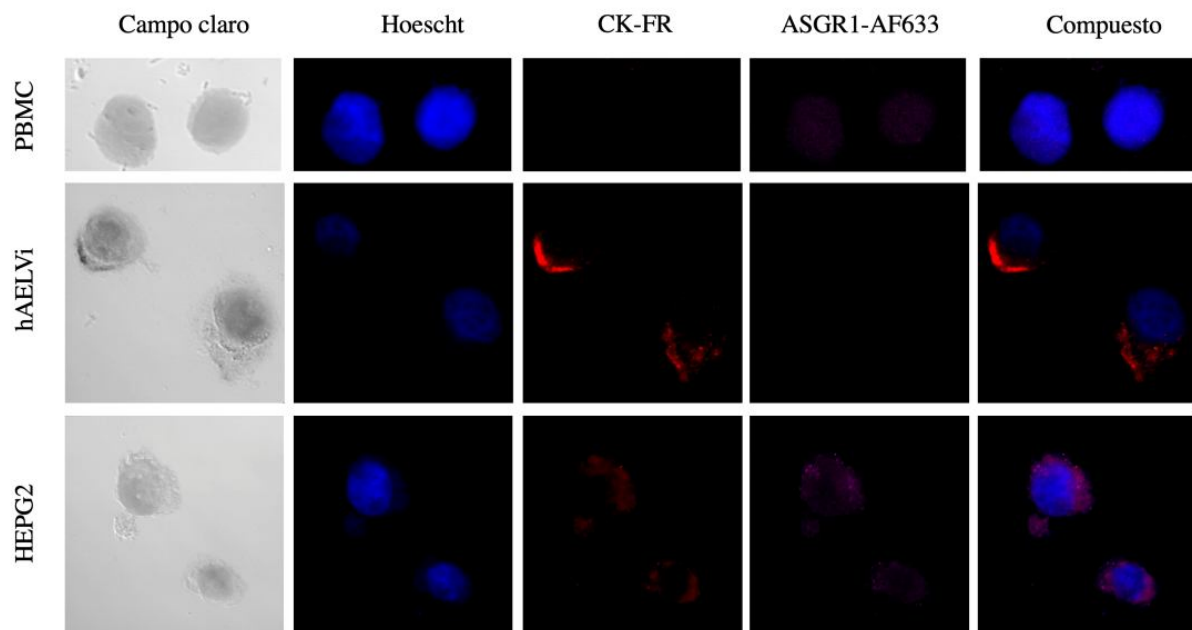
El **enriquecimiento celular** se realizó mediante **selección inmunomagnética positiva**. Las muestras se enriquecieron con células mononucleares periféricas usando centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Histopaque®-1119. Las CECs se permeabilizaron con solución de permeabilización y fijación. Posteriormente se aislaron utilizando Carcinoma Cell Enrichment Kit (130-060-301, Miltenyi Biotec) según describen Nadal et al<sup>266</sup>. Las CECs aisladas tras centrifugación se colocaron sobre portaobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina usando un cytospin (Hettich) para la caracterización fenotípica y genética (se preparó un portaobjetos de vidrio por cada 7,5 ml de sangre periférica de cada paciente para realizar dobles caracterizaciones cuando fuera posible, en concreto, para el marcaje de CK se utilizó un anticuerpo pan-anti-citoqueratina).

### 5.4.2. CUANTIFICACIÓN DE CECs Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA MEDIANTE DETECCIÓN DE ASGR1

La **especificidad del anticuerpo para ASGR1** se evaluó en la línea celular tumoral hepatocelular HEPG2 (referencia 85011430, lote. 2440) obtenida por el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. Las células se cultivaron en medio MEM con sales de Earle, con L-glutamina (Biowest) con 10% Suero Bovino Fetal (FBS), 1%, piruvato sódico y 1% aminoácidos no esenciales (Biowest). La línea celular epitelial alveolar primaria hAELVi (InSCREENeX GmbH) se usó como control negativo para la expresión de ASGR1 como se indica en el atlas de proteínas humanas y se cultivó en un medio específico huAEC Medium (Inscreenex) con 10% Suero Bovino Fetal (FBS) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Ambas líneas celulares se incubaron en un ambiente humidificado a 5% CO<sub>2</sub> y a 37°C. Una vez alcanzado un 80% de confluencia, las células se sub-cultivaron siguiendo los procedimientos estándares de la Unidad de Cultivos Celulares del centro Genyo. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante sano se utilizaron como control negativo para ambos anticuerpos, CK y ASGR1 (**Figura 18**). Ambas líneas celulares se analizaron mediante STR para el ensayo de autenticidad celular y se descartó contaminación por micoplasma. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Posteriormente, las **CECs aisladas** de los pacientes se **enumeraron y caracterizaron** utilizando **doble inmunocitoquímica con tinción cromogénica para CK seguida de detección fluorescente para ASGR1**. La detección de CK se realizó utilizando Carcinoma Cell Kit de detección (130-060-301, Miltenyi Biotec) según Nadal et al<sup>266</sup>. Las CECs de pacientes con CHC y cirrosis hepática se bloquearon con suero de cabra al 10% y suero FcR al 1,5% en solución

de tinción celular durante 45 minutos y fueron incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-ASGR1 diluido 1/100 (Atlas Antibodies Cat# HPA012852, Merck) en suero de cabra al 1% durante la noche. Para la visualización de ASGR1, se añadieron 10  $\mu\text{g}$  de anticuerpo secundario AlexaFluor 633 anti-conejo (A-21070, Thermo Fisher Scientific) y se incubó durante 20 minutos. Finalmente, los portaobjetos se montaron utilizando 4  $\mu\text{g}$  de Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) y SlowFade™ Gold Antifade (S36936, Thermo Fisher Scientific). La enumeración y caracterización celular se realizó en un microscopio láser confocal (Zeiss LSM 710) y se tomaron fotografías usando un objetivo de inmersión en aceite  $\times 60$ . Las CECs se informaron como CEC<sup>CK+/ASGR1+</sup> (para tinción ASGR1 positiva) o CEC<sup>CK+/ASGR1-</sup> (para tinción ASGR1 negativa).



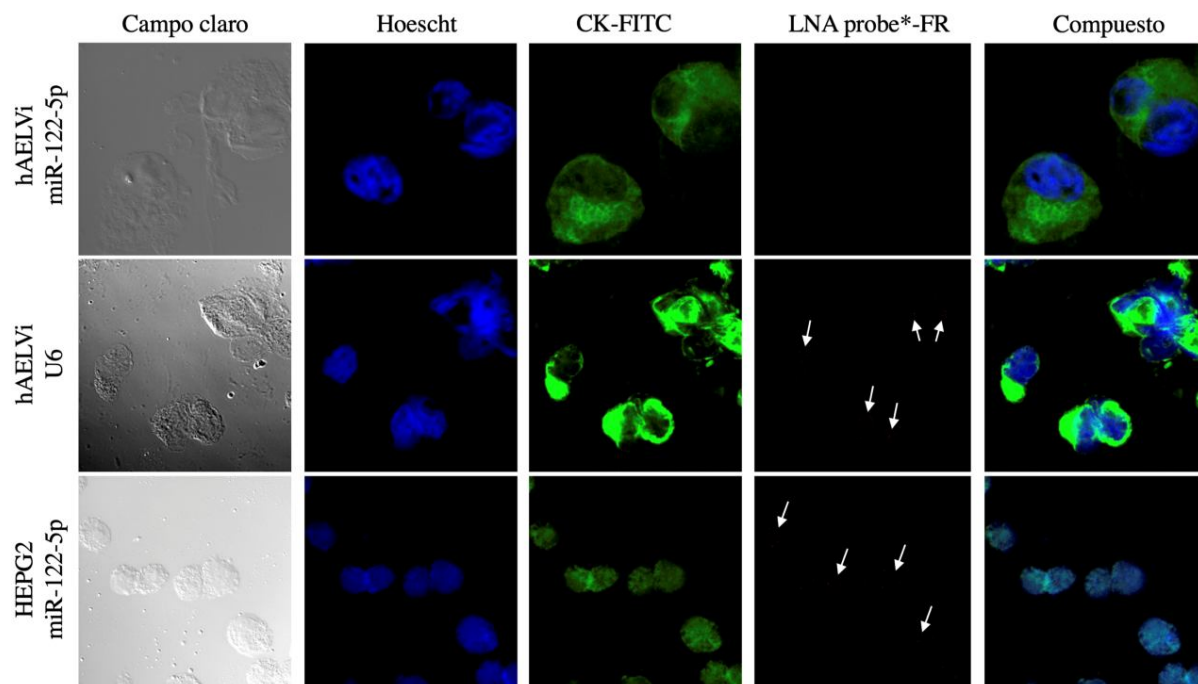
**Figura 18. Ensayo de especificidad del anticuerpo anti-ASGR1.** Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos sanos como controles negativos para CK y ASGR1. Se utilizó la línea celular epitelial alveolar hAELVi como control negativo para la tinción de anticuerpos ASGR1 (con Alexa Fluor 633) y control positivo para el marcador epitelial CK (visualizado usando FR: FastRed). La línea celular de CHC (HEPG2) muestra tinción positiva de ambos marcadores, CK y ASGR1. Hoescht se utilizó como tinción nuclear.

#### 5.4.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CECs MEDIANTE INMUNOFISH

Como **prueba de concepto**, se seleccionaron **5 pacientes positivos para CECs pertenecientes a cada cohorte**: 5 cirróticos (CH), 5 CHC en estadio temprano (CHCt) y 5 CHC en estadio avanzado (CHCa). Para cada paciente, en un segundo portaobjetos de vidrio se realizó la **caracterización genética por immunoFISH** para la caracterización de la expresión de miR-122-5p, usando una modificación del protocolo previamente estandarizado en nuestro grupo<sup>267</sup>.

Este procedimiento **no fue realizado en todos los pacientes** debido a: disponibilidad insuficiente de muestra, dificultades en la combinación de tinción de cromógenos con detección de fluorescencia y por motivos financieros.

En pacientes positivos para CECs, se realizó hibridación fluorescente in situ (FISH) para miR-122-5p en combinación con inmunofluorescencia con CK para determinar el daño hepático de las CECs. Las CECs se aislaron como se indica en el apartado 4.1. Posteriormente, se trataron con pepsina al 0,1% filtrada (Merck) en HCL 10 mM durante 1 minuto a 37°C, se lavaron dos veces con PBS al 1X y luego se hibridaron durante 1 hora a 57°C con la sonda de detección de miARN miRCURY LNA para miR-122-5p (Qiagen, Cat#339453) según el protocolo del fabricante. La sonda U6 se usó como control positivo para la técnica. Después de aumentar los lavados de resistencia con SSC, las muestras se bloquearon (PBS 1X, 0.1% Tween-20, 2% suero de cabra, 1% BSA) e incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche, Cat#11093274910) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de varios lavados con PBS 1X, 0,1% Tween-20, las muestras se tiñeron usando el sustrato prefiltrado FastRed durante 1,5 horas a 30°C. La tinción se terminó añadiendo el tampón KTBT. Posteriormente, se realizó la inmunofluorescencia para la citoqueratina-FITC. En la **Figura 19** se muestran los controles internos para la especificidad de las sondas y la metodología.



**Figura 19. Experimentos de control ImmunoFISH utilizando sondas LNA.** Las células epiteliales alveolares hAELVi se utilizaron como control negativo para LNA-miR-122-5p y como control positivo para LNA-U6 (ambas sondas visualizadas con FastRed (FR)). La CK se tiñó con FITC (verde). La línea celular del carcinoma hepatocelular (HEPG2) muestra tinción positiva de ambos marcadores, CK y miR-122-5p, mientras que la línea celular hAELVi muestra tinción negativa para miR-122-5p. Hoescht se utilizó como tinción nuclear. Nota: Las sondas LNA se muestran en el eje "y" de la figura, ya que son diferentes para cada experimento.

## 5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El **análisis descriptivo** de las variables se realizó mediante el software **IBM SPSS Statistics 2019**. Para las variables numéricas, se calcularon las medidas de tendencia central y

dispersión; y para las variables cualitativas, también se calcularon frecuencias absolutas y porcentajes.

Para **contrastar la normalidad** de los datos se realizó la prueba de **Shapiro-Wilks**. Se realizó un **análisis bivariado** para detectar posibles factores relacionados con las variables principales. Para las **variables numéricas** se aplicó la prueba de la **t de Student** en las muestras independientes o **Mann-Whitney** en casos no paramétricos. Para las **variables cualitativas** se aplicó la prueba **Chi cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher**. Para cada variable, se calculó la **odds ratio y su intervalo de confianza al 95%**.

Con los resultados que fueron estadísticamente significativos, se propuso un **modelo de regresión logística multivariante** para predecir qué factores influyeron en la variable de estudio. El método de selección de variables se realizó por pasos sucesivos hacia atrás, eliminando en cada paso aquellas variables que no influían significativamente en el modelo, aplicando la **prueba de razón de verosimilitud** (likelihood ratio). Para evaluar la validez del ajuste del modelo se calculó el **estadístico de Hosmer Lemeshow** y las **tasas de supervivencia, la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de progresión (SLP)** se representaron como **curvas de Kaplan Meier**. El **nivel de significación estadística** considerado para los contrastes fue  **$p < 0,05$** . Los **gráficos** se crearon con **GraphPad**.

## 5.6. FINANCIACIÓN

Este estudio fue **financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía** con el código **PC-0522-2016-0522**. Fue aprobado por el CEI de Granada (Código PC-0267-2017, **Anexo I**) y cuenta con consentimiento informado firmado por los pacientes incluidos previamente a la extracción de las muestras (**Anexo II y III**).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA COHORTE A ESTUDIO

La cohorte a estudio incluyó **113 individuos**, de los cuales **42 (37,17%)** tenían **cirrosis hepática (CH) sin CHC** y **71 (62,83%) CHC**. De los 71 pacientes con CHC, el 12,68% no tenían antecedentes de cirrosis hepática.

Los pacientes del estudio fueron **mayoritariamente hombres (79,65%)** siendo esta variable estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). La mayor parte de los pacientes del estudio eran de **raza caucásica** excepto el 1,77% (2/113) con CHC, que eran de raza negra.

Los 113 pacientes tenían una edad comprendida entre 32 y 86 años cuando fueron incluidos en el estudio. La **edad media en el grupo de cirróticos fue de  $66 \pm 9$  años y en el grupo de CHC fue de  $66 \pm 10$  años**. En cuanto a la edad de diagnóstico de cirrosis hepática, los pacientes tenían una edad comprendida entre 40 y 86 años, con una **edad media de diagnóstico de cirrosis en el grupo de cirróticos de  $61 \pm 10$  años y de  $62 \pm 11$  años en el grupo de CHC**.

La **etiología de la cirrosis más frecuente** en los pacientes de nuestro estudio fue secundaria al **alcohol** (35,40% del total de pacientes, 28,57% de los CH y 39,44% de los CHC), **seguida de la infección por VHC** en el 31,86% de los pacientes (47,62% de los CH y 22,54% de los CHC), **siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,045$ )**.

En cuanto a los **factores de riesgo cardiovascular (FRCV)**, cabe destacar que **el 46,02% de los pacientes eran fumadores**, el **50,44% eran hipertensos**, el 30,09% tenían diabetes mellitus y el 12,39% tenían hipercolesterolemia.

Todos los pacientes del **grupo de cirróticos tenían una función hepática clase A** según la escala de Child Pugh, mientras que en el **grupo de CHC el 71,64% eran Child Pugh A**, el 22,39% Child Pugh B y el 5,97% Child Pugh C. Estos resultados fueron **estadísticamente significativos ( $p < 0,0001$ )**. En 6 pacientes del estudio (2 CH y 4 CHC) no se calculó la función hepática mediante la escala Child Pugh por estar tomando sintrom.

En el análisis univariante de parámetros de función hepática se encontraron **diferencias estadísticamente significativas en los niveles de bilirrubina total ( $p = 0,034$ )**, **albúmina ( $p < 0,001$ )** y **actividad de protrombina ( $p < 0,001$ )**. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los **niveles de AFP basales ( $p < 0,001$ )**.

El análisis multivariante de las características clínicas de los pacientes no obtuvo resultados relevantes.

En la **Tabla 8** se resumen las **características clínicas** de los pacientes del estudio.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE			
	CH sin CHC n=42	CHC n=71	Valor p
<b>Sexo, n(%)</b>			<b>&lt;0,001***</b>
Mujer	16 (38,10%)	7 (9,90%)	
Hombre	26 (61,90%)	64 (90,10%)	
<b>Edad, media±DE</b>	<b>66±9</b>	<b>66±10</b>	0,784
Mujer	67±9	63±11	
Hombre	64±9	66±10	
<b>Años Dx cirrosis, media±DE</b>	<b>61±10</b>	<b>62±11</b>	0,529
Mujer	63±10	63±13	
Hombre	59±10	62±11	
<b>Etiología cirrosis hepática, n (%)</b>			<b>0,021**</b>
Alcohol	12 (28,57%)	28 (39,44%)	
VHC	20 (47,62%)	16 (22,54%)	
Alcohol+VHC	1 (2,38%)	9 (12,68%)	
VHB	1 (2,38%)	5 (7,04%)	
Alcohol+VHB	0 (0%)	1 (1,41%)	
EHGNA	3 (7,14%)	2 (2,82%)	
Hepatitis autoinmune	4 (9,52%)	0 (0%)	
Hemocromatosis	1 (2,38%)	1 (1,41%)	
Desconocida	0 (0%)	9 (12,68%)	
<b>FRCV, n (%)</b>			<b>0,011**</b>
Tabaco	8 (19,05%)	44 (61,97%)	
HTA	24 (57,14%)	33 (46,48%)	
DM	12 (28,57%)	22 (30,99%)	
Hipercolesterolemia	6 (14,29%)	8 (11,27%)	
Hipotiroidismo	3 (7,14%)	2 (2,82%)	
Hiperuricemia	1 (2,38%)	2 (2,82%)	
<b>Niveles bilirrubina mg/dL, media±DE</b>	<b>0,96±0,38</b>	<b>1,70±2,82</b>	<b>0,034**</b>
Mujer	0,90±0,44	1,16±1,89	
Hombre	1,0±0,34	1,76±2,91	
<b>Niveles albúmina g/dL, media±DE</b>	<b>4,10±0,40</b>	<b>3,70±0,60</b>	<b>&lt;0,001***</b>
Mujer	3,90±0,40	3,70±0,70	
Hombre	4,20±0,30	3,70±0,60	
<b>Nº Plaquetas 10<sup>6</sup>/L, media±DE</b>	<b>146,524±78,641</b>	<b>152,052±103,980</b>	0,767
Mujer	151,125±69,214	173,957±172,546	
Hombre	143,692±85,125	149,656±95,491	
<b>INR, media±DE</b>	<b>1,13±0,35</b>	<b>1,23±0,32</b>	0,116
Mujer	1,26±0,54	1,12±0,18	
Hombre	1,05±0,12	1,25±0,33	
<b>Act de protrombina %, media±DE</b>	<b>90±21</b>	<b>77±18</b>	<b>&lt;0,001***</b>
Mujer	84±27	83±77	
Hombre	94±16	77±18	
<b>AFP basal ng/mL, media±DE</b>	<b>6,13±16,65</b>	<b>1.111,62±4.685,08</b>	<b>&lt;0,001***</b>
Mujer	11,15±27,64	5.333,91±13.330,00	
Hombre	3,32±1,38	619,03±2.030,34	
<b>Child Pugh, n (%)</b>			<b>&lt;0,0001***</b>
A (5-6)	40 (100%)	48 (71,64%)	
B (7-9)	0	15 (22,39%)	
C (10-15)	0	4 (5,97%)	

**Tabla 8. Características clínicas de los pacientes del estudio.** Las abreviaturas son: CH, cirrosis hepática; CHC, carcinoma hepatocelular; n, número de individuos; DE, desviación típica o estándar; Dx, diagnóstico; VHC, virus de la hepatitis C; VHB, virus de la hepatitis b; EHGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólica; FRCV, factores de riesgo cardiovascular; HTA, hipertensión arterial; DM, diabetes mellitus; Nº, número; INR, índice internacional normalizado; Act, actividad; AFP, alfa-fetoproteína. Para los análisis cuantitativos, se usaron las pruebas t-student y Mann-Whitney dependiendo de la normalidad de los datos. Para los datos cualitativos, se utilizó Chi-Cuadrado excepto en aquellos casos con menos del 20% de los datos con frecuencias esperadas menores a 5, en cuyo caso, se utilizó la prueba de Fisher.



En el grupo de cirróticos ningún paciente tenía antecedentes personales oncológicos mientras que **en el grupo de CHC el 15,49% (11/71) tenían antecedente personal de otros cánceres diferentes al CHC**. No se observaron diferencias relevantes en sus CECs en la muestra basal al diagnóstico de CHC. Los antecedentes personales oncológicos se resumen en la **Tabla 9**.

ANTECEDENTES PERSONALES ONCOLÓGICOS	
<b>Tumor primario antes del CHC</b>	<b>Nº CECs y fenotipo en muestra basal</b>
1 cáncer renal células claras	3 CECs ASGR1-
1 adenocarcinoma de colon	No CECs
1 adenocarcinoma de colon	2 CECs ASGR1+
1 adenocarcinoma de colon	4 CECs ASGR1- y 1 CEC ASGR1+
2 adenocarcinoma de próstata	1 CEC ASGR1+
1 cáncer basocelular nasal	2 CECs ASGR1-
1 cáncer vesical	3 CECs ASGR1+
<b>Tumor primario posterior al CHC</b>	<b>Nº CECs y fenotipo en muestra basal</b>
1 adenocarcinoma de pulmón	No CECs
1 adenocarcinoma de pulmón	1 CEC ASGR1- y 1 CEC ASGR1+
1 carcinoma epidermoide cervical	5 CECs ASGR1-

**Tabla 9. Antecedentes personales oncológicos de los pacientes del grupo de hepatocarcinoma y CECs en muestra basal.** Las abreviaturas son: CHC, hepatocarcinoma; Nº, número; CECs, células epiteliales circulantes; ASGR1, receptor de asialoglicoproteína 1.

**El 64,79% (46/71) de los pacientes con CHC de nuestro estudio se encontraban asintomáticos** en el momento del diagnóstico. **El dolor abdominal fue el síntoma más frecuente**, presente en el 18,31% (13/71) de los CHC. **Ver Tabla 10.**

SINTOMATOLOGÍA AL DIAGNÓSTICO DE CHC (n=71)	
<b>Asintomáticos, n (%)</b>	46 (64,79%)
<b>Dolor abdominal, n (%)</b>	13 (18,31%)
<b>Descompensación ascítica, n (%)</b>	7 (9,86%)
<b>Síndrome constitucional, n (%)</b>	4 (5,63%)
<b>Ictericia, n (%)</b>	1 (1,41%)

**Tabla 10. Sintomatología al diagnóstico de hepatocarcinoma.** Las abreviaturas son: CHC, hepatocarcinoma; n, número de individuos.

El **diagnóstico definitivo de CHC** precisó la realización de **TC y RM dinámicas en el 39,44% (28/71)** de los pacientes para el diagnóstico y estadificación definitivos. Cabe destacar que **en el 8,45% (6/71) de los pacientes con CHC fue preciso el diagnóstico mediante biopsia de la lesión**, al no tener en las pruebas de imagen un patrón específico de CHC. La localización del CHC más frecuente fue el lóbulo hepático derecho en el 52,11% (37/71) y la

mayor parte de los pacientes (97,18%, 69/71) tenían CHC nodular, presentando el 56,52% (39/69) un nódulo único. El 47,89% (34/71) de los pacientes cumplían los criterios de Milán y **solo el 2,82% (2/71) tenían metástasis extrahepática** de localización pulmonar en el momento del diagnóstico. **Ver Tabla 11.**

<b>DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE EXTENSIÓN DE CHC (n=71)</b>	
<b>Técnica diagnóstica definitiva, n (%)</b>	
TC dinámico	22 (30,99%)
RM dinámica	15 (21,13%)
TC + RM dinámicos	28 (39,44%)
Biopsia de lesión	6 (8,45%)
<b>Localización, n (%)</b>	
LHD	37 (52,11%)
LHI	18 (25,35%)
Bilobar	16 (22,54%)
<b>Forma de presentación, n (%)</b>	
Nodular	69 (97,18%)
Difuso	2 (2,82%)
<b>Nº nódulos, n (%)</b>	
Nódulo único	39 (56,52%)
< 3 nódulos	15 (21,74%)
> 3 nódulos	15 (21,74%)
<b>Diámetro nódulo principal, n (%)</b>	
< 5 cm	37 (53,62%)
> 5 cm	20 (28,99%)
> 10 cm	12 (17,39%)
<b>Invasión vascular, n (%)</b>	
No	64 (90,14%)
Si	7 (9,86%)
<b>Trombosis portal, n (%)</b>	
No	69 (97,18%)
Si	2 (2,82%)
<b>Metástasis extrahepática, n (%)</b>	
No	69 (97,18%)
Si	2 (2,82%)

**Tabla 11. Técnicas para el diagnóstico definitivo de hepatocarcinoma y estudio de extensión locorregional y a distancia.** Las abreviaturas son: CHC, hepatocarcinoma; n, número de individuos; TC, tomografía axial computarizada; RM, resonancia magnética; LHD, lóbulo hepático derecho; LHI, lóbulo hepático izquierdo; Nº, número.

Teniendo en cuenta la carga tumoral, la función hepática y el estado general de los pacientes, se estadificaron según la **clasificación BCLC (Tabla 12)**, siendo la mayoría **BCLC A (39,44%)** y **BCLC B (29,58%)**.

ESTADIFICACIÓN CHC (n=71)	
BCLC 0, n (%)	2 (2,82%)
BCLC A, n (%)	28 (39,44%)
BCLC B, n (%)	21 (29,58%)
BCLC C, n (%)	11 (15,49%)
BCLC D, n (%)	9 (12,68%)

**Tabla 12.** Estadificación según clasificación Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC). Las abreviaturas son: CHC, hepatocarcinoma; n, número de individuos.

En cuanto al tratamiento recibido, **solo el 22,54% (16/71) de los pacientes se realizaron tratamiento quirúrgico** con intención curativa, de los cuales el 68,75% (11/16) fueron sometidos a THO. **El 63,38% (45/71) de los pacientes recibieron otros tratamientos no quirúrgicos** con intención de prolongar la supervivencia, siendo la TACE el tratamiento más frecuente (66,67%, 30/45). El 14,08% (10/71) de los pacientes recibieron únicamente tratamiento para el control de los síntomas ante la imposibilidad de administrar otros tratamientos. El tratamiento de los pacientes con CHC del estudio se resume en la **Tabla 13**.

La **respuesta al tratamiento recibido** se evaluó mediante TC o RM dinámicas y se resume en la **Tabla 13**. Cabe destacar que **el 25% (4/16) de los pacientes operados sufrieron recidiva tumoral y el 80% (36/45) de los no operados progresión tumoral**. Sólo el 4,44% (2/45) de los pacientes no intervenidos quirúrgicamente presentaron regresión tumoral.

**En el grupo de 42 pacientes con cirrosis hepática**, durante el seguimiento mediante cribado con ecografía abdominal cada 6 meses, **el 7,14% (3/42) fueron diagnosticados de CHC**:

- **2 pacientes fueron diagnosticados de CHC BCLC A** con tumores únicos menores de 3 cm a los 45 y 21 meses de la extracción de la muestra basal. Se les realizó resección hepática **sin signos de recidiva tumoral** en las pruebas de imagen de control. Estos dos pacientes no tenían CECs en la muestra basal extraída.
- **1 paciente se diagnosticó de CHC BCLC B** con tumor único de 6,5 cm a los 21 meses de la extracción de la muestra basal. Fue tratado mediante TACE, **sin recidiva tumoral** en prueba de imagen de control. Este paciente tenía CECs<sup>CK+ASGR1+</sup> en la muestra basal extraída.

**Al finalizar el seguimiento de la cohorte, el 59,98% (61/113) de los pacientes estaban vivos y el 44,25% (50/113) habían fallecido**. La **edad de éxitus** estuvo comprendida entre los 33 y los 87 años con una **media de 68±8 años**. En el grupo de CHC, el 81,82% (45/55) de los pacientes que no habían recibido tratamiento quirúrgico con intención curativa fallecieron, el 68,89% (31/45) debido a la progresión tumoral y el 20% (9/45) debido a complicaciones de la cirrosis hepática. Sin embargo, el 75% (12/16) de pacientes que recibieron tratamiento

quirúrgico estaban vivos, solo 3 pacientes fallecieron como consecuencia de recidiva tumoral. En la **Tabla 14** se detalla el estado de los pacientes al finalizar el seguimiento. También se describe la media de días entre la fecha de diagnóstico de CH o CHC y el éxitus según las diferentes causas de éxitus, destacando una supervivencia de  $419 \pm 280$  días en los pacientes fallecidos por progresión tumoral (ver **Tabla 14**). **Cabe destacar que las diferencias de supervivencia fueron estadísticamente significativas entre el grupo de CH y CHC ( $p < 0,0001$ ) y entre los CHC sometidos a tratamiento quirúrgico y no quirúrgico o paliativo ( $p < 0,0001$ ).**

TRATAMIENTO CHC (n=71)		RESPUESTA A TRATAMIENTO (n=71)	
<b>Tratamiento quirúrgico, n (%)</b>	<b>16 (22,54%)</b>	<b>Sin recidiva, n (%)</b>	<b>12 (75%)</b>
Resección hepática	5 (31,25%)	Resección hepática	2 (16,67%)
THO	11 (68,75%)	THO	10 (83,33%)
		<b>Recidiva, n (%)</b>	<b>4 (25%)</b>
		Resección hepática	3 (75%)
		THO	1 (25%)
<b>Tratamiento no quirúrgico, n (%)</b>	<b>45 (63,38%)</b>	<b>Regresión tumoral, n (%)</b>	<b>2 (4,44%)</b>
Radiofrecuencia	5 (11,11%)	Radiofrecuencia	0 (0%)
TACE	30 (66,67%)	TACE	1 (50%)
Sorafenib	10 (22,22%)	Sorafenib	1 (50%)
		<b>Lesión estable, n (%)</b>	<b>7 (15,56%)</b>
		Radiofrecuencia	1 (14,29%)
		TACE	6 (85,71%)
		Sorafenib	0 (0%)
		<b>Progresión tumoral, n (%)</b>	<b>36 (80%)</b>
		Radiofrecuencia	4 (11,11%)
		TACE	23 (63,89%)
		Sorafenib	9 (25%)
<b>Tratamiento control de síntomas, n (%)</b>	<b>10 (14,08%)</b>	<b>No procede, n (%)</b>	<b>10 (100%)</b>

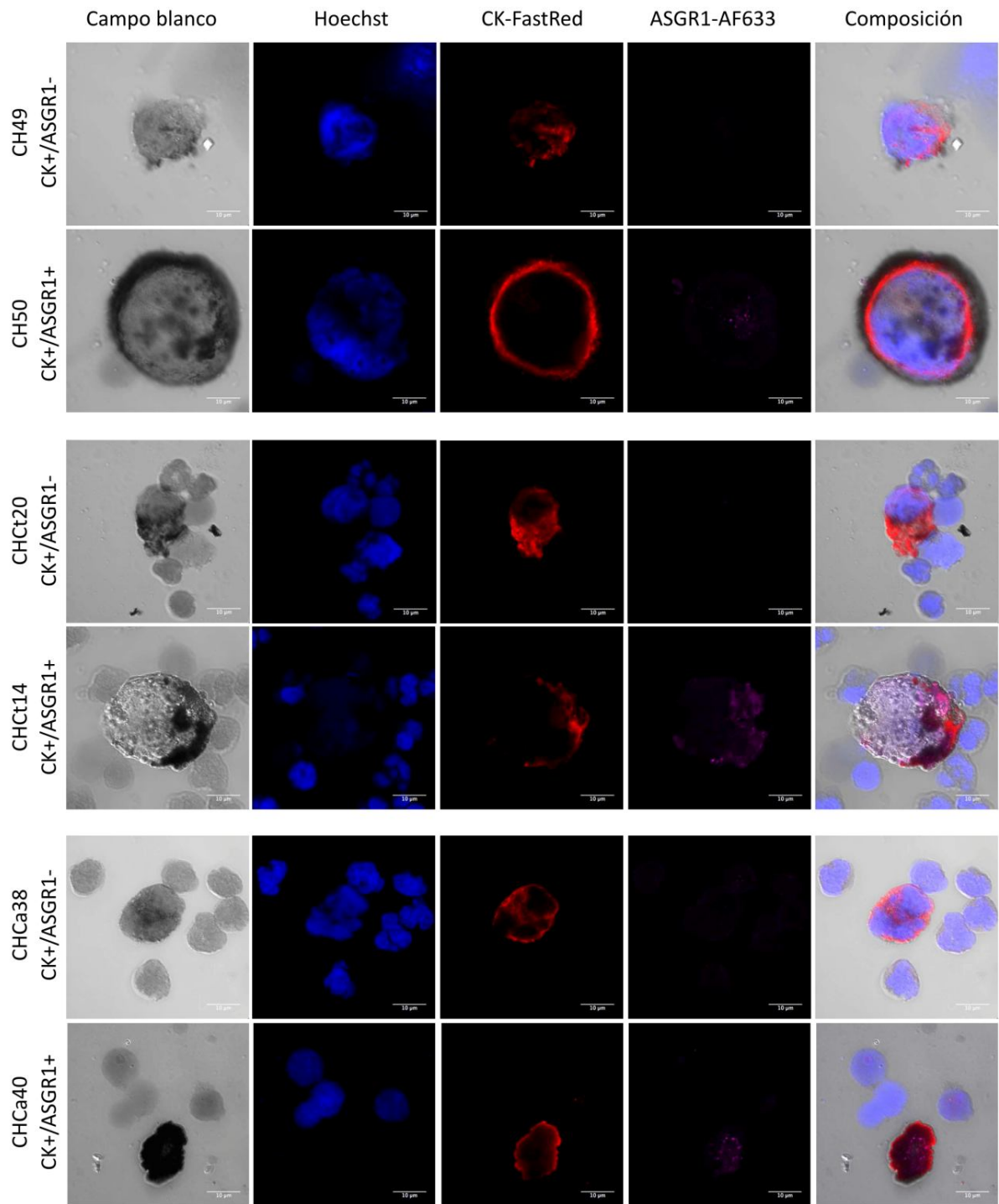
**Tabla 13. Tratamiento realizado a los pacientes con hepatocarcinoma y respuesta al mismo evaluada mediante TC o RM dinámicas.** Las abreviaturas son: CHC, hepatocarcinoma; n, número de individuos; THO, trasplante hepático ortotópico; TACE, quimioembolización transarterial (del inglés: transarterial chemoembolization).

ESTADO DE LA COHORTE AL FINALIZAR SEGUIMIENTO (n=113)	
Grupo CH (n=42)	
Vivos, n (%)	41 (97,62%)
Fallecidos, n (%)	1 (2,38%)
Infección respiratoria, n (días SV)	1 (2.036)
Grupo CHC (n=71)	
<b>Tratamiento Qx (n=16)</b>	
Vivos, n (%)	12 (75%)
Fallecidos, n (%)	4 (25%)
Recidiva tumoral, n (media días SV ± DE)	3 (656 ± 321)
Autólisis, n (días SV)	1 (1.546)
<b>Tratamiento no Qx o paliativo (n=55)</b>	
Estado desconocido, n (%)	2 (3,64%)
Vivos, n (%)	8 (14,54%)
Fallecidos, n (%)	45 (81,82%)
Progresión tumoral, n (media días SV ± DE)	31 (419 ± 280)
Complicaciones CH, n (media días SV ± DE)	9 (490 ± 165)
Infecciones respiratorias, n (media días SV ± DE)	4 (550 ± 288)
Insuficiencia cardíaca, n (días SV)	1 (982)

**Tabla 14. Estado de los pacientes de la cohorte al finalizar el seguimiento.** Las abreviaturas son: CH, cirrosis hepática, n, número de individuos; CHC, hepatocarcinoma; SV, supervivencia; Qx, quirúrgico; DE, desviación típica o estándar. Nota: para los fallecidos se han calculado los días desde el diagnóstico de CH hasta el éxitus en el grupo de CH y la media de días y desviación estándar desde el diagnóstico de CHC hasta el éxitus en el grupo de CHC.

## 6.2. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA Y HEPATOCARCINOMA

Se detectaron CECs en 78 pacientes (69,03%), siendo significativamente más frecuente en pacientes con CHC (54/71; 76,05%) que en pacientes sin CHC (24/42; 57,14%) ( $p=0,023$ ). Destaca la **heterogeneidad fenotípica de las CECs en base a ASGR1** tanto intra como interindividualmente. En particular, se identificaron dos fenotipos: ASGR1 positivo (CK+/ASGR1+) y negativo (CK+/ASGR1-), con diferentes intensidades y tamaños (**ver Figura 20**). No se observaron diferencias significativas entre los fenotipos ASGR1 positivo (46/78; 58,97%) y ASGR1 negativo (32/78; 41,03%) ( $p=0,33$ ), siendo la **expresión de ASGR1 más prevalente en cirróticos** (17/24; 70,83%) que en pacientes con CHC (29/54; 53,70%). En cuanto al número de CECs, fueron significativamente más numerosas en pacientes con CHC ( $p<0,0002$ ), como se puede comprobar en la **Tabla 15**.

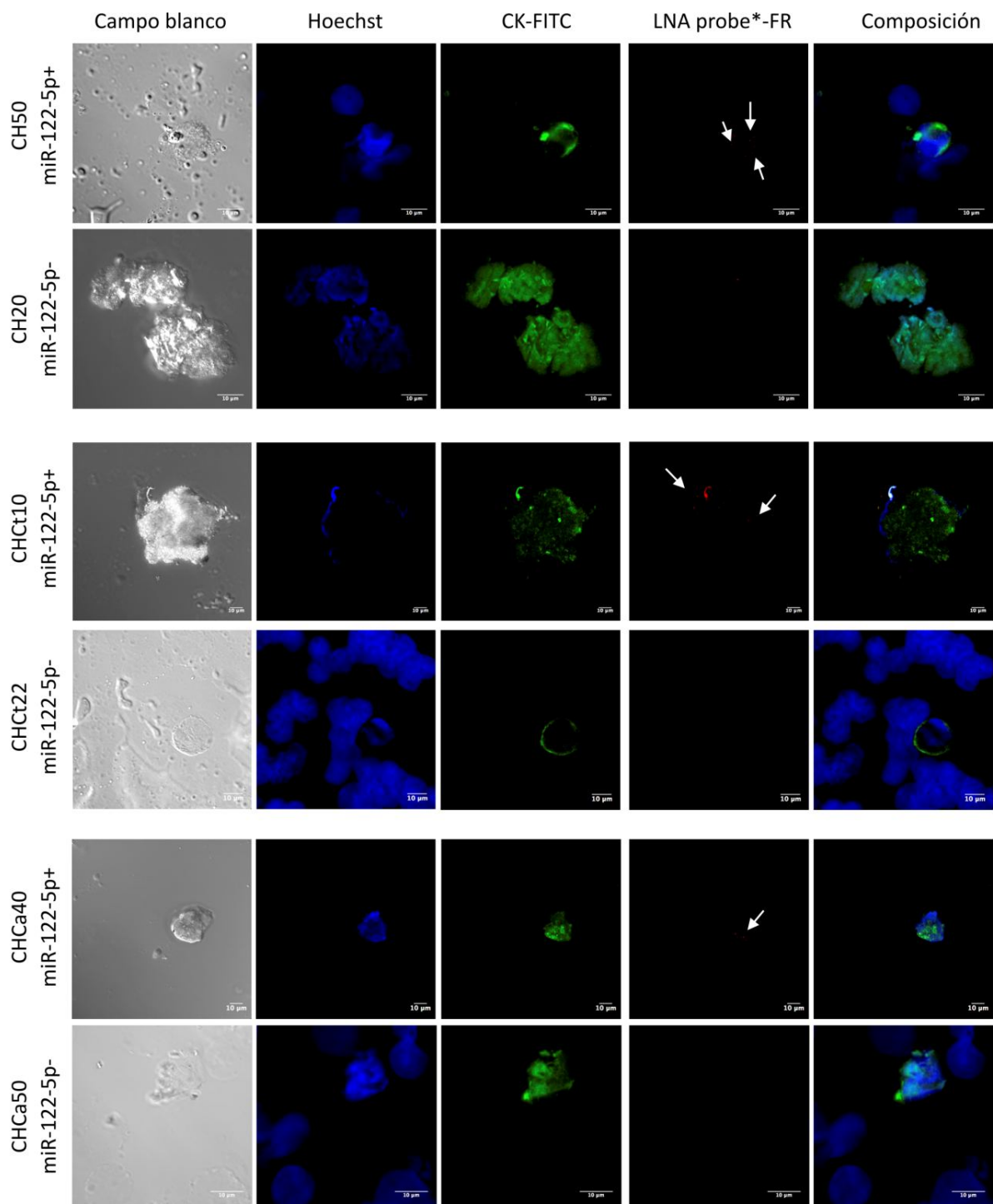


**Figura 20. Heterogeneidad de las CECs respecto a la expresión de Citokeratina (CK) y ASGR1 en pacientes con cirrosis hepática y CHC.** La figura está dividida en tres partes: la parte superior muestra dos pacientes con CH (cirrosis hepática); la parte central muestra dos CHCt (hepatocarcinoma en estadio precoz o temprano) y las dos de abajo muestran CHCa (hepatocarcinoma avanzado). En cada caso, se muestra una CEC positiva para los dos marcadores (CK y ASGR1) y una CEC negativa para ASGR1. Hoescht: tinción nuclear.

	CH sin CHC n=42	CHC n=71	Valor p
<b>Fenotipo CECs, n (mediana, rango IQ)</b>			<b>0,044**</b>
CK+/ASGR1+	17 (2;4)	29 (2;2)	
CK+/ASGR1-	7 (1;4)	25 (1;7)	
Negativo	18 (0)	17 (0)	
<b>Suma total de CECs</b>	<b>51</b>	<b>122</b>	<b>0,0002***</b>
CK+/ASGR1+	36	48	
CK+/ASGR1-	15	74	

**Tabla 15. Distribución del número de CECs y los fenotipos ASGR1+ y ASGR1- en el grupo de cirrosis hepática y CHC.** Las abreviaturas son: CH, cirrosis hepática; n, número de individuos; CHC, hepatocarcinoma; CECs, células epiteliales circulantes; rango IQ, rango intercuartílico; CK, citoqueratina; ASGR1, receptor de asialoglicoproteína-1.

Es importante destacar que **todas CECs con fenotipo ASGR1 positivo también mostraron positividad para el marcador específico de hígado miR-122-5p (Ver Figura 21, filas 1,3 y 5),** demostrando su origen hepático. Por el contrario, la ausencia de miR-122-5p se observó en todos los pacientes con CECs con tinción ASGR1 negativa (Ver Figura 21, filas 2,4 y 6).

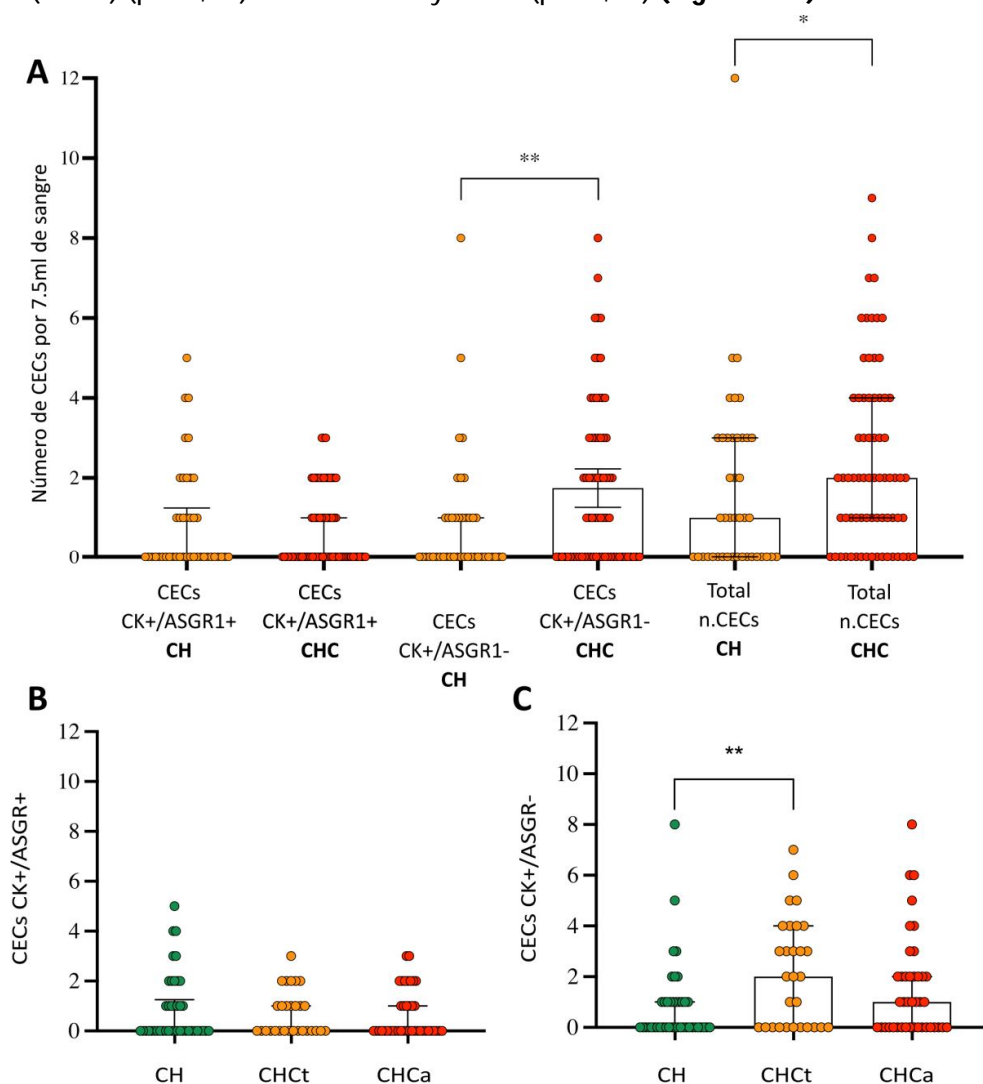


**Figura 21. Imágenes de microscopía confocal de inmunofISH en pacientes con cirrosis hepática y CHC.** La CK se muestra en verde (FITC) y la sonda miR122-5p se muestra en rojo. La figura está dividida en tres partes: la parte superior muestra dos pacientes con CH (cirrosis hepática); la parte central muestra dos CHCt (hepatocarcinoma en estadio precoz o temprano) y las dos de abajo muestran CHCa (hepatocarcinoma avanzado). Para cada grupo de pacientes, se muestra una señal de miR-122-5p positiva (que coincide con la tinción ASGR1 positiva) y una señal de miR-122-5p negativa (que coincide con la tinción ASGR1 negativa). Hoescht: tinción nuclear.



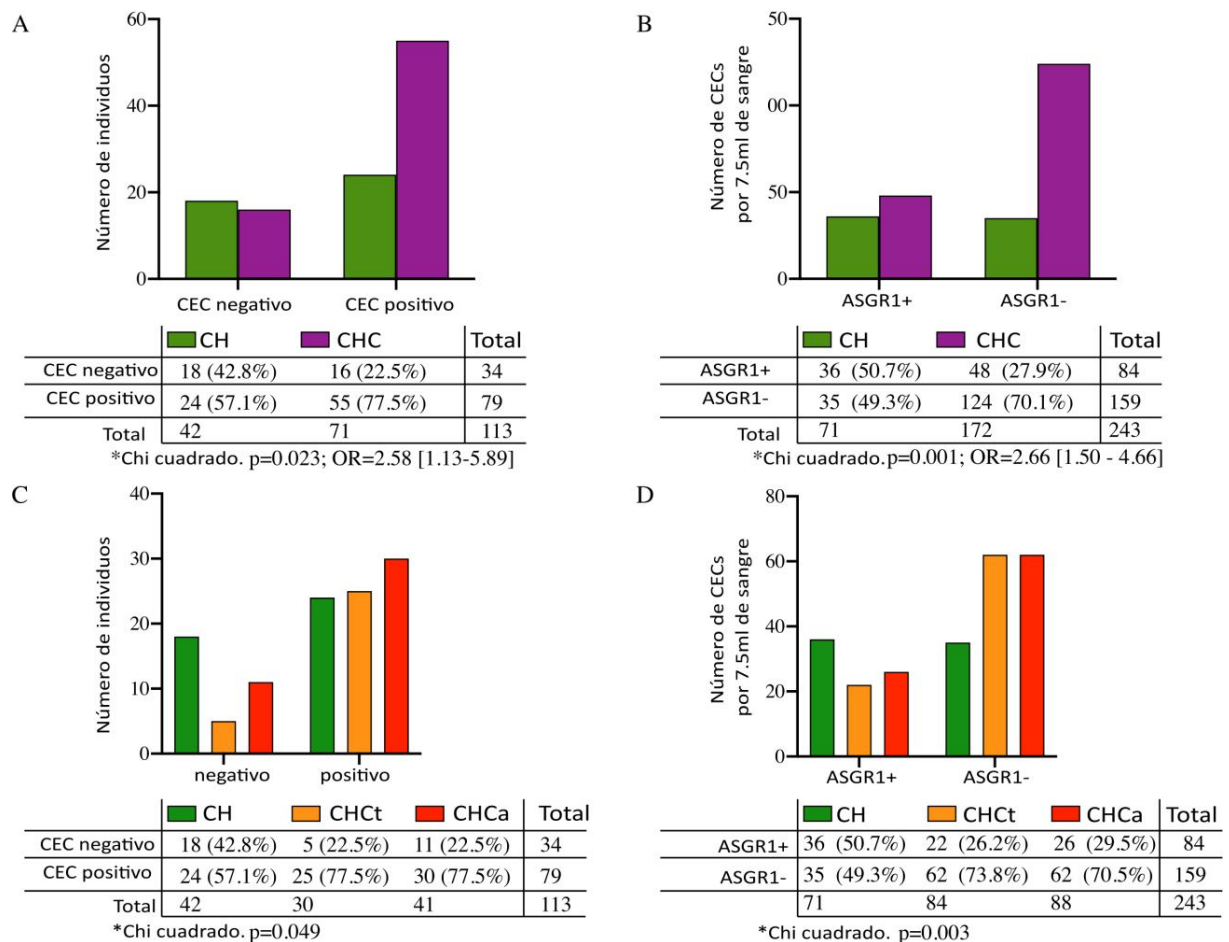
### 6.3. CORRELACIÓN DE LOS FENOTIPOS DE CÉLULAS EPITELIALES CIRCULANTES CON LOS DATOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS

La cantidad de CECs<sup>CK+/ASGR1-</sup> fue significativamente mayor en pacientes con CHC que en pacientes cirróticos ( $p = 0,0096$ ), incrementando de forma significativa el recuento total de CECs en pacientes con CHC respecto a los pacientes cirróticos ( $p = 0,035$ ) (Figura 22A). Además, al tener en cuenta el estadio de la enfermedad: temprano (BCLC 0-A) o avanzado (BCLC B-C-D), no se observaron diferencias para la población ASGR1+ (Figura 22B). Sin embargo, las pruebas de Kruskal Wallis revelaron que el número de CECs con ausencia de expresión de ASGR1 fue significativamente diferente entre los distintos estadios de la enfermedad ( $p = 0,017$ ). Hubo un aumento significativo de CECs<sup>CK+/ASGR1-</sup> entre cirróticos y CHC en estadios tempranos (CHCt) ( $p = 0,0051$ ) pero no entre cirróticos y CHC en estadios avanzados (CHCa) ( $p = 0,08$ ) o entre CHCt y CHCa ( $p = 0,23$ ) (Figura 22C).



**Figura 22. Recuento de CECs en sangre periférica en pacientes con cirrosis hepática o CHC.** Las CECs se han caracterizado mediante tinción doble (CK+/ASGR1+) o tinción simple (CK+/ASGR1-) en pacientes con cirrosis hepática (CH) y carcinoma hepatocelular (CHC) (Figura 22A). Los CHC se dividen en estadios tempranos (CHCt) y estadios avanzados (CHCa) tanto para tinción doble (Figura 22B) como simple (Figura 22C). Los valores de p para la prueba de Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples son:  $**p = 0,0096$  (A) y  $*p = 0,035$  (A) y  $**p = 0,0051$  (C).

**Nuestros resultados sugieren que tanto la presencia de CECs como la ausencia de la expresión de ASGR1 en CECs son biomarcadores de riesgo de CHC.** De hecho, la presencia de CECs aumentó el riesgo de CHC en 2,58 veces ( $p = 0.023$ ) (**Figura 23A**) y el número de CECs sin expresión de ASGR1 aumentó significativamente ( $p = 0,001$ ) el riesgo de desarrollar CHC en 2,66 veces (**Figura 23B**). Significativamente, una mayor proporción de pacientes con CHCa y CHCt tenían CECs (tanto ASGR1+ como ASGR1-) en comparación con los pacientes cirróticos ( $p = 0,049$ ) (**Figura 23C**) y este aumento se acompañó de una reducción significativa en el número de CECs que expresan ASGR1 en CHC en comparación con cirróticos ( $p = 0,003$ ) (**Figura 23D**).

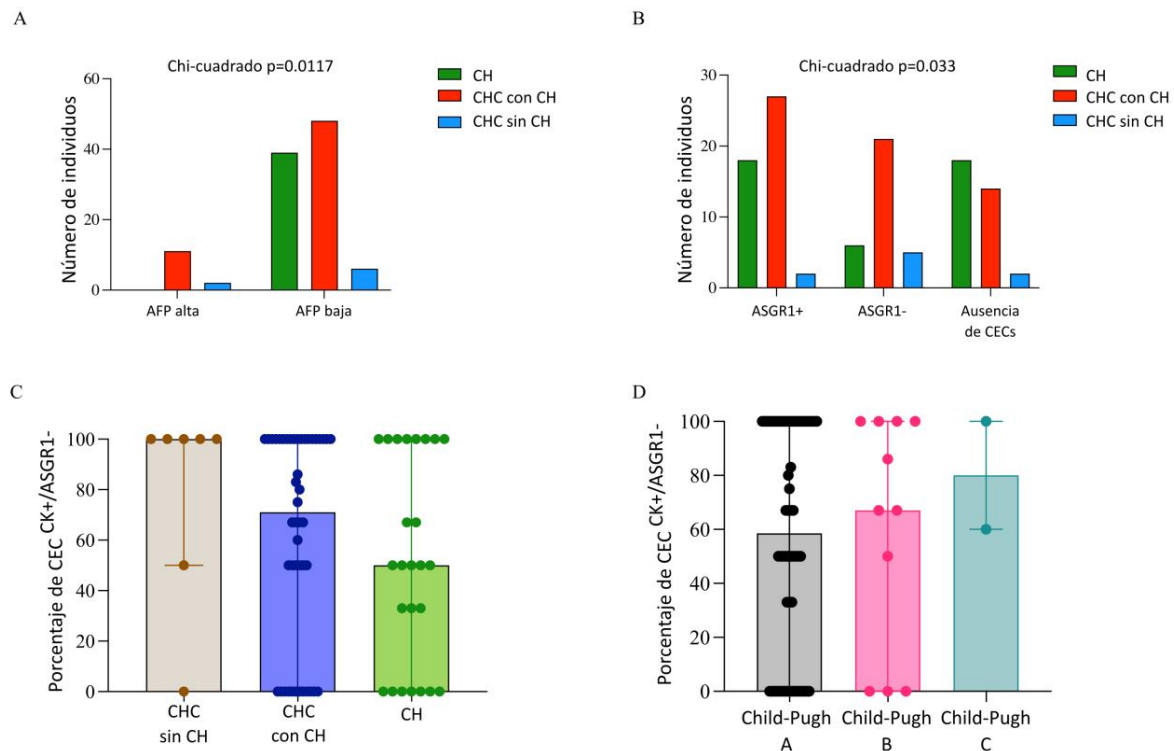


**Figura 23. Factores de riesgo para CHC.** **Figura 23A.** Muestra la presencia/ausencia de CECs y la **Figura 23B.** muestra el número de CECs que expresan ASGR1 o no la expresan, en cirrosis hepática (CH) o en pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC). **Figuras 23C y D.** muestran la misma información que en A y B respectivamente, pero dividiendo a los individuos con CHC entre los estadios tempranos (CHCt) o estadios avanzados de la enfermedad (CHCa).

Al analizar los niveles patológicos de AFP, 13/13 pacientes (100%) con AFP superior a 400 ng/mL tenían CHC (11 de los cuales tenían cirrosis hepática previa). Sin embargo, **una proporción significativa ( $p = 0,0117$ ) de individuos con niveles inferiores a 400 mg/dL de AFP (54/93; 58,06%) también tenían CHC, lo que demuestra la escasa utilidad de la AFP para identificar individuos con alto riesgo de CHC (Figura 24A).** En cuanto a la AFP en el seguimiento de los pacientes con cirrosis hepática, se mantuvo estable en todos los

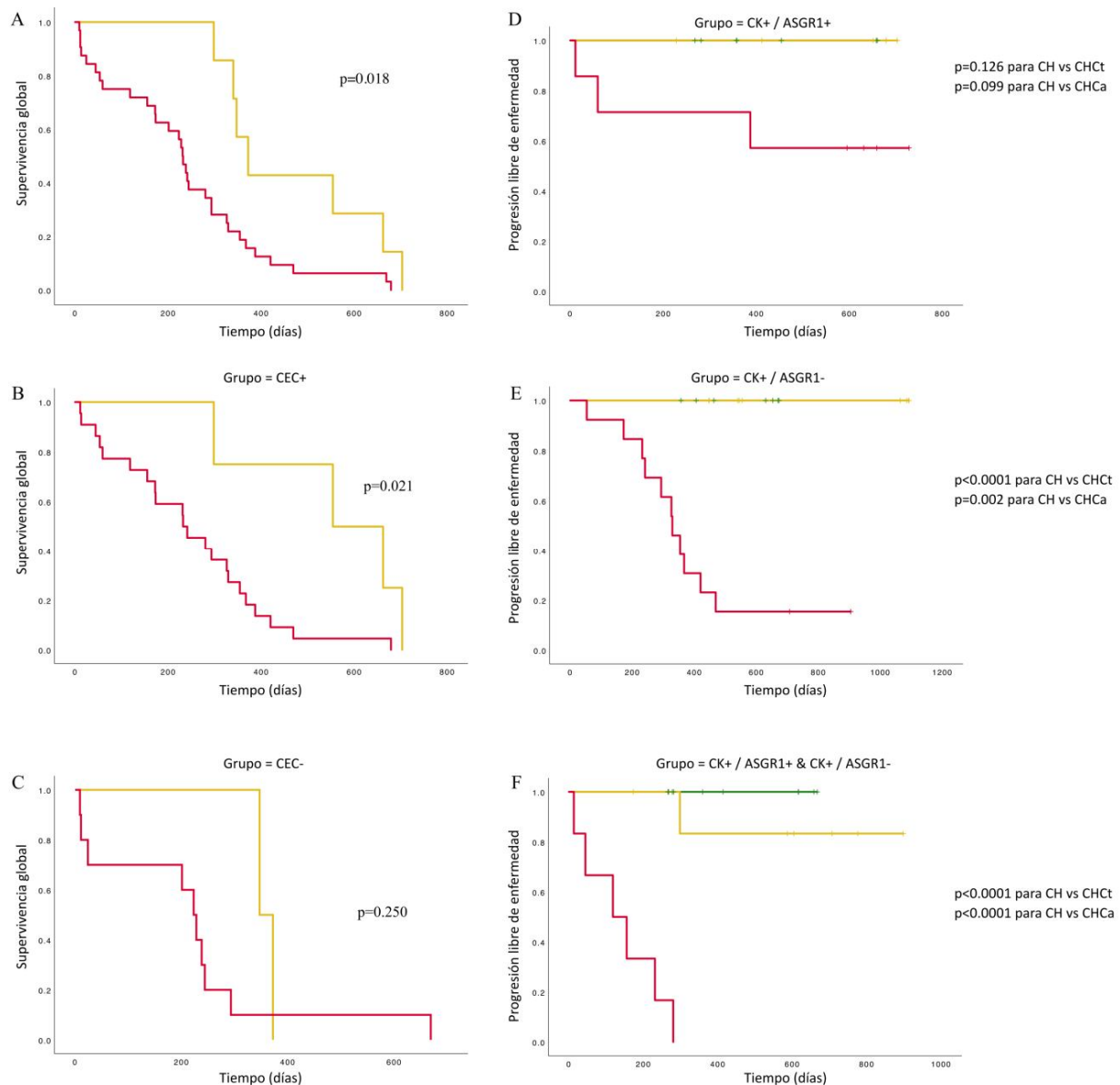
pacientes durante el seguimiento, excepto en uno de los pacientes, coincidiendo con el desarrollo de CHC. No se elevó en los otros 2 pacientes con cirrosis hepática que desarrollaron CHC, lo que apoya la escasa utilidad de este marcador.

**Curiosamente, se encontraron diferencias significativas en la expresión de ASGR1 al analizar la concurrencia de cirrosis hepática y CHC ( $p = 0,033$ ).** Así, del total de individuos con CECs negativas para expresión la de ASGR1, la mayoría eran pacientes con CHC con antecedentes cirrosis hepática (65,63%; 21/32). No se encontraron diferencias entre los pacientes con cirrosis hepática sin CHC (18,75%; 6/32) y CHC sin cirrosis hepática subyacente (5/32; 15,63%). Por el contrario, la expresión positiva de ASGR1 en CECs fue más frecuente en los pacientes con cirrosis hepática (42,86%; 18/42) que pacientes con CHC sin cirrosis hepática subyacente (22,22%; 2/9), lo que sugiere que los pacientes con cirrosis hepática (independientemente de la coexistencia de CHC) son más propensos a tener CECs con expresión positiva de ASGR1 (**Figura 24B**). De hecho, los pacientes con CHC sin cirrosis hepática subyacente tuvieron un mayor porcentaje de CECs ASGR1 negativa (mediana 100%) en comparación con los pacientes con CHC y cirrosis hepática (mediana 71%) y cirrosis hepática sin CHC (mediana 51%), aunque esta diferencia no fue significativa ( $p = 0,21$ ) (**Figura 24C**). Además, se observó que el porcentaje de CECs sin expresión ASGR1 aumenta con la disfunción hepática según la puntuación de la escala Child Pugh (**Figura 24D**), aunque este aumento no fue significativo ( $p = 0,74$ ). A su vez, la expresión de ASGR1 en CECs se correlacionó negativamente con el INR ( $p = 0,025$ ). **Se concluye así que la presencia de CECs con expresión negativa de ASGR1 se relaciona significativamente con la aparición de cáncer ( $p = 0,012$ ).**



**Figura 24. Relación entre la caracterización de las CECs y las características clínicas y patológicas en pacientes con cirrosis hepática o CHC.** **Figura 24A.** Muestra los niveles de AFP dividida en alta (>400 ng/mL) y baja (<400 ng/mL) para tres grupos de pacientes: CH = cirrosis hepática; CHC con cirrosis hepática subyacente y CHC sin cirrosis hepática. **Figura 24B.** Muestra la distribución de frecuencias de las CECs para los mismos grupos de pacientes. **Figuras 24C y D.** Representan los porcentajes de CECs con falta de expresión de ASGR1 para los tres grupos de pacientes (**C**) o puntuación en la escala de Child-Pugh (**D**). Los valores de p para las pruebas de Chi-cuadrado se muestran en los gráficos (**A, B**). No existen diferencias significativas en C y D para las pruebas de Kruskal Wallis.

Finalmente, como era esperado, **los pacientes con CHC en estadios tempranos mostraron significativamente mayor supervivencia global (SG) que los pacientes con CHC avanzado (p = 0,018) (Figura 25A).** Sin embargo, esta diferencia sólo se observó en pacientes con CECs (**Figura 25B; p = 0,021**) y no en pacientes sin CECs (**Figura 25C; p = 0,250**). Además, la supervivencia libre de progresión (SLP) fue significativamente diferente en los dos fenotipos de CECs: mientras que no se observaron diferencias significativas en las CECs positivas para ASGR1 (**Figura 25D; p = 0,126, p = 0,099** para cirróticos sin CHC en comparación con CHCt o CHCa, respectivamente), si se observó una SLP significativa en las CECs con expresión negativa de ASGR1 (**Figura 25E; p < 0,0001, p = 0,002** para cirróticos sin CHC en comparación con CHCt o CHCa, respectivamente). De este modo, **la SLP fue significativamente menor en los pacientes con CHCa y CHCt en comparación con los pacientes con cirrosis hepática sin CHC al considerar el fenotipo de las CECs (Figura 25F; p < 0,0001).**



**Figura 25. Curvas de supervivencia en pacientes con cirrosis hepática o CHC teniendo en cuenta el fenotipo y el número de CECs.** La parte izquierda de la figura representa las curvas de supervivencia global (SG) para toda la población (**Figura 25A**), para los pacientes con CECs positivas (**Figura 25B**) y para los pacientes con CECs negativas (**Figura 25C**). Los colores son: amarillo→CHCt y rojo→CHCa. La parte derecha de la figura representa la supervivencia libre de progresión (SLP) para los pacientes con todas las CECs positivas para la expresión de ASGR1 (**Figura 25D**), pacientes con todas las CECs negativas para ASGR1 (**Figura 25E**) y pacientes con fenotipos de CECs heterogéneos (**Figura 25F**). Los colores son: verde→cirrosis hepática; amarillo→CHCt y rojo→CHCa.

#### 6.4. EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LAS CÉLULAS EPITELIALES CIRCULANTES TRAS EL TRATAMIENTO DE LOS CHC

Se extrajeron muestras a 36 CHC un mes tras el tratamiento para el análisis de CECs, los resultados se resumen en la **Tabla 16**. Cabe destacar que **en el grupo de pacientes con CHC sometidos a tratamiento quirúrgico con intención curativa el 66,67% (6/9) de los pacientes no tenían CECs un mes tras la resección o el trasplante hepático**. Sin embargo, en el grupo de pacientes no sometidos a tratamiento quirúrgico, sólo el 22,22% (6/27) perdió las CECs al mes post-tratamiento ( $p < 0,0001$ ).

Debido a los éxitus o salidas del estudio por comorbilidad u otros motivos, solo se extrajeron muestras a 27 pacientes a los 6 meses y a 12 pacientes a los 12 meses de la muestra basal, siendo este un número de muestras insuficiente para realizar el análisis de CECs y obtener resultados relevantes.

<b>SEGUIMIENTO DE CECs UN MES POST-TRATAMIENTO</b>	
<b>Tratamiento quirúrgico n=9</b>	
<b>Ausencia de CECs</b>	6 (66,67%)
<b>Tratamiento no quirúrgico n=27</b>	
<b>Ausencia de CECs</b>	6 (22,22%)
<b>Aparición de CECs</b>	4 (14,81%)
<b>Cambio fenotipo a ASGR1+</b>	4 (14,81%)
<b>Cambio fenotipo a ASGR1-</b>	3 (11,11%)
<b>Mismo fenotipo inicial</b>	10 (37,04%)

**Tabla 16. Seguimiento de CECs un mes post-tratamiento quirúrgico y no quirúrgico.** Las abreviaturas son: CECs, células epiteliales circulantes; n, número de individuos; ASGR1+, receptor asialoglicoproteína 1 positivo; ASGR1-, receptor asialoglicoproteína 1 negativo.

## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo se demuestra la idoneidad de dos biomarcadores específicos del hígado (ASGR1 y miR-122-5p) para la caracterización de CECs en pacientes con cirrosis hepática y CHC, así como su utilidad como biomarcadores pronósticos. Este estudio es una prueba de concepto en la que se demuestra que **la caracterización fenotípica con ASGR1 o genética con miR-122-5p permite estratificar el riesgo de los pacientes en etapas más tempranas de la enfermedad**, objetivo principal de la medicina de precisión en la actualidad. Además, ASGR1 y miR-122-5p ayudan a identificar el origen hepático de las CECs.

Como se resaltó en la introducción, actualmente existe la necesidad de buscar herramientas para mejorar en el diagnóstico y estratificación del riesgo de CHC. Se sabe que la presencia de CTCs en estadios avanzados de la enfermedad es un marcador de alto riesgo de metástasis<sup>229</sup> y que la presencia de CTCs después de la resección quirúrgica es un marcador pronóstico para la SLP en pacientes con CHC<sup>226</sup>. Qui et al<sup>194</sup> identificaron CTCs en más de la mitad de los pacientes con CHC en estadio temprano (BCLC 0-A) lo que sugiere que las CTCs pueden ser una herramienta muy útil para la intercepción del cáncer<sup>172</sup>. Sin embargo, en la actualidad existen muy pocos estudios que aborden la identificación y caracterización de CECs en enfermedades pretumorales como la cirrosis hepática<sup>217</sup>.

### 7.1. UTILIDAD DE ASGR1 EN CHC

La expresión predominante de **ASGR1** en los sinusoides hepáticos y membranas hepatocelulares basolaterales hacen de esta proteína un importante biomarcador de CHC. Dada su función de supresión tumoral, **se ha investigado su utilidad en terapias dirigidas para el CHC**. Por ejemplo, en el estudio realizado por Kim et al<sup>236</sup> se evaluó la administración de oligonucleótidos antisentido (ASO) conjugados con N-acetilgalactosamina (GalNAc) y su captación selectiva por ASGR como un enfoque terapéutico para atacar vías difíciles de fármacos en el CHC. Este estudio demostró que la actividad de los ASO conjugados con GalNAc fue superior a la del ASO parental no conjugado en células CHC humanas ASGR+ *in vitro*, pero no en células con expresión negativa de ASGR. La conjugación de GalNAc mejoró la actividad de ASO en CTCs humanas de pacientes con CHC, lo que sugiere su potencial utilidad en células tumorales primarias de CHC humano<sup>236</sup>. Otro estudio que utilizó ASGR1 en terapias dirigidas frente a CHC fue el realizado por Chen et al<sup>268</sup>, donde se evaluó la actividad y toxicidad de células T modificadas con receptor de antígeno quimérico (CAR-T) coexpresando glipicano-3 (GPC-3) y ASGR1 (células CAR-T de doble objetivo). En este estudio las células CAR-T de doble objetivo mostraron una secreción de citoquinas, proliferación y capacidad antiapoptosis significativamente mayores contra las células tumorales que portan ambos antígenos que las células CAR-T de un solo objetivo *in vitro*. Además, las células CAR-T de doble objetivo mostraron una potente actividad de supresión del crecimiento en xenoinjertos tumorales de CHC GPC3+ASGR1+, mientras que no se

observó una supresión obvia del crecimiento con xenoinjertos tumorales negativos a antígeno simple o doble. Las células T de doble objetivo ejercieron una actividad anticancerígena superior y persistencia contra las células T de un solo objetivo en dos modelos de xenoinjerto de CHC GPC3+ASGR1+. Estos resultados sugieren que las células T que portan dos CAR complementarios contra GPC3 y ASGR1 pueden reducir el riesgo de toxicidad, manteniendo al mismo tiempo actividades antitumorales relativamente potentes en CHC GPC3+ASGR1+<sup>268</sup>. Nair et al<sup>269</sup> también utilizaron ASGR1 como diana terapéutica en su trabajo. Su estudio evaluó las nanopartículas de quitosano galactosiladas como portador específico del hígado para mejorar la eficacia terapéutica de la gemcitabina en el CHC al dirigirse a los ASGR1 expresados en los hepatocitos. Las nanopartículas se formularon (G1 – G5) mediante un método de gelificación iónica y se evaluaron diversas características fisicoquímicas. Se observó una rápida eliminación plasmática de gemcitabina (70% en 30 minutos) de G4 en ratas con CHC en comparación con el fármaco puro ( $p < 0,05$ ). La mayor absorción de gemcitabina predominantemente por parte del CHC (64 % de la dosis administrada;  $p < 0,0001$ ) demostró una excelente focalización hepática por parte del G4, al tiempo que mitigaba la toxicidad sistémica. Los exámenes morfológicos, bioquímicos e histopatológicos, así como los niveles sanguíneos del marcador tumoral alfafetoproteína, en ratas confirmaron el efecto curativo del G4. Por lo tanto, este estudio demostró una administración específica y una mayor eficacia anti-CHC *in vivo* de gemcitabina mediante G4, y en conclusión, podría funcionar como un portador eficaz en CHC, aunque hacen falta estudios en CHC humano<sup>269</sup>.

**Otras funciones de ASGR1 como la unión con el VHC para permitir la infección viral<sup>270</sup> o la promoción de la metástasis** mediante la interacción con lectinas a través de la vía EGFR-ERK en el microambiente tumoral<sup>271</sup>, se han relacionado con la inducción del CHC. También se ha estudiado ASGR1 en el campo de la **re población hepática y el trasplante de hepatocitos**, describiendo Ise et al<sup>272</sup> que los hepatocitos de ratón con niveles bajos de expresión de ASGR1 tienen un gran potencial proliferativo. Curiosamente, los hepatocitos que expresan niveles bajos de ASGR1 se caracterizaron como células progenitoras con niveles superiores de expresión de EFGR e integrinas  $\beta 1$  y  $\alpha 6$ <sup>272</sup>.

Además, se ha observado una **expresión variable de ASGR1 entre los diferentes estadios del tumor**. Así, Shi et al.<sup>273</sup> utilizando microarrays de tejido (basada en H-scores) demostraron que la expresión de ASGR1 en tejido adyacente normal era comparable a la de la cirrosis hepática con CHC en estadios tempranos (grado I o bien diferenciado), y que su expresión disminuyó significativamente conforme avanzaba el estadio tumoral. Esto sugiere que ASGR1 podría utilizarse como un indicador de enfermedad en estadio precoz. Asimismo, Witzigmann et al.<sup>250</sup> demostraron que existen niveles más bajos de ARNm de ASGR1 en CHC en comparación con su tejido normal adyacente, así como una reducción del ARNm de ASGR1 conforme avanza el estadio de CHC. También observaron una disminución de la expresión del ARNm de ASGR1 en tumores metastásicos o muy proliferativos (definido por la positividad de Ki69)<sup>250</sup>. Estos resultados coinciden con los



obtenidos en nuestro trabajo, donde **las CECs de los pacientes perdían la expresión de ASGR1 en los CHC avanzados**. Esto concuerda con las observaciones publicadas por Gu et al.<sup>248</sup> cuyo trabajo concluye que la sobreexpresión de ASGR1 inhibe la migración y la invasividad celular tanto *in vitro* como *in vivo*, suprimiendo la capacidad metastásica.

Un hallazgo a resaltar es que a pesar de su expresión mayoritaria en el hígado, ASGR1 también se expresa en otros tipos celulares como colon<sup>274</sup> o células mononucleares en sangre periférica<sup>275</sup>, pero en niveles más bajos en comparación con los hepatocitos. En nuestro trabajo, también se ha observado cierto nivel de expresión de ASGR1 en células mononucleares de sangre periférica en algunos individuos (estos datos no han sido descritos en resultados, al ser en pacientes puntuales). Actualmente se sabe que una de las funciones de ASGR1 es el aclaramiento de plaquetas y otros componentes protrombóticos sanguíneos<sup>276</sup>, por lo que su presencia en las células mononucleares podría ser debida a esta función en el proceso de homeostasia sanguínea. De hecho, en nuestro trabajo se muestran correlaciones significativas entre las CECs con expresión positiva de ASGR1 y el INR ( $p = 0,025$ ), así como con la actividad de protrombina ( $p = 0,006$ ), validando así el papel de ASGR1 en el mantenimiento de la homeostasis sanguínea. Además, el porcentaje de CECs con expresión de ASGR1 disminuyó a medida que aumentaba la puntuación en la escala Child Pugh. Como se detalló en la introducción, esta escala aumenta de puntuación con la disfunción de la coagulación y por tanto, con la disfunción hepática.

Todo lo anteriormente descrito **demuestra la utilidad de ASGR1 como biomarcador pronóstico** en etapas tempranas de la enfermedad, y como una excelente herramienta para la intercepción del cáncer<sup>172</sup>.

## 7.2. UTILIDAD DE miR-122-5p EN CHC

Junto a ASGR1, el **miR-122-5p es otro biomarcador específico de hígado cuyo papel como supresor tumoral ha sido descrito en el CHC**<sup>262,263</sup>. Jin et al<sup>262</sup> demostraron en su trabajo que la regulación positiva de miR-122 inhibía la proliferación celular, la formación de colonias y la invasión celular en células de CHC; sin embargo, su regulación negativa tenía el efecto contrario. Además, demostraron que el aumento de los niveles de expresión de miR-122 en células de CHC inhibía la EMT al suprimir la expresión de ZEB1/2, Snail1/2, N-cadherina, vimentina y regulando positivamente la expresión de E-cadherina. Sin embargo, la regulación negativa de miR-122 provocó el efecto opuesto. Además, también observaron que la expresión aumentada de miR-122 suprimía la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. En el trabajo de Gramantieri et al<sup>263</sup> se encontró que miR-122a puede modular la expresión de ciclina G1 en líneas celulares derivadas de CHC y que existe una correlación inversa entre miR-122a y la expresión de ciclina G1 en carcinomas primarios de hígado como CHC. El conjunto de estos resultados unidos a los obtenidos en nuestro trabajo, indican que **miR-122-5p no solo es un marcador específico hepático, sino que también es un buen biomarcador de patología y daño**

**hepático en estadio temprano**<sup>264</sup>. En nuestro trabajo la expresión de miR-122-5p se correlacionó con la expresión de ASGR1 en las CECs, estando más presentes en CHC en estadios tempranos. Nuestros resultados indicaron que **miR-122 puede ser un biomarcador para predecir el pronóstico del CHC y un objetivo terapéutico para los pacientes con CHC**. De hecho, es uno de los mejores marcadores de diagnóstico de CHC, estando normalmente elevado en la circulación de pacientes con CHC<sup>264</sup>. Sin embargo, su sobreexpresión en la circulación no se correlacionó en el tejido tumoral, donde los niveles se encontraron regulados negativamente en CHC<sup>264</sup>.

### 7.3. ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO CON ASGR1 Y miR-122-5p

La heterogeneidad intratumoral presente en el CHC no puede ser caracterizada solamente con cuantificación y/o enumeración de CECs positivas para CK. Por ello, la caracterización fenotípica o genética con otros biomarcadores específicos de tejido, como ASGR1 o miR-122-5p, puede ser de gran importancia. De hecho, **en nuestro estudio identificamos distintas subpoblaciones de CECs en un mismo paciente y entre los diferentes pacientes, basándonos en la tinción de ASGR1 y mir-122-5p**. Hay que destacar que se observó una **correlación positiva perfecta entre ambos marcadores**, lo que sugiere que ambos podrían convertirse en excelentes biomarcadores pronósticos de CHC.

Nuestros resultados mostraron que tanto la presencia de CECs como la pérdida de expresión de ASGR1 en las CECs son factores de riesgo de desarrollar CHC. Además, la tinción positiva de ASGR1 se correlacionó positivamente con la expresión de miR-122-5p, lo que sugiere que las CECs que expresan ambos marcadores se originaron a partir de hepatocitos. Por el contrario, **la ausencia de los dos biomarcadores sugiere un estado más desdiferenciado, identificando fenotipos potencialmente más agresivos o estadios más avanzados**. Estos resultados concuerdan con los presentados por Shi et al.<sup>273</sup> y Witzigmann et al.<sup>250</sup> quienes mostraron una disminución significativa de los niveles de expresión de ASGR1 en tejido tumoral de CHC conforme avanza el estadio tumoral, tanto a nivel de ARNm como de proteínas. Y con el trabajo publicado por Hu et al.<sup>261</sup>, quienes describen que la pérdida de expresión de miR-122 en CHC se relaciona con mal pronóstico y metástasis y con el aumento de la tumorigenicidad de las células.

### 7.4. APLICACIONES CLÍNICAS DE LA CARACTERIZACIÓN DE CECs CON ASGR1 Y miR-122-5p

Es importante buscar la **aplicabilidad de los resultados de este trabajo en la práctica clínica diaria** y creemos que la caracterización de CECs con ASGR1 y miR-122-5p en pacientes con cirrosis hepática o CHC tiene utilidad en diferentes situaciones como se detalla a continuación.

#### 7.4.1. CRIBADO DE CHC

Los pacientes con alto riesgo de desarrollar CHC se someten a programas de cribado mediante ecografía abdominal con o sin AFP cada 6 meses con la intención de identificar CHC en estadios tempranos, aquellos en los que las técnicas quirúrgicas ofrecen un pronóstico favorable con tasas de supervivencia superiores al 70% a los 5 años<sup>277</sup>. Sin embargo, se sabe que la ecografía y la AFP son insuficientes para el diagnóstico precoz de CHC y son cada vez más las publicaciones que proponen la biopsia líquida como un método prometedor para el diagnóstico precoz de CHC<sup>188,277,278</sup>. **En los pacientes con cirrosis hepática en seguimiento mediante cribado ecográfico cada 6 meses la búsqueda de CECs permitiría detectar aquellos pacientes con mayor riesgo** de presentar un tumor de forma inminente, o aquellos que ya tienen un tumor todavía no detectable en la ecografía de cribado. Por ejemplo, uno de los pacientes cirróticos de nuestro estudio se diagnosticó de CHC en estadio BCLC B (tumor único de 6,5 cm) a los 21 meses de la extracción de la muestra. En la muestra el paciente tenía CECs<sup>CK+ASGR1+</sup> por lo que quizá si en este paciente en ese momento se hubiera realizado una técnica de imagen dinámica al sospechar la existencia de un tumor no visible por ecografía, se hubiera podido diagnosticar el CHC en un estadio temprano y hubiera podido acceder a tratamientos curativos como cirugía o THO, mejorando por lo tanto su pronóstico y supervivencia. Es por ello que el uso de la biopsia líquida optimizará la sensibilidad y especificidad en la vigilancia del CHC en poblaciones de riesgo<sup>278</sup>.

#### 7.4.2. DIAGNÓSTICO DE CHC

Otra aplicabilidad de la caracterización de CECs mediante ASGR1 y miR-122-5p sería el **valor pronóstico<sup>279</sup> que aportan en el diagnóstico de CHC pudiendo identificar pacientes con fenotipos tumorales más agresivos** y de peor pronóstico<sup>280</sup>, información que no es posible obtener a través de las pruebas de imagen. Además, en aquellos pacientes en los que el TC o la RM no tuvieran un patrón de captación de contraste diagnóstico de CHC, podría ser útil el aislamiento de CECs caracterizadas mediante ASGR1 y miR-122-5p con el fin de **evitar la realización de una biopsia tisular y sus posibles complicaciones<sup>281</sup>**. El uso de la biopsia tisular está limitado ya que es una prueba invasiva, con riesgo de provocar dolor, hematomas hepáticos, peritonitis biliar, hemobilia, hemotórax, neumotórax, hemoperitoneo, perforación de vísceras y otras complicaciones<sup>282</sup>. Además, en ocasiones puede resultar difícil realizar un diagnóstico diferencial debido a la presencia de necrosis o atipia reactiva en los hepatocitos vecinos a las lesiones metastásicas, siendo necesaria la realización de inmunohistoquímica cuyo uso está usualmente limitado debido a la ausencia de material suficiente en los aspirados citológicos<sup>283</sup>. Por lo tanto, en ocasiones la biopsia hepática de la lesión puede no ser diagnóstica a pesar de haber sometido al paciente a este riesgo. Es por todo ello que **la biopsia líquida presenta múltiples ventajas sobre la biopsia tisular (ver Tabla 6<sup>183</sup>)**. En nuestro estudio el 8,45% (6 pacientes) de los CHC requirieron la realización de biopsia tisular para establecer el diagnóstico definitivo de CHC. De los 6 pacientes que se

realizaron biopsia tisular, 4 tenían CHC en estadio avanzado (3 BCLC-B y 1 BCLC-D) y sus CECs no expresaban ASGR1 mientras que los 2 pacientes con CHC en estadio temprano (2 CHC BCLC-A) tenían CECs<sup>CK+ASGR1+</sup>. Por lo tanto, en estos pacientes, **la biopsia líquida además de confirmar la existencia de CHC proporciona información sobre el pronóstico, advirtiéndonos que aquellos pacientes con pérdida de expresión de ASGR1 tenían tumores más avanzados.**

### 7.4.3. MONITORIZACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD

También es importante resaltar la **utilidad de la biopsia líquida en la monitorización de la enfermedad**<sup>188,279</sup>. Mientras que la biopsia tisular nos da información del tumor en el momento puntual que se tomó la muestra, **la biopsia líquida permite obtener información del tumor de forma seriada y así conocer la evolución de la enfermedad y el pronóstico de los pacientes en tiempo real.** En el CHC, la patogénesis molecular es extremadamente compleja y heterogénea. La información adquirida de una sola biopsia proporciona una instantánea limitada de un tumor y no siempre refleja su heterogeneidad. Sin embargo, la biopsia líquida puede superar esta debilidad, proporcionar el perfil genético de todas las lesiones cancerosas (tumores primarios y metastásicos) y ofrecer la oportunidad de realizar un seguimiento sistemático y dinámico de la evolución genómica<sup>188</sup>. Además, el análisis de dianas terapéuticas y mutaciones genéticas que confieren resistencia a los medicamentos a partir de las CTCs y ADNtc liberados en la circulación contribuye a una mejor comprensión y manejo clínico de la resistencia a los medicamentos en los pacientes con cáncer<sup>188</sup>. Otro aspecto a tener en cuenta es que la biopsia tisular es menos valorable en los pacientes que han recibido tratamiento locorregional (por ejemplo, TACE o ablación), resultando más difícil el análisis histológico y molecular posteriormente a estos tratamientos. Esto es importante, ya que son muchos los pacientes trasplantados que reciben tratamientos locorregionales en lista de espera y por lo tanto, en estos pacientes el estudio histológico molecular del tumor en el explante puede verse afectado por estos tratamientos. En estos casos, es posible el análisis de CECs tanto antes del tratamiento locorregional como después del mismo, y posteriormente al trasplante. De esta forma, sería posible el análisis fenotípico y genético del tumor a través de sus CECs y tendríamos información molecular y pronóstica de la enfermedad en el momento de obtención de la muestra. Esta idea se proyecta en los resultados obtenidos en nuestro trabajo donde el 66,67% (6/9) de los pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico no tenían CECs un mes tras la cirugía. En estos pacientes, la aparición de CECs a lo largo del seguimiento podría advertirnos de la aparición de una recurrencia o recidiva de la enfermedad. En contraposición, de los pacientes sometidos a tratamientos no quirúrgicos solo el 22,22% (6/27) perdió las CECs un mes tras comenzar el tratamiento. Esto es razonable, ya que se trata de tumores avanzados en los que el tratamiento no tiene una intención curativa, sino que su intención es prolongar la supervivencia. Llama la atención que en este grupo de pacientes no sometidos a tratamiento quirúrgico, solo el 4,44% (2/45) presentaron

regresión tumoral tras recibir tratamiento con TACE y sorafenib. El análisis de CECs en estos pacientes muestra que el paciente que recibió tratamiento con sorafenib pasó de tener 1 CEC<sup>CK+ASGR1-</sup> en la muestra basal a tener 3 CECs<sup>CK+ASGR1+</sup> un mes tras iniciar el tratamiento y el paciente tratado mediante TACE pasó de no tener CECs a tener 4 CECs<sup>CK+ASGR+</sup> y 3 CECs<sup>CK+ASGR1-</sup> un mes tras el tratamiento. Por lo tanto, **el análisis de CECs en estos pacientes nos da información sobre la mejoría de su pronóstico al presentar en la evolución células más diferenciadas con la recuperación de la expresión de ASGR1.**

#### 7.4.4. SELECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON CRITERIOS EXPANDIDOS DE TRASPLANTE HEPÁTICO

Como se ha explicado en la introducción, el THO es el principal tratamiento con intención curativa del CHC ya que no solo “cura” el tumor, sino que también desaparece la cirrosis hepática subyacente, algo que no ocurre en la resección hepática. Además, respecto a la resección quirúrgica tiene un menor porcentaje de recurrencia de la enfermedad<sup>158</sup> y por lo tanto una mayor supervivencia (ver apartado 1.9). Sin embargo, **tradicionalmente el THO se restringe a determinados pacientes ya que es un recurso limitado a la disponibilidad de órganos.** Esto cambió a partir del año 2018, cuando España se encontraba en una situación muy particular en el ámbito de la donación y el trasplante. Los antivirales de acción directa frente a la hepatitis C, cuyo uso se extendió en los años 2014 y 2015, habían curado la infección de todos los pacientes con cirrosis hepática o fibrosis avanzada, lo cual había provocado un descenso muy significativo en el número de candidatos a trasplante por esta etiología, la cual era la segunda causa de trasplante hepático por aquel entonces. Por otro lado, la ampliación de los criterios y las nuevas modalidades de donación, particularmente la donación en asistolia, habían incrementado sensiblemente el número de hígados disponibles para trasplante. Por primera vez en la historia, el número de donantes era superior al número de potenciales candidatos a trasplante, lo cual provocó un acortamiento de las listas de espera, descendiendo el número de pacientes en lista un 50% entre los años 2015 a 2018<sup>284</sup>.

Por otro lado, en 2019 surge formalmente el término **Transplant Oncology**, que fue acuñado en una conferencia de consenso de la International Liver Transplantation Society (ILTS)<sup>285</sup> y que abarca múltiples disciplinas del trasplante y la oncología. El principal beneficio del trasplante en el ámbito de las enfermedades neoplásicas sería alcanzar la resección completa del tumor con márgenes libres (R0) en un órgano, como el hígado, que de otra forma quedaría sin reserva funcional suficiente, bien porque se trate de un hígado cirrótico, bien porque la resección hepática necesaria sería demasiado extensa. La principal barrera para la generalización del Transplant Oncology era precisamente la escasez de donantes, pero con la situación de donación y trasplante en España, se abría la posibilidad a establecer nuevas indicaciones o ampliar las ya existentes en este ámbito. En esta situación, la Sociedad Española de Trasplante Hepático (SETH) llevó a cabo en 2019-2020 una conferencia de consenso<sup>284</sup> entre los 25

centros de trasplante hepático a nivel nacional con el objetivo de identificar áreas en las que se pudiesen **expandir los criterios de trasplante** y otras en las que el trasplante pudiese empezar a considerarse y bajo qué condiciones. Una de las áreas que revisaron en esta conferencia de consenso fue el **hepatocarcinoma que sobrepasa los criterios de Milán**.

La selección de candidatos a THO se realiza en la mayoría de los centros bajo los denominados criterios de Milán: un nódulo menor de 5 cm o hasta 3 nódulos, siendo todos ellos menores de 3 cm, y en ausencia de invasión macrovascular o extensión extrahepática. Sin embargo, **es posible que los criterios de Milán sean demasiado restrictivos<sup>286</sup>**. **Expandir los criterios de Milán sería recomendable siempre y cuando no suponga un incremento significativo del riesgo de recidiva tumoral y no ponga en peligro los principios éticos de equidad y justicia que fundamentan el trasplante de órganos**. La combinación de criterios morfológicos con marcadores no invasivos de agresividad biológica resulta particularmente atractiva<sup>287</sup> y actualmente el biomarcador de CHC relacionado con la agresividad tumoral con mayor evidencia científica disponible es la AFP<sup>288</sup>. Existe unanimidad en cuanto a contraindicar el THO si existe evidencia de macroinvasión vascular o diseminación extrahepática<sup>94,129</sup>. Con este límite bien definido, existen múltiples opciones de expansión moderada de los criterios de Milán entre los que destacan por su base científica más sólida, los **criterios "Up-to-seven"** (del inglés "hasta siete"), en los que la suma del diámetro del nódulo mayor en cm y del número de tumores tiene que ser  $\leq 7$ <sup>289</sup>. Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, **se establecieron los criterios expandidos de THO en CHC<sup>284</sup>** siguiendo el denominado Modelo Francés o modelo AFP, que combina el número de nódulos con el diámetro del nódulo mayor y la AFP<sup>290</sup> y que ha sido externamente validado<sup>291</sup>. Según estos criterios, los pacientes dentro de los criterios de Milán que tienen una AFP >1000 ng/ml deben someterse a terapia locorregional para garantizar una disminución de la AFP por debajo 500 ng/mL para ser incluido en lista de espera. Si la AFP permanece >500 ng/ml, se debe desaconsejar el trasplante. Los criterios de Milán se consideran el estándar de atención para seleccionar candidatos con CHC para THO, sin embargo, se aconseja una ampliación moderada de los criterios de Milán siempre que se preserve el equilibrio con otras indicaciones de THO. Los pacientes más allá de Milán pero dentro de los criterios "Up-to-seven" con AFP sérica >400 ng/ml deben someterse a terapia locorregional con reestadificación completa 1 mes después, antes de ser incluidos en la lista de espera. En pacientes fuera de Milán pero dentro de "Up to 7" sin respuesta radiológica después de la terapia locorregional (parcial o completa según lo definido por los criterios RECIST 1.1) y el aumento progresivo de la AFP sérica a pesar de la terapia locorregional, se debe contraindicar el trasplante<sup>284</sup>.

Las recomendaciones antes mencionadas no se aplican a las estrategias de downstaging. Dada la heterogeneidad y complejidad de la evidencia científica en torno a esta práctica, se justifica realizar un documento de consenso específico<sup>284</sup>.

Con los criterios expandidos de trasplante en vigor desde 2021, en la actualidad nos encontramos en un nuevo escenario en el que cobra especial importancia la utilidad de la biopsia líquida y su aplicabilidad en este contexto. **El análisis de las CECs de los pacientes que sobrepasan los criterios de Milán podría ayudar a determinar aquellos pacientes con peor pronóstico y con mayor riesgo de recidiva.** Sabemos que la pérdida de ASGR1 identifica pacientes con un fenotipo más agresivo, con lo cual posiblemente los pacientes con CECs<sup>CK+ASGR1-</sup> que superen los criterios de Milán no deberían ser trasplantados. **La biopsia líquida también puede resultar de utilidad durante el seguimiento de pacientes trasplantados y que superaban los criterios de Milán antes del trasplante. En estos pacientes debería monitorizarse la aparición o el cambio de sus CECs así como el fenotipo y genotipo de las mismas.** La detección de CECs en este contexto podría avisarnos de la recidiva de la enfermedad en el hígado trasplantado incluso antes de su visualización por técnicas de imagen. De esta forma, podríamos anticiparnos y tomar decisiones respecto al tratamiento más rápido, cuando la enfermedad aún no es visible, y quizá este grupo de pacientes podría beneficiarse de algún tipo de tratamiento adyuvante al trasplante. Dado que los pacientes con CHC de nuestro estudio fueron reclutados entre septiembre de 2017 y septiembre de 2020, cuando los criterios expandidos de trasplante no estaban en vigor, no contamos con ningún paciente trasplantado que superase los criterios de Milán. El análisis de CECs y su caracterización con ASGR1 y miR-122-5p en pacientes trasplantados que superen los criterios de Milán, tanto antes como después del trasplante, sería un proyecto interesante a realizar en el futuro para complementar los resultados de este trabajo.

#### 7.4.5. SELECCIÓN DE PACIENTES CANDIDATOS A TRASPLANTE *AB INITIO*

La resección se considera la primera opción de tratamiento del CHC en los pacientes con cirrosis compensada sin hipertensión portal clínicamente significativa<sup>292</sup>. A pesar de una correcta selección de los candidatos a cirugía **la resección quirúrgica del CHC en el paciente con cirrosis hepática se asocia con unas tasas de recidiva tumoral muy elevadas**, pudiendo llegar al 70% a los 5 años<sup>292</sup>. Los factores de riesgo validados de recidiva tumoral son el tamaño tumoral, la multinodularidad o satelitosis, la presencia de invasión vascular macro o microscópica y el bajo grado de diferenciación celular<sup>293,294</sup>. Dado que **la presencia de invasión microvascular y/o satelitosis en el análisis histológico de la pieza quirúrgica se correlaciona con la recidiva precoz y un mal pronóstico a largo plazo, la SETH recomienda valorar la inclusión del paciente en lista de trasplante hepático** una vez conocida la diseminación en el segmento resecado, antes de la aparición de la recidiva tumoral<sup>292</sup>. Esta indicación de trasplante se llama **trasplante *ab initio* (trasplante de inicio o de entrada)**. El hospital Clínic de Barcelona comprobó en su experiencia con el trasplante *ab initio* que dentro del grupo de alto riesgo, 9 pacientes de 28 presentaron una recidiva que impidió el trasplante hepático en un tiempo medio de 6,5 meses, y encontraron que todos los pacientes con recidiva en los primeros 6 meses no pudieron ser trasplantados<sup>295</sup>. En función de estos resultados la SETH propone

de forma arbitraria un período de espera prudencial de 6 meses para identificar los pacientes con peor comportamiento tumoral y en los que se debería evitar el trasplante<sup>292</sup>. Así como la biopsia líquida es una herramienta prometedora en los pacientes con criterios expandidos de trasplante, también podría resultar útil en los pacientes candidatos a trasplante *ab initio*. **El análisis de CECs en sangre periférica podría complementar al análisis histológico de la pieza quirúrgica<sup>226</sup> y el estudio de la expresión de ASGR1 y miR-122-5p aportaría información pronóstica para así seleccionar mejor a los pacientes candidatos a THO de entrada.** Esta idea sería necesario validarla en próximos estudios al respecto.

### 7.5. $\beta$ -CATENINA COMO NUEVO BIOMARCADOR PRONÓSTICO

Un aspecto interesante a investigar sería el **complejo E-cadherina/ $\beta$ -catenina**. Como se ha detallado en la introducción, en las células epiteliales normales la  $\beta$ -catenina forma un complejo de adhesión con la E-cadherina y se localiza en las uniones adherentes célula-célula de la membrana citoplasmática<sup>191</sup>. En las células tumorales, una porción de la  $\beta$ -catenina se separa del complejo y se traslada al núcleo para realizar su función reguladora de la transcripción de factores represores directos de la E-cadherina, promoviendo la EMT y la metástasis tumoral<sup>191,192</sup>. Existen muchas incógnitas aún alrededor de este proceso que sería conveniente dilucidar, como por ejemplo, los mecanismos a través de los cuales la  $\beta$ -catenina se separa del complejo y se traslada al núcleo. En el trabajo publicado por Sun et al. se describió que las CTCs de CHC eran predominantemente epiteliales en el momento de su liberación al torrente sanguíneo, pero durante el tránsito hematógeno cambiaron su expresión de fenotipo epitelial a mesenquimal a través de las vías de señalización Smad2 y  $\beta$ -catenina<sup>296</sup>. Además, en un estudio recientemente publicado por Lin et al. en 2023 se describe que la mutación del gen de la  $\beta$ -catenina en ADNtc fue muy prevalente en pacientes con CHC comparado con pacientes con infección crónica por VHB<sup>297</sup>. **En futuros trabajos, sería interesante analizar la presencia de  $\beta$ -catenina en las CECs de CHC y correlacionarla con el estadio tumoral, la presencia de metástasis y la evolución de la enfermedad, ya que podría tratarse de un nuevo biomarcador pronóstico.** Además, sería de gran utilidad comprobar si los cambios de expresión de  $\beta$ -catenina a lo largo del seguimiento se correlacionan con un peor pronóstico.

### 7.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este trabajo cuenta con varias limitaciones, siendo la principal de ellas que **el estudio se realiza sobre pacientes con una enfermedad grave de base, la cirrosis hepática**. Este hecho complica la realización de cualquier estudio ya que a diferencia de otros tumores que aparecen en personas sanas, el hepatocarcinoma asienta sobre personas enfermas la mayoría de las veces, lo que conlleva gran cantidad de dificultades y complicaciones. El debut del hepatocarcinoma constituye muchas veces la causa de la descompensación de su enfermedad y a lo largo del tiempo, **las descompensaciones de la cirrosis hepática pueden ser tan graves que causen la muerte del paciente**. Así, en nuestro estudio, el



20% de pacientes con CHC no sometidos a tratamiento quirúrgico fallecieron por descompensación de su cirrosis hepática (hemorragias digestivas altas, descompensaciones edemoascíticas, fallo hepático agudo sobre crónico...).

Como se ha detallado en la introducción, el hepatocarcinoma es un tumor con mal pronóstico y esto supone una limitación para el estudio ya que a lo largo del mismo **los pacientes fallecían como consecuencia de la enfermedad u otras complicaciones que acontecían, dificultando la recogida de muestras**. Tanto es así, que aunque inicialmente pretendíamos analizar los seguimientos de los pacientes a los 6 meses y 12 meses tras el inicio del tratamiento, al finalizar el período de recogida de muestras solo contábamos con 27 muestras de 6 meses y 12 muestras de 12 meses de la muestra basal, siendo este un número de muestras insuficiente para realizar el análisis de CECs y obtener resultados significativos, relevantes y extrapolables a la realidad. Además, **la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2, supuso un retraso en el final de recogida de muestras** ya que durante los meses de marzo a junio de 2020 los pacientes no acudían al hospital para realizar revisiones y el laboratorio de Genyo permaneció cerrado. Finalmente, entre agosto y septiembre de 2020 se reabrieron las consultas presenciales y se pudieron terminar de recoger las muestras previstas.

Es posible que el **tamaño de la cohorte** pueda afectar a nuestros buenos resultados utilizando CECs y ASGR1/miR-122-5p como biomarcadores, pero estudios similares<sup>194</sup> o con cohortes más pequeñas<sup>218,219,229</sup>, ya han sido publicados por otros autores. También es cierto que la **detección de miR-122-5p en CECs** debería haberse realizado en todas las muestras positivas para CECs. Sin embargo, debido a limitaciones de financiación y a dificultades de la metodología, sólo evaluamos este biomarcador como prueba de concepto en una pequeña cohorte de pacientes.

## 7.7. FUTURO

Actualmente, se está trabajando en **augmentar el tamaño de la cohorte y caracterizar las CECs utilizando un panel de biomarcadores más completo que incluye ASGR1 y miR-122-5p simultáneamente**, mediante el nuevo protocolo desarrollado por nuestro grupo<sup>214</sup> con la intención de mejorar el poder estadístico y demostrar la utilidad diagnóstica de caracterización de CECs en pacientes con cirrosis hepática y CHC.

Es primordial **estandarizar la metodología** de enriquecimiento, aislamiento y análisis de CECs entre los diferentes grupos de investigación de biopsia líquida y es necesaria la **realización de un ensayo clínico más amplio que evalúe la utilidad clínica de estos dos biomarcadores**, lo que permitiría actualizar las guías clínicas de manejo del CHC. La incorporación de la biopsia líquida basada en el aislamiento de CECs y su caracterización mediante ASGR1 y/o miR-122-5p podría convertirse en una estrategia no invasiva para la estratificación del riesgo de los pacientes y para mejorar en la identificación temprana de tumores en pacientes cirróticos.

## 8. CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados resaltan la **utilidad clínica de la caracterización de CECs con ASGR1/miR-122-5p en pacientes con cirrosis hepática o CHC**, para identificar el **origen hepático** de las CECs y para **detectar fenotipos potencialmente más agresivos** (con pérdida de ASGR1/miR-122-5p), lo que serviría como herramienta predictiva y pronóstica.
2. **El análisis de CECs durante el seguimiento post-tratamiento proporciona información sobre el pronóstico de los pacientes, nos permite estratificar su riesgo e interceptar el CHC.** En aquellos pacientes sometidos a resección o trasplante hepático, la aparición de CECs durante el seguimiento se relaciona con la aparición de recidivas y en pacientes con tumores avanzados que no han recibido tratamientos quirúrgicos, la pérdida de expresión de ASGR1/miR-122-5p en el análisis de CECs indicaría una mala respuesta al tratamiento, un peor pronóstico y una menor supervivencia.
3. Las CECs pueden convertirse en un biomarcador pronóstico muy útil para la identificación de individuos en riesgo de desarrollar CHC. **El análisis de CECs en pacientes cirróticos y su caracterización con ASGR1/miR-122-5p podría identificar aquellos con un mayor riesgo de desarrollar CHC.** Esto permitiría seleccionar pacientes que requieran un seguimiento más estrecho y realizar tratamientos con intención curativa a un mayor número de pacientes al diagnosticarse en estadios más tempranos.

## 9. ABREVIATURAS

<b>AAD</b>	Antivirales de acción directa
<b>ACR</b>	Colegio Americano de Radiología (del inglés: American College of Radiology)
<b>ADNlc</b>	ADN libre circulante
<b>ADNtc</b>	ADN tumoral circulante
<b>AFP</b>	Alfafetoproteína
<b>AFPR</b>	Receptores de alfafetoproteína
<b>AGO</b>	Proteínas argonauta
<b>AINES</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
<b>ALBI</b>	Escala Albúmina-Bilirrubina
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ASGR</b>	Receptor de asialoglicoproteína (del inglés: asialoglycoprotein receptor)
<b>ASO</b>	Oligonucleótidos antisentido (del inglés: antisense oligonucleotides)
<b>ATRA</b>	Ácido transretinoico (del inglés: all-trans retinoic acid)
<b>BCLC</b>	Barcelona Clinic Liver Cancer
<b>cAMP</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>CAR-T</b>	Células T modificadas con receptor de antígeno quimérico (del inglés: chimeric antigen receptor)
<b>CBP</b>	Cirrosis biliar primaria
<b>CCI</b>	Colangiocarcinoma intrahepático
<b>CECs</b>	Células epiteliales circulantes
<b>CEI</b>	Comité Ético de Investigación
<b>CEP</b>	Colangitis esclerosante primaria
<b>CEUS</b>	Ecografía con contraste (del inglés: contrast-enhanced ultrasound)
<b>CH</b>	Cirrosis hepática
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma
<b>CK</b>	Citoqueratina
<b>CRD</b>	Dominio de reconocimiento de carbohidratos (del inglés: carbohydrate-recognition domain)
<b>CTCs</b>	Células tumorales circulantes

<b>CXCR4</b>	Receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4 (del inglés: chemokine receptor 4)
<b>DEB-TACE</b>	TACE con partículas precargadas farmacológicamente (del inglés: drug-eluting bead transarterial chemoembolization)
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DR5</b>	Receptor de muerte 5 (del inglés: Death receptor 5)
<b>EASL</b>	Asociación Europea para el Estudio del Hígado (del inglés: European Association for the Study of the Liver)
<b>ECOG</b>	Grupo Cooperativo de Oncología Oriental (del inglés: Eastern Cooperative Oncology Group)
<b>EHGNA</b>	Enfermedad del hígado graso no alcohólica
<b>EHNA</b>	Esteatohepatitis no alcohólica
<b>EMT</b>	Transición epitelio-mesénquima (del inglés: epithelial to mesenchymal transition)
<b>EpCAM</b>	Molécula de adhesión de células epiteliales (del inglés: epithelial cell adhesion molecule)
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>EVs</b>	Vesículas extracelulares (del inglés: extracellular vesicles)
<b>FRCV</b>	Factores de riesgo cardiovascular
<b>GaINAc</b>	N-acetilgalactosamina
<b>GLP-1</b>	Péptido 1 similar al glucagón (del inglés: glucagon-like peptide-1)
<b>GP130</b>	Glicoproteína 130
<b>GPC-3</b>	Glipicano-3
<b>GPCR</b>	Receptores acoplados a proteína G (del inglés: G-protein-coupled receptors)
<b>GPx</b>	Glutation peroxidasa
<b>HBe Ag</b>	Antígeno e del virus de la Hepatitis B
<b>HBs Ag</b>	Antígeno s del virus de la Hepatitis B
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad (del inglés: high-density lipoprotein)
<b>HR</b>	Hazard ratio
<b>HSC</b>	Células estrelladas hepáticas (del inglés: hepatic stellate cells)
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>IC</b>	Intervalo de confianza

<b>IFN</b>	Interferón
<b>IGF-2</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo 2 (del inglés: insuline like growth factor 2)
<b>ILTS</b>	Sociedad Internacional de Trasplante Hepático (del inglés: International Liver Transplantation Society)
<b>INR</b>	Índice Internacional Normalizado (del inglés: international normalized ratio)
<b>LASS2</b>	Longevity assurance homolog 2 of yeast LAG1
<b>LI-RADS</b>	Liver Imaging Reporting and Data System
<b>LOH</b>	Pérdida de heterocigosidad (del inglés: loss of heterozygosity)
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MELD</b>	Model for End-stage Liver Disease
<b>miARN</b>	microARN
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa de matriz (del inglés: matrix metalloproteinases)
<b>MUC</b>	Mucina
<b>MV</b>	Microvesículas
<b>NK cells</b>	Células natural killer
<b>NLK</b>	Quinasa similar a Nemo (del inglés: nemo-like kinase)
<b>Nrf2</b>	Factor nuclear eritroide 2
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>PET</b>	Tomografía por emisión de positrones (del inglés: positron emission tomography)
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PS</b>	Estado funcional (del inglés: performance status)
<b>PTEN</b>	Gen homólogo de fosfatasa y tensina (del inglés: phosphatase and tensin homolog)
<b>QUETA</b>	Quimioembolización transarterial
<b>RAR-β</b>	Receptor beta del ácido retinoico (del inglés: retinoic acid receptor beta)
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno (del inglés: reactive oxygen species)

<b>RR</b>	Riesgo relativo
<b>RVS</b>	Respuesta viral sostenida
<b>SETH</b>	Sociedad Española de Trasplante Hepático
<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SIBL</b>	Sociedad Internacional de Biopsia Líquida (del inglés: International Society of Liquid Biopsy)
<b>SLP</b>	Supervivencia libre de progresión
<b>SR</b>	Receptores scavenger (del inglés: scavenger receptors)
<b>SV</b>	Supervivencia
<b>TACE</b>	Quimioembolización transarterial (del inglés: transarterial chemoembolization)
<b>TACEc</b>	Quimioembolización transarterial convencional (del inglés: conventional transarterial chemoembolization)
<b>TARE</b>	Radioembolización transarterial (del inglés: transarterial radioembolization)
<b>TC</b>	Tomografía computarizada
<b>TERT</b>	Transcriptasa inversa de la telomerasa (del inglés: telomerase reverse transcriptase)
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor de crecimiento transformante alfa (del inglés: transforming growth factor alpha)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés: transforming growth factor beta)
<b>THO</b>	Trasplante hepático ortotópico
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (del inglés: tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)
<b>VHB</b>	Virus de la hepatitis B
<b>VHC</b>	Virus de la hepatitis C
<b>VHD</b>	Virus de la hepatitis D
<b>VHE</b>	Virus de la hepatitis E
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b><sup>18</sup>FDG</b>	<sup>18</sup> F-fluorodeoxiglucosa

## 10. ANEXOS

### 10.1. ANEXO I: APROBACIÓN POR EL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN DE GRANADA

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES  
Dirección General de Calidad, Investigación, Desarrollo e Innovación  
Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía

#### ACUERDO QUE EMITE EL CEI de Granada CON RELACIÓN AL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN PC-0267-2017. EN LA SESIÓN CELEBRADA EL 22/12/2017

Código: PC-0267-2017.  
Promotor/a: (No hay promotor/a asociado/a)  
Título: Biopsia Líquida aplicada a la búsqueda de marcadores celulares y epigenéticos para el desarrollo de test diagnósticos, pronósticos y predictivos en pacientes con hepatocarcinoma. Biopsia Líquida aplicada a la búsqueda de marcadores celulares y epigenéticos para el desarrollo de test diagnósticos, pronósticos y predictivos en pacientes con hepatocarcinoma: Detección de miRNAs 122, 21 y 494 en plasma y CTCs como herramienta pronóstico y predictiva en pacientes con hepatocarcinoma. Utilidad del miR122 como marcador exclusivo de CTCs procedentes de hepatocarcinoma  
Acuerdo:

El Comité CEI de Granada y conforme a lo establecido en Ley de Investigación Biomédica 14/2007 de 3 de julio y la Orden SAS/370/2009 de 16 de diciembre por la que se publican directrices sobre estudios postautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano, considera precisa la aportación de información adicional a efectos de autorización y/o evaluación del estudio que a continuación se relaciona:

La HIP es aceptable, si bien el Consentimiento Informado debe incluir específicamente que se autoriza el acceso a la información clínica, así como la conservación de muestras biológicas para estudios futuros. Deben especificar también que los datos serán anonimizados o en su defecto que se registrará la base de datos. El estudio incluye el análisis de muestras de tejidos procedentes del biobanco, lo que requerirá la aprobación de la cesión de muestras y una fase de experimentación animal, que requiere una aprobación específica (C. de experimentación animal de la UGR).

GRANADA, 27/12/2017

El/La Secretario/a del CEI de Granada

Fdo:



Código Seguro De Verificación:	2e5ed74e5b02243448038b4c0e0b553715b7f161	Fecha	27/12/2017	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Juan Morales Arcas			
Url De Verificación	<a href="https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/2e5ed74e5b02243448038b4c0e0b553715b7f161">https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/2e5ed74e5b02243448038b4c0e0b553715b7f161</a>	Página	1/1	

## 10.2. ANEXO II: CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES CON HEPATOCARCINOMA

### CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

#### Naturaleza:

Aislamiento y caracterización de células tumorales circulantes en sangre de pacientes de cáncer de hepatocarcinoma, a partir de la obtención de 15 ml (x4) de sangre periférica. Las extracciones se realizarán antes y después de la intervención quirúrgica. El objetivo fundamental del estudio es la identificación de características fenotípicas de células tumorales con objeto de determinar el curso de la enfermedad y la determinación de respuesta a los tratamientos administrados.

#### Importancia:

El objetivo fundamental del estudio es la identificación de características fenotípicas de células tumorales con objeto de determinar el curso de la enfermedad y la determinación de respuesta a los tratamientos administrados.

#### Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.
- Una vez terminado el estudio, y en caso de que los hubiera, los excedentes de la muestra serán destruidos.

#### Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

La obtención de sangre periférica: es en principio un procedimiento exento de riesgo, y sus posibles complicaciones son las mismas que las de cualquier extracción de sangre habitual

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de [REDACTED] en el teléfono: [REDACTED] o en el correo electrónico: [REDACTED]



## CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE/DONADOR

<TÍTULO> Hepatocarcinoma, Células Tumorales Circulantes, marcador diagnóstico, recaída, respuesta al tratamiento, extensión de la enfermedad, asialoglicoproteína (ASGPR). VEGFR, EGFR,AXL, CD133, ALDH1

Yo(Nombre/ Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)

He podido hacer preguntas sobre el estudio Hepatocarcinoma, Células Tumorales Circulantes, marcador diagnóstico, recaída, respuesta al tratamiento, extensión de la enfermedad, asialoglicoproteína (ASGPR). VEGFR, EGFR,AXL, CD133, ALDH1

- He recibido suficiente información sobre el estudio **Hepatocarcinoma, Células Tumorales Circulantes, marcador diagnóstico, recaída, respuesta al tratamiento, extensión de la enfermedad, asialoglicoproteína (ASGPR). VEGFR, EGFR,AXL, CD133, ALDH1** He hablado con el profesional sanitario informador: .....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado* <TÍTULO>

Firma del paciente  
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional  
sanitario informador

Nombre y apellidos:.....  
Fecha: .....

Nombre y apellidos: .....  
Fecha: .....

### 10.3. ANEXO III: CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL DONANTE SANO

A continuación, se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

**Naturaleza:** Se solicita su autorización para su inclusión en el estudio titulado: Hepatocarcinoma, Células Tumorales Circulantes, marcador diagnóstico, recaída, respuesta al tratamiento, extensión de la enfermedad, asialoglicoproteína (ASGPR), VEGFR, EGFR, AXL, CD133, ALDH1

El proyecto es un estudio propuesto por el equipo de investigación del Hospital Universitario "San Cecilio", del Centro de Investigaciones oncológicas GENYO de Granada

Su participación consiste en la donación de una muestra de sangre de 15 ml. (x4)

**Importancia:** La identificación de características tumorales de las células presentes en la sangre de los pacientes permitirá una mayor capacidad para conocer el estado real de la enfermedad y por lo tanto mayor capacidad para determinar qué tipo de tratamiento, de la batería con la que contamos, se adapta mejor a las características de la enfermedad en estos pacientes, permitiendo un seguimiento más individualizado.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos de carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

**Riesgos de la investigación para el donante/paciente:** No existe riesgo para su salud, ni para la evolución de la enfermedad. No se procederá a obtener tejido si no fuese algo estrictamente necesario para el diagnóstico. Las extracciones de sangre se harán coincidir con las venopunciones previstas en las revisiones por lo que no hará falta ningún procedimiento adicional y no supondrá ningún riesgo añadido para el paciente.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

Hepatocarcinoma, Células Tumorales Circulantes, marcador diagnóstico, recaída, respuesta al tratamiento, extensión de la enfermedad, asialoglicoproteína (ASGPR). VEGFR, EGFR,AXL, CD133, ALDH1

Yo (Nombre y Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio:Hepatocarcinoma, Células Tumorales Circulantes, marcador diagnóstico, recaída, respuesta al tratamiento, extensión de la enfermedad, asialoglicoproteína (ASGPR). VEGFR, EGFR,AXL, CD133, ALDH1 ”
- He recibido suficiente información sobre el estudio “Hepatocarcinoma, Células Tumorales Circulantes, marcador diagnóstico, recaída,respuesta al tratamiento, extensión de la enfermedad, asialoglicoproteína (ASGPR). VEGFR, EGFR,AXL, CD133, ALDH1”.
- He hablado con el profesional sanitario informador:
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos
- Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado “Hepatocarcinoma, Células Tumorales Circulantes, marcador diagnóstico, recaída,respuesta al tratamiento, extensión de la enfermedad, asialoglicoproteína (ASGPR). VEGFR, EGFR,AXL, CD133, ALDH1”

Firma del paciente  
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional  
sanitario informador

Nombre y apellidos:.....  
Fecha: .....

Nombre y apellidos: .....  
Fecha: .....

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2021 Jan;73 Suppl 1(Suppl 1):4-13. doi: 10.1002/hep.31288. Epub 2020 Nov 24. PMID: 32319693; PMCID: PMC7577946.
2. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Jan 21;7(1):6. doi: 10.1038/s41572-020-00240-3. PMID: 33479224.
3. Cancer Tomorrow (2022). Cancer Tomorrow. Disponible en: [https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=11&single\\_unit=50000&group\\_cancers=0&multiple\\_cancers=0](https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=11&single_unit=50000&group_cancers=0&multiple_cancers=0). [Accessed 22 Sep 2022].
4. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023 Jan;73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763. PMID: 36633525.
5. Global Burden of Disease Liver Cancer Collaboration; Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, Allen C, Al-Raddadi R, Alvis-Guzman N, Amoako Y, Artaman A, Ayele TA, Barac A, Bensenor I, Berhane A, Bhutta Z, Castillo-Rivas J, Chittheer A, Choi JY, Cowie B, Dandona L, Dandona R, Dey S, Dicker D, Phuc H, Ekwueme DU, Zaki MS, Fischer F, Fürst T, Hancock J, Hay SI, Hotez P, Jee SH, Kasaeian A, Khader Y, Khang YH, Kumar A, Kutz M, Larson H, Lopez A, Lunevicius R, Malekzadeh R, McAlinden C, Meier T, Mendoza W, Mokdad A, Moradi-Lakeh M, Nagel G, Nguyen Q, Nguyen G, Ogbo F, Patton G, Pereira DM, Pourmalek F, Qorbani M, Radfar A, Roshandel G, Salomon JA, Sanabria J, Sartorius B, Satpathy M, Sawhney M, Sepanlou S, Shackelford K, Shore H, Sun J, Mengistu DT, Topór-Mądry R, Tran B, Ukwaja KN, Vlassov V, Vollset SE, Vos T, Wakayo T, Weiderpass E, Werdecker A, Yonemoto N, Younis M, Yu C, Zaidi Z, Zhu L, Murray CJL, Naghavi M, Fitzmaurice C. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol*. 2017 Dec 1;3(12):1683-1691. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.3055. PMID: 28983565; PMCID: PMC5824275.
6. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, Del Ninno E, Morabito A, Colombo M. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology*. 2006 Jun;43(6):1303-10. doi: 10.1002/hep.21176. PMID: 16729298.
7. Ioannou GN, Splan MF, Weiss NS, McDonald GB, Beretta L, Lee SP. Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Aug;5(8):938-45, 945.e1-4. doi: 10.1016/j.cgh.2007.02.039. Epub 2007 May 16. PMID: 17509946.
8. García M., Bárcena R. Hepatocarcinoma y trasplante hepático. *Rev. esp. enferm. dig*. 2006; 98(12):891-898.
9. Maucort-Boulch D, de Martel C, Franceschi S, Plummer M. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide. *Int J Cancer*. 2018 Jun 15;142(12):2471-2477. doi: 10.1002/ijc.31280. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29388206.
10. Thiele M, Glud LL, Fialla AD, Dahl EK, Krag A. Large variations in risk of hepatocellular carcinoma and mortality in treatment naïve hepatitis B patients: systematic review with meta-analyses. *PLoS One*. 2014 Sep 16;9(9):e107177. doi: 10.1371/journal.pone.0107177. PMID: 25225801; PMCID: PMC4167336.

11. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH; REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. 2006 Jan 4;295(1):65-73. doi: 10.1001/jama.295.1.65. PMID: 16391218.
12. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ; Taiwan Community-Based Cancer Screening Project Group. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2002 Jul 18;347(3):168-74. doi: 10.1056/NEJMoa013215. PMID: 12124405.
13. Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, Su TH, Wang CC, Chen CL, Kuo SF, Liu CH, Chen PJ, Chen DS, Kao JH. High levels of hepatitis B surface antigen increase risk of hepatocellular carcinoma in patients with low HBV load. *Gastroenterology*. 2012 May;142(5):1140-1149.e3; quiz e13-4. doi: 10.1053/j.gastro.2012.02.007. Epub 2012 Feb 11. PMID: 22333950.
14. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, Shih WL, Kao JH, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Feb 16;97(4):265-72. doi: 10.1093/jnci/dji043. PMID: 15713961.
15. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut*. 2000 Mar;46(3):420-6. doi: 10.1136/gut.46.3.420. PMID: 10673308; PMCID: PMC1727859.
16. Xue M, Lin X, Lin QX, Pu X, Liu J, Li XF, Hou J, Liu X, Chen R. Association between hepatitis B and E virus infection and hepatocellular carcinoma risk. *Int J Cancer*. 2021 Jun 15;148(12):2974-2981. doi: 10.1002/ijc.33505. Epub 2021 Feb 20. PMID: 33554326.
17. Simonetti J, Bulkow L, McMahon BJ, Homan C, Snowball M, Negus S, Williams J, Livingston SE. Clearance of hepatitis B surface antigen and risk of hepatocellular carcinoma in a cohort chronically infected with hepatitis B virus. *Hepatology*. 2010 May;51(5):1531-7. doi: 10.1002/hep.23464. Erratum in: *Hepatology*. 2015 Oct;62(4):1330. PMID: 20087968.
18. Chen CJ, Liang KY, Chang AS, Chang YC, Lu SN, Liaw YF, Chang WY, Sheen MC, Lin TM. Effects of hepatitis B virus, alcohol drinking, cigarette smoking and familial tendency on hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1991 Mar;13(3):398-406. PMID: 1847891.
19. Xu HQ, Wang CG, Zhou Q, Gao YH. Effects of alcohol consumption on viral hepatitis B and C. *World J Clin Cases*. 2021 Nov 26;9(33):10052-10063. doi: 10.12998/wjcc.v9.i33.10052. PMID: 34904075; PMCID: PMC8638036.
20. Loomba R, Liu J, Yang HI, Lee MH, Lu SN, Wang LY, Iloeje UH, You SL, Brenner D, Chen CJ; REVEAL-HBV Study Group. Synergistic effects of family history of hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus infection on risk for incident hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Dec;11(12):1636-45.e1-3. doi: 10.1016/j.cgh.2013.04.043. Epub 2013 May 10. PMID: 23669307; PMCID: PMC4100777.
21. Su TH, Hu TH, Chen CY, Huang YH, Chuang WL, Lin CC, Wang CC, Su WW, Chen MY, Peng CY, Chien RN, Huang YW, Wang HY, Lin CL, Yang SS, Chen TM, Mo LR, Hsu SJ, Tseng KC, Hsieh TY, Suk FM, Hu CT, Bair MJ, Liang CC, Lei YC, Tseng TC, Chen CL, Kao JH; C-TEAM study group and the Taiwan Liver Diseases Consortium. Four-year entecavir therapy reduces hepatocellular carcinoma, cirrhotic events and mortality in chronic hepatitis B patients. *Liver Int*. 2016 Dec;36(12):1755-1764. doi: 10.1111/liv.13253. Epub 2016 Oct 4. PMID: 27634134.
22. Kim WR, Loomba R, Berg T, Aguilar Schall RE, Yee LJ, Dinh PV, Flaherty JF, Martins EB, Therneau TM, Jacobson I, Fung S, Gurel S, Buti M, Marcellin P. Impact of long-term tenofovir disoproxil fumarate on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic

- hepatitis B. *Cancer*. 2015 Oct 15;121(20):3631-8. doi: 10.1002/cncr.29537. Epub 2015 Jul 15. PMID: 26177866.
23. Kim JH, Sinn DH, Kang W, Gwak GY, Paik YH, Choi MS, Lee JH, Koh KC, Paik SW. Low-level viremia and the increased risk of hepatocellular carcinoma in patients receiving entecavir treatment. *Hepatology*. 2017 Aug;66(2):335-343. doi: 10.1002/hep.28916. Epub 2016 Dec 24. PMID: 28012257.
  24. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol*. 2009 Jun;50(6):1142-54. doi: 10.1016/j.jhep.2009.01.019. Epub 2009 Mar 20. PMID: 19395111.
  25. Lee MH, Yang HI, Lu SN, Jen CL, You SL, Wang LY, L'Italien G, Chen CJ, Yuan Y; REVEAL-HCV Study Group. Hepatitis C virus genotype 1b increases cumulative lifetime risk of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2014 Sep 1;135(5):1119-26. doi: 10.1002/ijc.28753. Epub 2014 Feb 14. PMID: 24482200.
  26. Ikeda K, Marusawa H, Osaki Y, Nakamura T, Kitajima N, Yamashita Y, Kudo M, Sato T, Chiba T. Antibody to hepatitis B core antigen and risk for hepatitis C-related hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Ann Intern Med*. 2007 May 1;146(9):649-56. doi: 10.7326/0003-4819-146-9-200705010-00008. PMID: 17470833.
  27. Sun J, Althoff KN, Jing Y, Horberg MA, Buchacz K, Gill MJ, Justice AC, Rabkin CS, Goedert JJ, Sigel K, Cachay E, Park L, Lim JK, Kim HN, Lo Re V 3rd, Moore R, Sterling T, Peters MG, Achenbach CJ, Silverberg M, Thorne JE, Mayor AM, Crane HM, Kitahata MM, Klein M, Kirk GD; North American AIDS Cohort Collaboration on Research and Design of IeDEA. Trends in Hepatocellular Carcinoma Incidence and Risk Among Persons With HIV in the US and Canada, 1996-2015. *JAMA Netw Open*. 2021 Feb 1;4(2):e2037512. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.37512. PMID: 33595662; PMCID: PMC7890526.
  28. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*. 2002 Feb 15;155(4):323-31. doi: 10.1093/aje/155.4.323. PMID: 11836196.
  29. Lee YC, Cohet C, Yang YC, Stayner L, Hashibe M, Straif K. Meta-analysis of epidemiologic studies on cigarette smoking and liver cancer. *Int J Epidemiol*. 2009 Dec;38(6):1497-511. doi: 10.1093/ije/dyp280. Epub 2009 Aug 31. PMID: 19720726.
  30. Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology*. 2002 Nov;36(5):1206-13. doi: 10.1053/jhep.2002.36780. PMID: 12395331.
  31. Morgan RL, Baack B, Smith BD, Yartel A, Pitasi M, Falck-Ytter Y. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Ann Intern Med*. 2013 Mar 5;158(5 Pt 1):329-37. doi: 10.7326/0003-4819-158-5-201303050-00005. PMID: 23460056.
  32. World Health Organization. Projections of mortality and causes of death 2016 to 2060. 2016. Disponible en: [https://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/projections/en/](https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/).
  33. Van der Meer AJ, Feld JJ, Hofer H, Almasio PL, Calvaruso V, Fernández-Rodríguez CM, Aleman S, Ganne-Carrié N, D'Ambrosio R, Pol S, Trapero-Marugan M, Maan R, Moreno-Otero R, Mallet V, Hultcrantz R, Weiland O, Rutter K, Di Marco V, Alonso S, Bruno S, Colombo M, de Knegt RJ, Veldt BJ, Hansen BE, Janssen HLA. Risk of cirrhosis-related complications in patients

- with advanced fibrosis following hepatitis C virus eradication. *J Hepatol.* 2017 Mar;66(3):485-493. doi: 10.1016/j.jhep.2016.10.017. Epub 2016 Oct 22. PMID: 27780714.
34. Alfaiate D, Clément S, Gomes D, Goossens N, Negro F. Chronic hepatitis D and hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Hepatol.* 2020 Sep;73(3):533-539. doi: 10.1016/j.jhep.2020.02.030. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32151618.
  35. Béguelin C, Moradpour D, Sahli R, Suter-Riniker F, Lüthi A, Cavassini M, Günthard HF, Battegay M, Bernasconi E, Schmid P, Calmy A, Braun DL, Furrer H, Rauch A, Wandeler G; Swiss HIV Cohort Study. Hepatitis delta-associated mortality in HIV/HBV-coinfected patients. *J Hepatol.* 2017 Feb;66(2):297-303. doi: 10.1016/j.jhep.2016.10.007. Epub 2016 Oct 14. PMID: 27746337.
  36. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, Nakanishi K, Fujimoto I, Inoue A, Yamazaki H, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med.* 1993 Jun 24;328(25):1797-801. doi: 10.1056/NEJM199306243282501. PMID: 7684822.
  37. Ganne-Carrié N, Chaffaut C, Bourcier V, Archambeaud I, Perarnau JM, Oberti F, Roulot D, Moreno C, Louvet A, Dao T, Moirand R, Gorla O, Nguyen-Khac E, Carbonell N, Antonini T, Pol S, de Ledinghen V, Ozenne V, Henrion J, Péron JM, Tran A, Perlemuter G, Amiot X, Zarski JP, Beaugrand M, Chevret S; for CIRRAL Group. Estimate of hepatocellular carcinoma incidence in patients with alcoholic cirrhosis. *J Hepatol.* 2018 Dec;69(6):1274-1283. doi: 10.1016/j.jhep.2018.07.022. Epub 2018 Aug 6. PMID: 30092234.
  38. Turati F, Galeone C, Rota M, Pelucchi C, Negri E, Bagnardi V, Corrao G, Boffetta P, La Vecchia C. Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol.* 2014 Aug;25(8):1526-35. doi: 10.1093/annonc/mdu020. Epub 2014 Mar 14. PMID: 24631946.
  39. Heckley GA, Jarl J, Asamoah BO, G-Gerdtham U. How the risk of liver cancer changes after alcohol cessation: a review and meta-analysis of the current literature. *BMC Cancer.* 2011 Oct 13;11:446. doi: 10.1186/1471-2407-11-446. PMID: 21995442; PMCID: PMC3229519.
  40. Ganne-Carrié N, Nahon P. Hepatocellular carcinoma in the setting of alcohol-related liver disease. *J Hepatol.* 2019 Feb;70(2):284-293. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.008. PMID: 30658729.
  41. LoConte NK, Brewster AM, Kaur JS, Merrill JK, Alberg AJ. Alcohol and Cancer: A Statement of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2018 Jan 1;36(1):83-93. doi: 10.1200/JCO.2017.76.1155. Epub 2017 Nov 7. PMID: 29112463.
  42. Ioannou GN, Green P, Kerr KF, Berry K. Models estimating risk of hepatocellular carcinoma in patients with alcohol or NAFLD-related cirrhosis for risk stratification. *J Hepatol.* 2019 Sep;71(3):523-533. doi: 10.1016/j.jhep.2019.05.008. Epub 2019 May 28. PMID: 31145929; PMCID: PMC6702126.
  43. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 Jul;16(7):411-428. doi: 10.1038/s41575-019-0145-7. PMID: 31028350.
  44. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology.* 2018 Jan;67(1):123-133. doi: 10.1002/hep.29466. Epub 2017 Dec 1. PMID: 28802062; PMCID: PMC5767767.

45. Rodríguez de Lope C, Reig M, Matilla A, Ferrer MT, Dueñas E, Mínguez B, F Castroagudín J, Ortiz I, Pascual S, Lledó JL, Gallego A, Arenas JI, Aracil C, Forne M, Muñoz C, Pons F, Sala M, Iñarrairaegui M, Martín-Llahi M, Andreu V, Garre C, Rendón P, Fuentes J, Crespo J, Rodríguez M, Bruix J, Varela M; en representación del Grupo de Estudio de Cáncer Hepático (GECH). Clinical characteristics of hepatocellular carcinoma in Spain. Comparison with the 2008-2009 period and analysis of the causes of diagnosis out of screening programs. Analysis of 686 cases in 73 centers. *Med Clin (Barc)*. 2017 Jul 21;149(2):61-71. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2016.12.048. Epub 2017 Mar 7. PMID: 28279536.
46. Larsson SC, Wolk A. Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Br J Cancer*. 2007 Oct 8;97(7):1005-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6603932. Epub 2007 Aug 14. PMID: 17700568; PMCID: PMC2360408.
47. Wang P, Kang D, Cao W, Wang Y, Liu Z. Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012 Feb;28(2):109-22. doi: 10.1002/dmrr.1291. PMID: 21898753.
48. ElMBERG M, Hultcrantz R, EkBOM A, Brandt L, Olsson S, Olsson R, Lindgren S, Lööf L, Stål P, Wallerstedt S, Almer S, Sandberg-Gertzén H, Askling J. Cancer risk in patients with hereditary hemochromatosis and in their first-degree relatives. *Gastroenterology*. 2003 Dec;125(6):1733-41. doi: 10.1053/j.gastro.2003.09.035. PMID: 14724826.
49. Atkins JL, Pilling LC, Masoli JAH, Kuo CL, Shearman JD, Adams PC, Melzer D. Association of Hemochromatosis HFE p.C282Y Homozygosity With Hepatic Malignancy. *JAMA*. 2020 Nov 24;324(20):2048-2057. doi: 10.1001/jama.2020.21566. PMID: 33231665; PMCID: PMC7686863.
50. Ramírez-Quesada W, Hevia-Urrutia F, Rojas-Alvarado M, Brenes-Pino F, Alfaro-Alcocer E, Sauma-Rodríguez J, Saborío-Rocafort M, Jiménez-Hernández M, Camacho-Matamoros N, Alvarado-Romero D. Déficit de Alfa-1 antitripsina, una causa de hepatopatía crónica comúnmente insospechada en el adulto: presentación de 9 casos con revisión de literature [ALFA-1 antitrypsin deficiency, a commonly missed cause of chronic liver disease in the adult: presentation of 9 cases with review of current literature]. *Rev Gastroenterol Peru*. 2019 Apr-Jun;39(2):127-131. Spanish. PMID: 31333228.
51. Zhou H, Ortiz-Pallardó ME, Ko Y, Fischer HP. Is heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency type PIZ a risk factor for primary liver carcinoma? *Cancer*. 2000 Jun 15;88(12):2668-76. doi: 10.1002/1097-0142(20000615)88:12<2668::aid-cnrcr4>3.0.co;2-g. PMID: 10870048.
52. Linet MS, Gridley G, Nyrén O, Mellekjær L, Olsen JH, Keehn S, Adami HO, Fraumeni JF Jr. Primary liver cancer, other malignancies, and mortality risks following porphyria: a cohort study in Denmark and Sweden. *Am J Epidemiol*. 1999 Jun 1;149(11):1010-5. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009745. PMID: 10355376.
53. Baravelli CM, Sandberg S, Aarsand AK, Tollånes MC. Porphyria cutanea tarda increases risk of hepatocellular carcinoma and premature death: a nationwide cohort study. *Orphanet J Rare Dis*. 2019 Apr 3;14(1):77. doi: 10.1186/s13023-019-1051-3. PMID: 30944007; PMCID: PMC6448269.
54. Chen CJ, Wang LY, Lu SN, Wu MH, You SL, Zhang YJ, Wang LW, Santella RM. Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1996 Jul;24(1):38-42. doi: 10.1002/hep.510240108. PMID: 8707279.
55. Chu YJ, Yang HI, Wu HC, Liu J, Wang LY, Lu SN, Lee MH, Jen CL, You SL, Santella RM, Chen CJ. Aflatoxin B<sub>1</sub> exposure increases the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic



- hepatitis B virus carriers. *Int J Cancer*. 2017 Aug 15;141(4):711-720. doi: 10.1002/ijc.30782. Epub 2017 May 26. PMID: 28509392; PMCID: PMC5513813.
56. Singh S, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W. Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2013 Feb;144(2):323-332. doi: 10.1053/j.gastro.2012.10.005. Epub 2012 Oct 12. PMID: 23063971
  57. Simon TG, Duberg AS, Aleman S, Chung RT, Chan AT, Ludvigsson JF. Association of Aspirin with Hepatocellular Carcinoma and Liver-Related Mortality. *N Engl J Med*. 2020 Mar 12;382(11):1018-1028. doi: 10.1056/NEJMoa1912035. PMID: 32160663; PMCID: PMC7317648.
  58. Bosetti C, Santucci C, Gallus S, Martinetti M, La Vecchia C. Aspirin and the risk of colorectal and other digestive tract cancers: an updated meta-analysis through 2019. *Ann Oncol*. 2020 May;31(5):558-568. doi: 10.1016/j.annonc.2020.02.012. Epub 2020 Apr 1. PMID: 32272209.
  59. Donadon V, Balbi M, Mas MD, Casarin P, Zanette G. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients with chronic liver disease. *Liver Int*. 2010 May;30(5):750-8. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02223.x. Epub 2010 Mar 12. PMID: 20331505.
  60. Tseng CH. Metformin and risk of hepatocellular carcinoma in patients with type 2 diabetes. *Liver Int*. 2018 Nov;38(11):2018-2027. doi: 10.1111/liv.13872. Epub 2018 Jun 29. PMID: 29956875.
  61. Singh S, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W. Anti-diabetic medications and the risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2013 Jun;108(6):881-91; quiz 892. doi: 10.1038/ajg.2013.5. Epub 2013 Feb 5. PMID: 23381014.
  62. Bravi F, Tavani A, Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C. Coffee and the risk of hepatocellular carcinoma and chronic liver disease: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer Prev*. 2017 Sep;26(5):368-377. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000252. PMID: 27111112.
  63. Nehlig A. Effects of Coffee on the Gastro-Intestinal Tract: A Narrative Review and Literature Update. *Nutrients*. 2022 Jan 17;14(2):399. doi: 10.3390/nu14020399. PMID: 35057580; PMCID: PMC8778943.
  64. Pelizzaro F, Cardin R, Sartori A, Imondi A, Penzo B, Farinati F. Coffee and hepatocellular carcinoma: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Hepatoma Res* 2021;7:29. doi: 10.20517/2394-5079.2020.148
  65. Chuma M, Hige S, Nakanishi M, Ogawa K, Natsuizaka M, Yamamoto Y, Asaka M. 8-Hydroxy-2'-deoxy-guanosine is a risk factor for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Sep;23(9):1431-6. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05502.x. PMID: 18854000.
  66. Luo J, Yang Y, Liu J, Lu K, Tang Z, Liu P, Liu L, Zhu Y. Systematic review with meta-analysis: meat consumption and the risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 May;39(9):913-22. doi: 10.1111/apt.12678. Epub 2014 Mar 3. PMID: 24588342.
  67. Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, Takachi R, Tanaka Y, Mizokami M, Tsugane S; Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group. Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012 Jun;142(7):1468-75. doi: 10.1053/j.gastro.2012.02.018. Epub 2012 Feb 16. PMID: 22342990.

68. Bamia C, Lagiou P, Jenab M, Aleksandrova K, Fedirko V, Trichopoulos D, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Kvaskoff M, Katzke VA, Kühn T, Boeing H, Nöthlings U, Palli D, Sieri S, Panico S, Tumino R, Naccarati A, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Weiderpass E, Skeie G, Quirós JR, Agudo A, Chirlaque MD, Sanchez MJ, Ardanaz E, Dorronsoro M, Ericson U, Nilsson LM, Wennberg M, Khaw KT, Wareham N, Key TJ, Travis RC, Ferrari P, Stepien M, Duarte-Salles T, Norat T, Murphy N, Riboli E, Trichopoulou A. Fruit and vegetable consumption in relation to hepatocellular carcinoma in a multi-centre, European cohort study. *Br J Cancer*. 2015 Mar 31;112(7):1273-82. doi: 10.1038/bjc.2014.654. PMID: 25742480; PMCID: PMC4385950.
69. Zhang W, Shu XO, Li H, Yang G, Cai H, Ji BT, Gao J, Gao YT, Zheng W, Xiang YB. Vitamin intake and liver cancer risk: a report from two cohort studies in China. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Aug 8;104(15):1173-81. doi: 10.1093/jnci/djs277. Epub 2012 Jul 17. PMID: 22811438; PMCID: PMC3611811.
70. Baumeister SE, Schlesinger S, Aleksandrova K, Jochem C, Jenab M, Gunter MJ, Overvad K, Tjønneland A, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F, Fournier A, Kühn T, Kaaks R, Pischon T, Boeing H, Trichopoulou A, Bamia C, La Vecchia C, Masala G, Panico S, Fasanelli F, Tumino R, Gioni S, Bueno de Mesquita B, Vermeulen R, May AM, Borch KB, Oyeyemi SO, Ardanaz E, Rodríguez-Barranco M, Dolores Chirlaque López M, Felez-Nobrega M, Sonestedt E, Ohlsson B, Hemmingsson O, Werner M, Perez-Cornago A, Ferrari P, Stepien M, Freisling H, Tsilidis KK, Ward H, Riboli E, Weiderpass E, Leitzmann MF. Association between physical activity and risk of hepatobiliary cancers: A multinational cohort study. *J Hepatol*. 2019 May;70(5):885-892. doi: 10.1016/j.jhep.2018.12.014. Epub 2018 Dec 22. PMID: 30582978.
71. Golabi P, Locklear CT, Austin P, Afdhal S, Byrns M, Gerber L, Younossi ZM. Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review. *World J Gastroenterol*. 2016 Jul 21;22(27):6318-27. doi: 10.3748/wjg.v22.i27.6318. PMID: 27468220; PMCID: PMC4945989.
72. Aminian A, Al-Kurd A, Wilson R, Bena J, Fayazzadeh H, Singh T, Albaugh VL, Shariff FU, Rodriguez NA, Jin J, Brethauer SA, Dasarathy S, Alkhoury N, Schauer PR, McCullough AJ, Nissen SE. Association of Bariatric Surgery With Major Adverse Liver and Cardiovascular Outcomes in Patients With Biopsy-Proven Nonalcoholic Steatohepatitis. *JAMA*. 2021 Nov 23;326(20):2031-2042. doi: 10.1001/jama.2021.19569. PMID: 34762106; PMCID: PMC8587225.
73. Cernea S, Onișor D. Screening and interventions to prevent nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2023 Jan 14;29(2):286-309. doi: 10.3748/wjg.v29.i2.286. PMID: 36687124; PMCID: PMC9846941.
74. Lee Y, Doumouras AG, Yu J, Brar K, Banfield L, Gmora S, Anvari M, Hong D. Complete Resolution of Nonalcoholic Fatty Liver Disease After Bariatric Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019 May;17(6):1040-1060.e11. doi: 10.1016/j.cgh.2018.10.017. Epub 2018 Oct 13. PMID: 30326299.
75. Ramai D, Singh J, Lester J, Khan SR, Chandan S, Tartaglia N, Ambrosi A, Serviddio G, Facciorusso A. Systematic review with meta-analysis: bariatric surgery reduces the incidence of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2021 May;53(9):977-984. doi: 10.1111/apt.16335. Epub 2021 Mar 15. PMID: 33721336.

76. Odena G; Bataller R. Fibrogenesis hepática: fisiopatología. *Gastroenterol Hepatol.* 2012;35(Supl 2):3-9 doi: 10.1016/S0210-5705(12)70043-2
77. Zhang M, Wu Z, Salas SS, Aguilar MM, Trillos-Almanza MC, Buist-Homan M, Moshage H. Arginase 1 expression is increased during hepatic stellate cell activation and facilitates collagen synthesis. *J Cell Biochem.* 2023 Jun;124(6):808-817. doi: 10.1002/jcb.30403. Epub 2023 Apr 12. PMID: 37042199.
78. Yang SF, Chang CW, Wei RJ, Shiue YL, Wang SN, Yeh YT. Involvement of DNA damage response pathways in hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int.* 2014;2014:153867. doi: 10.1155/2014/153867. Epub 2014 Apr 28. PMID: 24877058; PMCID: PMC4022277.
79. Shiraha H, Yamamoto K, Namba M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). *Int J Oncol.* 2013 Apr;42(4):1133-8. doi: 10.3892/ijo.2013.1829. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23426905; PMCID: PMC3622653.
80. Wang Y, Wu MC, Sham JS, Zhang W, Wu WQ, Guan XY. Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray. *Cancer.* 2002 Dec 1;95(11):2346-52. doi: 10.1002/cncr.10963. PMID: 12436441.
81. Weihrauch M, Benick M, Lehner G, Wittekind M, Bader M, Wrbitzk R, Tannapfel A. High prevalence of K-ras-2 mutations in hepatocellular carcinomas in workers exposed to vinyl chloride. *Int Arch Occup Environ Health.* 2001 Aug;74(6):405-10. doi: 10.1007/s004200100244. PMID: 11563603.
82. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27;417(6892):949-54. doi: 10.1038/nature00766. Epub 2002 Jun 9. PMID: 12068308.
83. Hall EW, Weng MK, Harris AM, Schillie S, Nelson NP, Ortega-Sanchez IR, Rosenthal E, Sullivan PS, Lopman B, Jones J, Bradley H, Rosenberg ES. Assessing the Cost-Utility of Universal Hepatitis B Vaccination Among Adults. *J Infect Dis.* 2022 Sep 21;226(6):1041-1051. doi: 10.1093/infdis/jiac088. PMID: 35260904.
84. Lee HW, Lee H, Kim BK, Chang Y, Jang JY, Kim DY. Cost-effectiveness of chronic hepatitis C screening and treatment. *Clin Mol Hepatol.* 2022 Apr;28(2):164-173. doi: 10.3350/cmh.2021.0193. Epub 2021 Dec 27. PMID: 34955002; PMCID: PMC9013616.
85. Prorok PC. Epidemiologic approach for cancer screening. Problems in design and analysis of trials. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1992 May;14(2):117-28. doi: 10.1097/00043426-199205000-00005. PMID: 1530116.
86. Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, Foschi FG, Lenzi M, Mazzella G, Verucchi G, Andreone P, Brillanti S. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *J Hepatol.* 2016 Oct;65(4):727-733. doi: 10.1016/j.jhep.2016.06.015. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27349488.
87. Mariño Z, Darnell A, Lens S, Sapena V, Díaz A, Belmonte E, Perelló C, Calleja JL, Varela M, Rodríguez M, Rodríguez de Lope C, Llerena S, Torras X, Gallego A, Sala M, Morillas RM, Minguez B, Llaneras J, Coll S, Carrion JA, Iñarrairaegui M, Sangro B, Vilana R, Sole M, Ayuso C, Ríos J, Forn X, Bruix J, Reig M. Time association between hepatitis C therapy and

- hepatocellular carcinoma emergence in cirrhosis: Relevance of non-characterized nodules. *J Hepatol.* 2019 May;70(5):874-884. doi: 10.1016/j.jhep.2019.01.005. Epub 2019 Jan 24. Erratum in: *J Hepatol.* 2021 Feb;74(2):491. PMID: 30684506.
88. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, Everson GT, Lindsay KL, Lee WM, Bonkovsky HL, Dienstag JL, Ghany MG, Morishima C, Goodman ZD; HALT-C Trial Group. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology.* 2009 Jan;136(1):138-48. doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.014. Epub 2008 Sep 18. PMID: 18848939; PMCID: PMC3749922.
  89. Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, Arakawa Y, Ide T, Sata M, Inoue O, Yano M, Tanaka M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Kuroki T, Imazeki F, Yokosuka O, Kinoyama S, Yamada G, Omata M. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy. *Ann Intern Med.* 1999 Aug 3;131(3):174-81. doi: 10.7326/0003-4819-131-3-199908030-00003. PMID: 10428733.
  90. Reig M, Forner A, Ávila MA, Ayuso C, Minguez B, Varela M, Bilbao I, Bilbao JI, Burrel M, Bustamante J, Ferrer J, Gómez MÁ, Llovet JM, De la Mata M, Matilla A, Pardo F, Pastrana MA, Rodríguez-Perálvarez M, Tabernero J, Urbano J, Vera R, Sangro B, Bruix J. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update of the consensus document of the AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI, and SETH. *Med Clin (Barc).* 2021 May 7;156(9):463.e1-463.e30. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2020.09.022. Epub 2021 Jan 16. PMID: 33461840.
  91. 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. doi: 10.1002/hep.24199. PMID: 21374666; PMCID: PMC3084991.
  92. Kanwal F, Singal AG. Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: Current Best Practice and Future Direction. *Gastroenterology.* 2019 Jul;157(1):54-64. doi: 10.1053/j.gastro.2019.02.049. Epub 2019 Apr 12. PMID: 30986389; PMCID: PMC6636644.
  93. Reig M, Gambato M, Man NK, Roberts JP, Victor D, Orci LA, Toso C. Should Patients With NAFLD/NASH Be Surveyed for HCC? *Transplantation.* 2019 Jan;103(1):39-44. doi: 10.1097/TP.0000000000002361. PMID: 30080818.
  94. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Liver transplantation. *J Hepatol.* 2016 Feb;64(2):433-485. doi: 10.1016/j.jhep.2015.10.006. Epub 2015 Nov 17. PMID: 26597456.
  95. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2018 Mar 31;391(10127):1301-1314. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30010-2. Epub 2018 Jan 5. PMID: 29307467.
  96. Wong LL, Limm WM, Severino R, Wong LM. Improved survival with screening for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2000 May;6(3):320-5. doi: 10.1053/iv.2000.4875. PMID: 10827233.
  97. Bolondi L, Sofia S, Siringo S, Gaiani S, Casali A, Zironi G, Piscaglia F, Gramantieri L, Zanetti M, Sherman M. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut.* 2001 Feb;48(2):251-9. doi: 10.1136/gut.48.2.251. PMID: 11156649; PMCID: PMC1728189.
  98. Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, Morabito A, De Franchis R, Colombo M. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology.* 2004 Apr;126(4):1005-14. doi: 10.1053/j.gastro.2003.12.049. PMID: 15057740.

99. Arguedas MR, Chen VK, Eloubeidi MA, Fallon MB. Screening for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C cirrhosis: a cost-utility analysis. *Am J Gastroenterol.* 2003 Mar;98(3):679-90. doi: 10.1111/j.1572-0241.2003.07327.x. PMID: 12650806.
100. Sarasin FP, Giostra E, Hadengue A. Cost-effectiveness of screening for detection of small hepatocellular carcinoma in western patients with Child-Pugh class A cirrhosis. *Am J Med.* 1996 Oct;101(4):422-34. doi: 10.1016/S0002-9343(96)00197-0. PMID: 8873514.
101. Lin OS, Keeffe EB, Sanders GD, Owens DK. Cost-effectiveness of screening for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Jun 1;19(11):1159-72. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.01963.x. PMID: 15153169.
102. Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004 Jul;130(7):417-22. doi: 10.1007/s00432-004-0552-0. PMID: 15042359.
103. Barbara L, Benzi G, Gaiani S, Fusconi F, Zironi G, Siringo S, Rigamonti A, Barbara C, Grigioni W, Mazziotti A, et al. Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology.* 1992 Jul;16(1):132-7. doi: 10.1002/hep.1840160122. PMID: 1352268.
104. Ebara M, Hatano R, Fukuda H, Yoshikawa M, Sugiura N, Saisho H. Natural course of small hepatocellular carcinoma with underlying cirrhosis. A study of 30 patients. *Hepatogastroenterology.* 1998 Aug;45 Suppl 3:1214-20. PMID: 9730377.
105. Santi V, Trevisani F, Gramenzi A, Grignaschi A, Mirici-Cappa F, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegnù L, Farinati F, Zoli M, Giannini EG, Borzio F, Caturelli E, Chiamonte M, Bernardi M; Italian Liver Cancer (ITA.LI.CA) Group. Semiannual surveillance is superior to annual surveillance for the detection of early hepatocellular carcinoma and patient survival. *J Hepatol.* 2010 Aug;53(2):291-7. doi: 10.1016/j.jhep.2010.03.010. Epub 2010 Apr 27. PMID: 20483497.
106. Trinchet JC, Chaffaut C, Bourcier V, Degos F, Henrion J, Fontaine H, Roulot D, Mallat A, Hillaire S, Cales P, Ollivier I, Vinel JP, Mathurin P, Bronowicki JP, Vilgrain V, N'Kontchou G, Beaugrand M, Chevret S; Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire (GRETCH). Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatology.* 2011 Dec;54(6):1987-97. doi: 10.1002/hep.24545. PMID: 22144108.
107. Andersson KL, Salomon JA, Goldie SJ, Chung RT. Cost effectiveness of alternative surveillance strategies for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008 Dec;6(12):1418-24. doi: 10.1016/j.cgh.2008.08.005. Epub 2008 Aug 19. PMID: 18848905; PMCID: PMC4340842.
108. Tatarinov Y.S. Presence of embryospecific a-globulin in the serum of patients with primary hepatocellular carcinoma. *Vopr. Med. Khim.* 1964;10:90-91. PMID: 14207501.
109. Force M, Park G, Chalikonda D, Roth C, Cohen M, Halegoua-DeMarzio D, Hann HW. Alpha-Fetoprotein (AFP) and AFP-L3 Is Most Useful in Detection of Recurrence of Hepatocellular Carcinoma in Patients after Tumor Ablation and with Low AFP Level. *Viruses.* 2022 Apr 8;14(4):775. doi: 10.3390/v14040775. PMID: 35458505; PMCID: PMC9031551.
110. Lin B, Wang Q, Liu K, Dong X, Zhu M, Li M. Alpha-Fetoprotein Binding Mucin and Scavenger Receptors: An Available Bio-Target for Treating Cancer. *Front Oncol.* 2021 Feb 25;11:625936. doi: 10.3389/fonc.2021.625936. PMID: 33718192; PMCID: PMC7947232.

111. Carr BI, Akkiz H, Üsküdar O, Yalçın K, Guerra V, Kuran S, Karaoğullarından Ü, Altıntaş E, Özakyol A, Tokmak S, Ballı T, Yücesoy M, Bahçeci Hİ, Ülkü A, Akçam T, Polat KY, Ekinci N, Şimşek H, Örmeci N, Sonsuz A, Demir M, Kılıç M, Uygun A, Demir A, Delik A, Arslan B, Doran F, Yılmaz S, Tokat Y. HCC with low- and normal-serum alpha-fetoprotein levels. *Clin Pract (Lond)*. 2018;15(1):453-464. doi: 10.4172/clinical-practice.1000393. PMID: 29576865; PMCID: PMC5865641.
112. Lee CW, Tsai HI, Lee WC, Huang SW, Lin CY, Hsieh YC, Kuo T, Chen CW, Yu MC. Normal Alpha-Fetoprotein Hepatocellular Carcinoma: Are They Really Normal? *J Clin Med*. 2019 Oct 19;8(10):1736. doi: 10.3390/jcm8101736. PMID: 31635078; PMCID: PMC6832124.
113. Sherman M. Alphafetoprotein: an obituary. *J Hepatol*. 2001 Apr;34(4):603-5. doi: 10.1016/s0168-8278(01)00025-3. PMID: 11394662.
114. Carmona Soria I, Cordero Ruiz P. Estrategias actuales de cribado de hepatocarcinoma. *RAPD Online* 2016;39(6): 510-516.
115. Bialecki ES, Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*. 2005;7(1):26-34. doi: 10.1080/13651820410024049. PMID: 18333158; PMCID: PMC2023919.
116. Luo JC, Hwang SJ, Wu JC, Lai CR, Li CP, Chang FY, Chiang JH, Lui WY, Chu CW, Lee SD. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma patients with paraneoplastic syndromes. *Hepatogastroenterology*. 2002 Sep-Oct;49(47):1315-9. PMID: 12239934.
117. Dogra S, Jindal R. Cutaneous manifestations of common liver diseases. *J Clin Exp Hepatol*. 2011 Dec;1(3):177-84. doi: 10.1016/S0973-6883(11)60235-1. Epub 2012 Jan 2. PMID: 25755383; PMCID: PMC3940632.
118. Chearanai O, Plengvanit U, Asavanich C, Damrongsak D, Sindhvananda K, Boonyapisit S. Spontaneous rupture of primary hepatoma: report of 63 cases with particular reference to the pathogenesis and rationale treatment by hepatic artery ligation. *Cancer*. 1983 Apr 15;51(8):1532-6. doi: 10.1002/1097-0142(19830415)51:8<1532::aid-cncr2820510829>3.0.co;2-3. PMID: 6297703.
119. Lin YT, Liu CJ, Chen TJ, Chen TL, Yeh YC, Wu HS, Tseng CP, Wang FD, Tzeng CH, Fung CP. Pyogenic liver abscess as the initial manifestation of underlying hepatocellular carcinoma. *Am J Med*. 2011 Dec;124(12):1158-64. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.08.012. PMID: 22114829.
120. Uka K, Aikata H, Takaki S, Shirakawa H, Jeong SC, Yamashina K, Hiramatsu A, Kodama H, Takahashi S, Chayama K. Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 21;13(3):414-20. doi: 10.3748/wjg.v13.i3.414. PMID: 17230611; PMCID: PMC4065897.
121. Yi J, Gwak GY, Sinn DH, Kim YJ, Kim HN, Choi MS, Lee JH, Koh KC, Paik SW, Yoo BC. Screening for extrahepatic metastases by additional staging modalities is required for hepatocellular carcinoma patients beyond modified UICC stage T1. *Hepatogastroenterology*. 2013 Mar-Apr;60(122):328-32. doi: 10.5754/hge12721. PMID: 23241421.
122. Harding JJ, Abu-Zeinah G, Chou JF, Owen DH, Ly M, Lowery MA, Capanu M, Do R, Kemeny NE, O'Reilly EM, Saltz LB, Abou-Alfa GK. Frequency, Morbidity, and Mortality of Bone Metastases in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018 Jan;16(1):50-58. doi: 10.6004/jnccn.2017.7024. PMID: 29295881.
123. Wolf E, Rich NE, Marrero JA, Parikh ND, Singal AG. Use of Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients With Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hepatology*.

- 2021 Feb;73(2):713-725. doi: 10.1002/hep.31309. Epub 2020 Nov 20. PMID: 32383272; PMCID: PMC7648722.
124. Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Solé M, Ayuso JR, Boix L, Sala M, Varela M, Llovet JM, Brú C, Bruix J. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 Jan;47(1):97-104. doi: 10.1002/hep.21966. Erratum in: *Hepatology*. 2008 Feb;47(2):769. PMID: 18069697.
  125. Roskams T, Kojiro M. Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis*. 2010 Feb;30(1):17-25. doi: 10.1055/s-0030-1247129. Epub 2010 Feb 19. PMID: 20175030.
  126. Levy I, Greig PD, Gallinger S, Langer B, Sherman M. Resection of hepatocellular carcinoma without preoperative tumor biopsy. *Ann Surg*. 2001 Aug;234(2):206-9. doi: 10.1097/00000658-200108000-00010. PMID: 11505066; PMCID: PMC1422007.
  127. Leoni S, Piscaglia F, Golfieri R, Camaggi V, Vidili G, Pini P, Bolondi L. 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. doi: 10.1038/ajg.2009.654. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19935786.
  128. Joo I, Lee JM. Recent Advances in the Imaging Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: Value of Gadoteric Acid-Enhanced MRI. *Liver Cancer*. 2016 Feb;5(1):67-87. doi: 10.1159/000367750. Epub 2015 Dec 18. PMID: 26989660; PMCID: PMC4789886.
  129. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2018 Jul;69(1):182-236. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.019. Epub 2018 Apr 5. Erratum in: *J Hepatol*. 2019 Apr;70(4):817. PMID: 29628281.
  130. American College of Radiology. CEUS-LI-RADS version, 2017. 2017, <https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/RADS/LI-RADS/CEUS-LI-RADS2017-Core.pdf>
  131. Bartolotta TV, Taibbi A, Midiri M, Lagalla R. Contrast-enhanced ultrasound of hepatocellular carcinoma: where do we stand? *Ultrasonography*. 2019 Jul;38(3):200-214. doi: 10.14366/usg.18060. Epub 2019 Feb 25. PMID: 31006227; PMCID: PMC6595127.
  132. Sangiovanni A, Manini MA, Iavarone M, Romeo R, Forzenigo LV, Fraquelli M, Massironi S, Della Corte C, Ronchi G, Rumi MG, Biondetti P, Colombo M. 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. doi: 10.1136/gut.2009.187286. Epub 2009 Dec 1. PMID: 19951909.
  133. Khalili K, Kim TK, Jang HJ, Haider MA, Khan L, Guindi M, Sherman M. Optimization of imaging diagnosis of 1-2 cm hepatocellular carcinoma: an analysis of diagnostic performance and resource utilization. *J Hepatol*. 2011 Apr;54(4):723-8. doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.025. Epub 2010 Sep 22. PMID: 21156219.
  134. Kim SE, Lee HC, Shim JH, Park HJ, Kim KM, Kim PN, Shin YM, Yu ES, Chung YH, Suh DJ. Noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma in hepatic masses >2 cm in a hepatitis B virus-endemic area. *Liver Int*. 2011 Nov;31(10):1468-76. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02529.x. Epub 2011 Apr 11. PMID: 21745284.
  135. Chernyak V, Fowler KJ, Kamaya A, Kielar AZ, Elsayes KM, Bashir MR, Kono Y, Do RK, Mitchell DG, Singal AG, Tang A, Sirlin CB. Liver Imaging Reporting and Data System (LI-RADS) Version 2018: Imaging of Hepatocellular Carcinoma in At-Risk Patients. *Radiology*. 2018

- Dec;289(3):816-830. doi: 10.1148/radiol.2018181494. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30251931; PMCID: PMC6677371.
136. Chotipanich C, Kunawudhi A, Promteangtrong C, Tungsuppawattanakit P, Sricharunrat T, Wongsap P. Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma Using C11 Choline PET/CT: Comparison with F18 FDG, ContrastEnhanced MRI and MDCT. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(7):3569-73. PMID: 27510010.
137. Cartier V, Crouan A, Esvan M, Oberti F, Michalak S, Gallix B, Seror O, Paisant A, Vilgrain V, Aubé C; CHIC group. Suspicious liver nodule in chronic liver disease: Usefulness of a second biopsy. *Diagn Interv Imaging*. 2018 Jul-Aug;99(7-8):493-499. doi: 10.1016/j.diii.2017.12.014. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29501461.
138. Caturelli E, Biasini E, Bartolucci F, Facciorusso D, Decembrino F, Attino V, Bisceglia M. Diagnosis of hepatocellular carcinoma complicating liver cirrhosis: utility of repeat ultrasound-guided biopsy after unsuccessful first sampling. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2002 Jul-Aug;25(4):295-9. doi: 10.1007/s00270-001-0123-6. Epub 2002 Mar 27. PMID: 12324817.
139. Stigliano R, Marelli L, Yu D, Davies N, Patch D, Burroughs AK. Seeding following percutaneous diagnostic and therapeutic approaches for hepatocellular carcinoma. What is the risk and the outcome? Seeding risk for percutaneous approach of HCC. *Cancer Treat Rev*. 2007 Aug;33(5):437-47. doi: 10.1016/j.ctrv.2007.04.001. Epub 2007 May 18. PMID: 17512669.
140. Sherman M, Bruix J. Biopsy for liver cancer: how to balance research needs with evidence-based clinical practice. *Hepatology*. 2015 Feb;61(2):433-6. doi: 10.1002/hep.27563. PMID: 25308482.
141. Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-Fàbrega J, Burrel M, Garcia-Criado Á, Kelley RK, Galle PR, Mazzaferro V, Salem R, Sangro B, Singal AG, Vogel A, Fuster J, Ayuso C, Bruix J. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol*. 2022 Mar;76(3):681-693. doi: 10.1016/j.jhep.2021.11.018. Epub 2021 Nov 19. PMID: 34801630; PMCID: PMC8866082.
142. Ortiz Chimbo DS, Alañón Martínez PE, Barrera Baena P. Introducción a las enfermedades hepáticas. En: Rosales Zabal JM, editor. *Manual de Hepatología*. Primera edición. Sociedad Andaluza de Patología Digestiva; 2022. p. 10-17.
143. Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C, Satomura S, Teng M, Reeves HL, O'Beirne J, Fox R, Skowronska A, Palmer D, Yeo W, Mo F, Lai P, Iñarrairaegui M, Chan SL, Sangro B, Miksad R, Tada T, Kumada T, Toyoda H. Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach-the ALBI grade. *J Clin Oncol*. 2015 Feb 20;33(6):550-8. doi: 10.1200/JCO.2014.57.9151. Epub 2014 Dec 15. PMID: 25512453; PMCID: PMC4322258.
144. Hiraoka A, Kumada T, Kudo M, Hirooka M, Tsuji K, Itobayashi E, Kariyama K, Ishikawa T, Tajiri K, Ochi H, Tada T, Toyoda H, Nouse K, Joko K, Kawasaki H, Hiasa Y, Michitaka K; Real-Life Practice Experts for HCC (RELPEC) Study Group and HCC 48 Group (hepatocellular carcinoma experts from 48 clinics). Albumin-Bilirubin (ALBI) Grade as Part of the Evidence-Based Clinical Practice Guideline for HCC of the Japan Society of Hepatology: A Comparison with the Liver Damage and Child-Pugh Classifications. *Liver Cancer*. 2017 Jun;6(3):204-215. doi: 10.1159/000452846. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28626732; PMCID: PMC5473065.



145. Kamath PS, Kim WR; Advanced Liver Disease Study Group. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*. 2007 Mar;45(3):797-805. doi: 10.1002/hep.21563. PMID: 17326206.
146. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R; United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. 2003 Jan;124(1):91-6. doi: 10.1053/gast.2003.50016. PMID: 12512033.
147. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982 Dec;5(6):649-55. PMID: 7165009.
148. Cho YK, Kim JK, Kim WT, Chung JW. Hepatic resection versus radiofrequency ablation for very early stage hepatocellular carcinoma: a Markov model analysis. *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1284-90. doi: 10.1002/hep.23466. PMID: 20099299.
149. Takayama T, Hasegawa K, Izumi N, Kudo M, Shimada M, Yamanaka N, Inomata M, Kaneko S, Nakayama H, Kawaguchi Y, Kashiwabara K, Tateishi R, Shiina S, Koike K, Matsuyama Y, Omata M, Makuuchi M, Kokudo N. Surgery versus Radiofrequency Ablation for Small Hepatocellular Carcinoma: A Randomized Controlled Trial (SURF Trial). *Liver Cancer*. 2021 Dec 29;11(3):209-218. doi: 10.1159/000521665. PMID: 35949295; PMCID: PMC9218617.
150. Doyle A, Gorgen A, Muaddi H, Aravinthan AD, Issachar A, Mironov O, Zhang W, Kachura J, Beecroft R, Cleary SP, Ghanekar A, Greig PD, McGilvray ID, Selzner M, Cattral MS, Grant DR, Lilly LB, Selzner N, Renner EL, Sherman M, Sapisochin G. Outcomes of radiofrequency ablation as first-line therapy for hepatocellular carcinoma less than 3 cm in potentially transplantable patients. *J Hepatol*. 2019 May;70(5):866-873. doi: 10.1016/j.jhep.2018.12.027. Epub 2019 Jan 5. PMID: 30615906.
151. Mehta N, Bhangui P, Yao FY, Mazzaferro V, Toso C, Akamatsu N, Durand F, Ijzermans J, Polak W, Zheng S, Roberts JP, Sapisochin G, Hibi T, Kwan NM, Ghobrial M, Soin A. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. Working Group Report from the ILTS Transplant Oncology Consensus Conference. *Transplantation*. 2020 Jun;104(6):1136-1142. doi: 10.1097/TP.0000000000003174. PMID: 32217938.
152. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, Li D, Verret W, Xu DZ, Hernandez S, Liu J, Huang C, Mulla S, Wang Y, Lim HY, Zhu AX, Cheng AL; IMbrave150 Investigators. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2020 May 14;382(20):1894-1905. doi: 10.1056/NEJMoa1915745. PMID: 32402160.
153. Abou-Alfa GK, Chan SL, Kudo M, Lau G, Kelley RK, Furuse J, Sukeepaisarnjaroen W, Kang YK, Dao TV, De Toni EN, Rimassa L, Breder VV, Vasilyev A, Heurgue A, Tam V, Mody K, Thungappa SC, He P, Negro A, Sangro B. Phase 3 randomized, open-label, multicenter study of tremelimumab (T) and durvalumab (D) as first-line therapy in patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (uHCC): HIMALAYA. *J Clin Oncol* 2022;40(4 Suppl.):379. doi: 10.1200/JCO.2022.40.4\_suppl.379
154. Sacco R, Mismas V, Marceglia S, Romano A, Giacomelli L, Bertini M, Federici G, Metrangolo S, Parisi G, Tumino E, Bresci G, Corti A, Tredici M, Piccinno M, Giorgi L, Bartolozzi C, Bargellini I. Transarterial radioembolization for hepatocellular carcinoma: An update and

- perspectives. *World J Gastroenterol.* 2015 Jun 7;21(21):6518-25. doi: 10.3748/wjg.v21.i21.6518. PMID: 26074690; PMCID: PMC4458762.
155. Roayaie S, Blume IN, Thung SN, Guido M, Fiel MI, Hiotis S, Labow DM, Llovet JM, Schwartz ME. A system of classifying microvascular invasion to predict outcome after resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2009 Sep;137(3):850-5. doi: 10.1053/j.gastro.2009.06.003. Epub 2009 Jun 12. PMID: 19524573; PMCID: PMC2739450.
  156. Molina Romero FX, Morón Canis JM, Morales Serrano R, Rodríguez Pino JC, Palma Zamora E, González Argente FX. Survival analysis of patients undergoing a curative resection of hepatocellular carcinoma. Experience of the General and Digestive Surgery Department of the Son Espases University Hospital. *Medicina Balear* 2018; 33 (1); 20-32. doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.33.01.20
  157. Ferreiro AO, Vazquez-Millán MA, López FS, Gutiérrez MG, Díaz SP, Patiño MJ. Everolimus-based immunosuppression in patients with hepatocellular carcinoma at high risk of recurrence after liver transplantation: a case series. *Transplant Proc.* 2014 Dec;46(10):3496-501. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.08.045. PMID: 25498079.
  158. Gunsar F. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma Beyond the Milan Criteria. *Exp Clin Transplant.* 2017 Mar;15(Suppl 2):59-64. doi: 10.6002/ect.TOND16.L16. PMID: 28302001.
  159. Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, Ayuso C, Sala M, Muchart J, Solà R, Rodés J, Bruix J; Barcelona Liver Cancer Group. 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. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08649-X. PMID: 12049862.
  160. Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, Fan ST, Wong J. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2002 May;35(5):1164-71. doi: 10.1053/jhep.2002.33156. PMID: 11981766.
  161. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology.* 2003 Feb;37(2):429-42. doi: 10.1053/jhep.2003.50047. PMID: 12540794.
  162. Forner A, Reig M, Varela M, Burrel M, Feliu J, Briceño J, Sastre J, Martí-Bonmati L, Llovet JM, Bilbao JI, Sangro B, Pardo F, Ayuso C, Bru C, Tabernero J, Bruix J. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. *Med Clin (Barc).* 2016 Jun 3;146(11):511.e1-511.e22. Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2016.01.028. Epub 2016 Mar 11. PMID: 26971984.
  163. Burrel M, Reig M, Forner A, Barrufet M, de Lope CR, Tremosini S, Ayuso C, Llovet JM, Real MI, Bruix J. Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolisation (TACE) using Drug Eluting Beads. Implications for clinical practice and trial design. *J Hepatol.* 2012 Jun;56(6):1330-5. doi: 10.1016/j.jhep.2012.01.008. Epub 2012 Feb 5. PMID: 22314428.
  164. Malagari K, Pomoni M, Moschouris H, Bouma E, Koskinas J, Stefaniotou A, Marinis A, Kelekis A, Alexopoulou E, Chatziioannou A, Chatzimichael K, Dourakis S, Kelekis N, Rizos S, Kelekis D. Chemoembolization with doxorubicin-eluting beads for unresectable

- hepatocellular carcinoma: five-year survival analysis. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2012 Oct;35(5):1119-28. doi: 10.1007/s00270-012-0394-0. Epub 2012 May 22. PMID: 22614031.
165. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008 Jul 24;359(4):378-90. doi: 10.1056/NEJMoa0708857. PMID: 18650514.
  166. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2009 Jan;10(1):25-34. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70285-7. Epub 2008 Dec 16. PMID: 19095497.
  167. Yao FY, Mehta N, Flemming J, Dodge J, Hameed B, Fix O, Hirose R, Fidelman N, Kerlan RK Jr, Roberts JP. Downstaging of hepatocellular cancer before liver transplant: long-term outcome compared to tumors within Milan criteria. *Hepatology*. 2015 Jun;61(6):1968-77. doi: 10.1002/hep.27752. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25689978; PMCID: PMC4809192.
  168. Yao FY, Fidelman N. Reassessing the boundaries of liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Where do we stand with tumor down-staging? *Hepatology*. 2016 Mar;63(3):1014-25. doi: 10.1002/hep.28139. Epub 2015 Nov 21. PMID: 26560491.
  169. Bruix J, da Fonseca LG, Reig M. Insights into the success and failure of systemic therapy for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Oct;16(10):617-630. doi: 10.1038/s41575-019-0179-x. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31371809.
  170. International Society of Liquid Biopsy. (2023, 16 de marzo). Home. <https://islb.info/>
  171. Romero-Palacios PJ, Alcázar-Navarrete B, Díaz Mochón JJ, de Miguel-Pérez D, López Hidalgo JL, Garrido-Navas MDC, Quero Valenzuela F, Lorente JA, Serrano MJ. Liquid biopsy beyond of cancer: Circulating pulmonary cells as biomarkers of COPD aggressivity. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Apr;136:31-36. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.02.003. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30878126.
  172. Serrano MJ, Garrido-Navas MC, Diaz Mochon JJ, Cristofanilli M, Gil-Bazo I, Pauwels P, Malapelle U, Russo A, Lorente JA, Ruiz-Rodriguez AJ, Paz-Ares LG, Vilar E, Raez LE, Cardona AF, Rolfo C; International Society of Liquid Biopsy. Precision Prevention and Cancer Interception: The New Challenges of Liquid Biopsy. *Cancer Discov*. 2020 Nov;10(11):1635-1644. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-0466. Epub 2020 Oct 9. PMID: 33037026.
  173. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J*. 1869;14:146
  174. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, Zhu F, Zhou D, Zheng S, Chen Y, Zhou J. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Nov 22;6(1):404. doi: 10.1038/s41392-021-00817-8. PMID: 34803167; PMCID: PMC8606574.
  175. Verghese R, Srinath S, Jayaram C. Circulating Tumor Cells– A Review. *Oral MaxillofacPathol J* 2022; 13(2):141-145
  176. Feng Z, Wu J, Lu Y, Chan YT, Zhang C, Wang D, Luo D, Huang Y, Feng Y, Wang N. Circulating tumor cells in the early detection of human cancers. *Int J Biol Sci*. 2022 May 1;18(8):3251-3265. doi: 10.7150/ijbs.71768. PMID: 35637960; PMCID: PMC9134923.
  177. Cheng ML, Pectasides E, Hanna GJ, Parsons HA, Choudhury AD, Oxnard GR. Circulating tumor DNA in advanced solid tumors: Clinical relevance and future directions. *CA*

- Cancer J Clin. 2021 Mar;71(2):176-190. doi: 10.3322/caac.21650. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33165928.
178. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:199-227. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222. PMID: 18817506; PMCID: PMC2769253.
179. Rodríguez-Martínez A, de Miguel-Pérez D, Ortega FG, García-Puche JL, Robles-Fernández I, Exposito J, Martorell-Marugan J, Carmona-Sáez P, Garrido-Navas MDC, Rolfo C, Ilyine H, Lorente JA, Legueren M, Serrano MJ. Exosomal miRNA profile as complementary tool in the diagnostic and prediction of treatment response in localized breast cancer under neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2019 Feb 6;21(1):21. doi: 10.1186/s13058-019-1109-0. PMID: 30728048; PMCID: PMC6366103.
180. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front Immunol.* 2018 Apr 30;9:738. doi: 10.3389/fimmu.2018.00738. PMID: 29760691; PMCID: PMC5936763.
181. Yu D, Li Y, Wang M, Gu J, Xu W, Cai H, Fang X, Zhang X. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol Cancer.* 2022 Feb 18;21(1):56. doi: 10.1186/s12943-022-01509-9. PMID: 35180868; PMCID: PMC8855550.
182. Palacín-Aliana I, García-Romero N, Asensi-Puig A, Carrión-Navarro J, González-Rumayor V, Ayuso-Sacido Á. Clinical Utility of Liquid Biopsy-Based Actionable Mutations Detected via ddPCR. *Biomedicines.* 2021 Jul 28;9(8):906. doi: 10.3390/biomedicines9080906. PMID: 34440110; PMCID: PMC8389639
183. Underwood JJ, Quadri RS, Kalva SP, Shah H, Sanjeevaiah AR, Muhammad SB, Sutphin PD. Liquid biopsy for cancer: review and implications for the Radiologist. *Radiology* 2020 294:1, 5-17. doi: org/10.1148/radiol.2019182584
184. Russano M, Napolitano A, Ribelli G, Iuliani M, Simonetti S, Citarella F, Pantano F, Dell'Aquila E, Anesi C, Silvestris N, Argentiero A, Solimando AG, Vincenzi B, Tonini G, Santini D. Liquid biopsy and tumor heterogeneity in metastatic solid tumors: the potentiality of blood samples. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 May 27;39(1):95. doi: 10.1186/s13046-020-01601-2. Erratum in: *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 Jun 24;39(1):120. PMID: 32460897; PMCID: PMC7254767.
185. Lone SN, Nisar S, Masoodi T, Singh M, Rizwan A, Hashem S, El-Rifai W, Bedognetti D, Batra SK, Haris M, Bhat AA, Macha MA. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer.* 2022 Mar 18;21(1):79. doi: 10.1186/s12943-022-01543-7. PMID: 35303879; PMCID: PMC8932066.
186. Labгаа I, Villanueva A, Dormond O, Demartines N, Melloul E. The Role of Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma Prognostication. *Cancers (Basel).* 2021 Feb 6;13(4):659. doi: 10.3390/cancers13040659. PMID: 33562173; PMCID: PMC7914891.
187. Yang JC, Hu JJ, Li YX, Luo W, Liu JZ, Ye DW. Clinical Applications of Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol.* 2022 Feb 8;12:781820. doi: 10.3389/fonc.2022.781820. PMID: 35211399; PMCID: PMC8860830.
188. Ye Q, Ling S, Zheng S, Xu X. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Mol Cancer.* 2019 Jul 3;18(1):114. doi: 10.1186/s12943-019-1043-x. PMID: 31269959; PMCID: PMC6607541.
189. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011 Mar 25;331(6024):1559-64. doi: 10.1126/science.1203543. PMID: 21436443.

190. Coghlin C, Murray GI. The role of gene regulatory networks in promoting cancer progression and metastasis. *Future Oncol.* 2014 Apr;10(5):735-48. doi: 10.2217/fon.13.264. PMID: 24799055.
191. Yuan K, Xie K, Lan T, Xu L, Chen X, Li X, Liao M, Li J, Huang J, Zeng Y, Wu H. TXNDC12 promotes EMT and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via activation of  $\beta$ -catenin. *Cell Death Differ.* 2020 Apr;27(4):1355-1368. doi: 10.1038/s41418-019-0421-7. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31570854; PMCID: PMC7206186.
192. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104. Erratum in: *J Clin Invest.* 2010 May 3;120(5):1786. PMID: 19487818; PMCID: PMC2689101.
193. Zhang Q, Rong Y, Yi K, Huang L, Chen M, Wang F. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: single-cell based analysis, preclinical models, and clinical applications. *Theranostics.* 2020 Oct 26;10(26):12060-12071. doi: 10.7150/thno.48918. PMID: 33204329; PMCID: PMC7667686.
194. Qi LN, Xiang BD, Wu FX, Ye JZ, Zhong JH, Wang YY, Chen YY, Chen ZS, Ma L, Chen J, Gong WF, Han ZG, Lu Y, Shang JJ, Li LQ. Circulating Tumor Cells Undergoing EMT Provide a Metric for Diagnosis and Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* 2018 Aug 15;78(16):4731-4744. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2459. Epub 2018 Jun 18. PMID: 29915159.
195. Sun YF, Guo W, Xu Y, Shi YH, Gong ZJ, Ji Y, Du M, Zhang X, Hu B, Huang A, Chen GG, Lai PBS, Cao Y, Qiu SJ, Zhou J, Yang XR, Fan J. Circulating Tumor Cells from Different Vascular Sites Exhibit Spatial Heterogeneity in Epithelial and Mesenchymal Composition and Distinct Clinical Significance in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2018 Feb 1;24(3):547-559. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1063. Epub 2017 Oct 25. PMID: 29070526.
196. Blackburn EH. Cancer interception. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011 Jun;4(6):787-92. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0195. PMID: 21636545.
197. Steeg PS. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2016 Apr;16(4):201-18. doi: 10.1038/nrc.2016.25. PMID: 27009393; PMCID: PMC7055530.
198. Tomasik B, Skrzypski M, Bieńkowski M, Dziadziuszko R, Jassem J. Current and future applications of liquid biopsy in non-small-cell lung cancer-a narrative review. *Transl Lung Cancer Res.* 2023 Mar 31;12(3):594-614. doi: 10.21037/tlcr-22-742. Epub 2023 Mar 9. PMID: 37057121; PMCID: PMC10087994.
199. Schwarzenbach H, Müller V, Milde-Langosch K, Steinbach B, Pantel K. Evaluation of cell-free tumour DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease. *Mol Biosyst.* 2011 Oct;7(10):2848-54. doi: 10.1039/c1mb05197k. Epub 2011 Jul 22. PMID: 21785770.
200. Tsai WS, You JF, Hung HY, Hsieh PS, Hsieh B, Lenz HJ, Idos G, Friedland S, Yi-Jiun Pan J, Shao HJ, Wu JC, Lai JM, Chang SE, Mei R, Watson D, Javey M, Nimgaonkar A. Novel Circulating Tumor Cell Assay for Detection of Colorectal Adenomas and Cancer. *Clin Transl Gastroenterol.* 2019 Oct;10(10):e00088. doi: 10.14309/ctg.000000000000088. PMID: 31663904; PMCID: PMC6884354.
201. Li M, Li L, Zheng J, Li Z, Li S, Wang K, Chen X. Liquid biopsy at the frontier in renal cell carcinoma: recent analysis of techniques and clinical application. *Mol Cancer.* 2023 Feb 21;22(1):37. doi: 10.1186/s12943-023-01745-7. PMID: 36810071; PMCID: PMC9942319.

202. Habli Z, AlChamaa W, Saab R, Kadara H, Khraiche ML. Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 17;12(7):1930. doi: 10.3390/cancers12071930. PMID: 32708837; PMCID: PMC7409125.
203. Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*. 2019 May 21;3(6):165-180. doi: 10.15698/cst2019.06.188. PMID: 31225512; PMCID: PMC6558934.
204. Mayo C, Ortega FG, Giménez-Capitán A, Molina-Vila MA, Serrano MJ, Viteri S, Costa C, Gascó A, Bertran-Alamillo J, Karachaliou N, Lorente JA, Tarón M, Rosell R. CK-coated magnetic-based beads as a tool to isolate circulating tumor cells (CTCs) in human tumors. *Transl Lung Cancer Res*. 2013 Apr;2(2):65-71. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2013.02.06. PMID: 25806217; PMCID: PMC4369853.
205. Serrano MJ, Rovira PS, Martínez-Zubiaurre I, Rodríguez MD, Fernández M, Lorente JA. Dynamics of circulating tumor cells in early breast cancer under neoadjuvant therapy. *Exp Ther Med*. 2012 Jul;4(1):43-48. doi: 10.3892/etm.2012.540. Epub 2012 Apr 5. PMID: 23060920; PMCID: PMC3460281.
206. Serrano MJ, Lorente JA, Delgado Rodríguez M, Fernández A, Fernández M, de la Torre C, Fernández Izquierdo J, Sánchez Rovira P. Circulating tumour cells in peripheral blood: potential impact on breast cancer outcome. *Clin Transl Oncol*. 2011 Mar;13(3):204-8. doi: 10.1007/s12094-011-0641-x. PMID: 21421466.
207. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008 Jun;129(6):705-33. doi: 10.1007/s00418-008-0435-6. Epub 2008 May 7. PMID: 18461349; PMCID: PMC2386534.
208. Wang L, Balasubramanian P, Chen AP, Kummar S, Evrard YA, Kinders RJ. Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. *Semin Oncol*. 2016 Aug;43(4):464-75. doi: 10.1053/j.seminoncol.2016.06.004. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27663478; PMCID: PMC5074690.
209. Hong B, Zu Y. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends. *Theranostics*. 2013 Apr 23;3(6):377-94. doi: 10.7150/thno.5195. PMID: 23781285; PMCID: PMC3677409.
210. Harb W, Fan A, Tran T, Danila DC, Keys D, Schwartz M, Ionescu-Zanetti C. Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. *Transl Oncol*. 2013 Oct 1;6(5):528-38. doi: 10.1593/tlo.13367. PMID: 24151533; PMCID: PMC3799195.
211. Chinen LT, de Carvalho FM, Rocha BM, Aguiar CM, Abdallah EA, Campanha D, Minguês NB, de Oliveira TB, Maciel MS, Cervantes GM, Dettino AL, Soares FA, Paterlini-Bréchet P, Fanelli MF. Cytokeratin-based CTC counting unrelated to clinical follow up. *J Thorac Dis*. 2013 Oct;5(5):593-9. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.09.18. PMID: 24255771; PMCID: PMC3815714.
212. Giordano A, Gao H, Anfossi S, Cohen E, Mego M, Lee BN, Tin S, De Laurentiis M, Parker CA, Alvarez RH, Valero V, Ueno NT, De Placido S, Mani SA, Esteva FJ, Cristofanilli M, Reuben JM. Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2012 Nov;11(11):2526-34. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0460. Epub 2012 Sep 12. PMID: 22973057; PMCID: PMC3500676.

213. Jiang M, Jin S, Han J, Li T, Shi J, Zhong Q, Li W, Tang W, Huang Q, Zong H. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer. *Biomark Res.* 2021 Nov 19;9(1):85. doi: 10.1186/s40364-021-00326-4. PMID: 34798902; PMCID: PMC8605607.
214. Ruiz-Rodríguez AJ, Molina-Vallejo MP, Aznar-Peralta I, González Puga C, Cañas García I, González E, Lorente JA, Serrano MJ, Garrido-Navas MC. Deep Phenotypic Characterisation of CTCs by Combination of Microfluidic Isolation (IsoFlux) and Imaging Flow Cytometry (ImageStream). *Cancers (Basel).* 2021 Dec 20;13(24):6386. doi: 10.3390/cancers13246386. PMID: 34945008; PMCID: PMC8699219.
215. Radfar P, Aboulkheyr Es H, Salomon R, Kulasinghe A, Ramalingam N, Sarafraz-Yazdi E, Thiery JP, Warkiani ME. Single-cell analysis of circulating tumour cells: enabling technologies and clinical applications. *Trends Biotechnol.* 2022 Sep;40(9):1041-1060. doi: 10.1016/j.tibtech.2022.02.004. Epub 2022 Mar 17. PMID: 35311650.
216. Pantel K, Denève E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, Riethdorf S, Alix-Panabières C. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem.* 2012 May;58(5):936-40. doi: 10.1373/clinchem.2011.175570. Epub 2011 Dec 28. PMID: 22205690.
217. Chen Z, Lin X, Chen C, Chen Y, Zhao Q, Wu L, Wang D, Ma Y, Ju W, Chen M, He X. Analysis of preoperative circulating tumor cells for recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Ann Transl Med.* 2020 Sep;8(17):1067. doi: 10.21037/atm-20-2751. PMID: 33145286; PMCID: PMC7575976.
218. Vona G, Estepa L, Bérout C, Damotte D, Capron F, Nalpas B, Mineur A, Franco D, Lacour B, Pol S, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. *Hepatology.* 2004 Mar;39(3):792-7. doi: 10.1002/hep.20091. PMID: 14999698.
219. Takahashi K, Ofuji K, Hiramatsu K, Nosaka T, Naito T, Matsuda H, Endo K, Higuchi M, Ohtani M, Nemoto T, Nakamoto Y. Circulating tumor cells detected with a microcavity array predict clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.* 2021 Apr;10(7):2300-2309. doi: 10.1002/cam4.3790. Epub 2021 Mar 6. PMID: 33675149; PMCID: PMC7982624.
220. Kelley RK, Magbanua MJ, Butler TM, Collisson EA, Hwang J, Sidiropoulos N, Evason K, McWhirter RM, Hameed B, Wayne EM, Yao FY, Venook AP, Park JW. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: a pilot study of detection, enumeration, and next-generation sequencing in cases and controls. *BMC Cancer.* 2015 Mar 31;15:206. doi: 10.1186/s12885-015-1195-z. PMID: 25884197; PMCID: PMC4399150.
221. Amado V, González-Rubio S, Zamora J, Alejandro R, Espejo-Cruz ML, Linares C, Sánchez-Frías M, García-Jurado G, Montero JL, Ciria R, Rodríguez-Perálvarez M, Ferrín G, De la Mata M. Clearance of Circulating Tumor Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma Undergoing Surgical Resection or Liver Transplantation. *Cancers (Basel).* 2021 May 19;13(10):2476. doi: 10.3390/cancers13102476. PMID: 34069569; PMCID: PMC8160727.
222. Xue F, Shi S, Zhang Z, Xu C, Zheng J, Qin T, Qian Z, Zhao X, Tong Y, Xia L, Xia Q. Application of a novel liquid biopsy in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation. *Oncol Lett.* 2018 Apr;15(4):5481-5488. doi: 10.3892/ol.2018.8019. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29552189; PMCID: PMC5840532.
223. Liu Y, Wang YR, Wang L, Xun LJ, Ding GH, Yao L. Circulating Hepatocellular Cells are a Bad Prognostic Factor for HCC Patients. *Hepatogastroenterology.* 2015 Jun;62(140):802-6.

224. Fan, J-L., Yang, Y-F., Yuan, C-H., Chen, H., and Wang, F-B. (2015). Circulating tumor cells for predicting the prognostic of patients with hepatocellular carcinoma: A meta analysis. *Cell. Physiol. biochem.* 37, 629–640. doi:10.1159/000430382
225. Sun C, Liao W, Deng Z, Li E, Feng Q, Lei J, Yuan R, Zou S, Mao Y, Shao J, Wu L, Zhang C. The diagnostic value of assays for circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Jul;96(29):e7513. doi: 10.1097/MD.00000000000007513. PMID: 28723763; PMCID: PMC5521903.
226. Cui K, Ou Y, Shen Y, Li S, Sun Z. Clinical value of circulating tumor cells for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC): A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Oct 2;99(40):e22242. doi: 10.1097/MD.00000000000022242. PMID: 33019399; PMCID: PMC7535562.
227. Tsuchiya A, Suda T, Oda C, Kimura A, Hosaka K, Kimura N, Tominaga K, Hayashi K, Takamura M, Terai S. EpCAM- and/or NCAM-Expressing Hepatocellular Carcinoma in Which Behavior of Hepatic Progenitor Cell Marker-Positive Cells Are Followed. *Case Rep Gastroenterol.* 2019 Mar 5;13(1):118-124. doi: 10.1159/000498913. PMID: 31011311; PMCID: PMC6465753.
228. Shimada S, Mogushi K, Akiyama Y, Furuyama T, Watanabe S, Ogura T, Ogawa K, Ono H, Mitsunori Y, Ban D, Kudo A, Arii S, Tanabe M, Wands JR, Tanaka S. Comprehensive molecular and immunological characterization of hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine.* 2019 Feb;40:457-470. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.12.058. Epub 2018 Dec 29. PMID: 30598371; PMCID: PMC6412165.
229. Wang S, Zheng Y, Liu J, Huo F, and Zhou, J. (2018). Analysis of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma recurrence following liver transplantation. *J. Investig. Med.* 66, 1–6. doi:10.1136/jim-2017-000655
230. Court CM, Hou S, Winograd P, Segel NH, Li QW, Zhu Y, Sadeghi S, Finn RS, Ganapathy E, Song M, French SW, Naini BV, Sho S, Kaldas FM, Busuttil RW, Tomlinson JS, Tseng HR, Agopian VG. A novel multimarker assay for the phenotypic profiling of circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2018 Jul;24(7):946-960. doi: 10.1002/lt.25062. PMID: 29624843; PMCID: PMC6097911.
231. Prasoppokakorn T, Buntho A, Ingrungruanglert P, Tiyaratnachai T, Jaihan T, Kulkraisri K, Ariyaskul D, Phathong C, Israsena N, Rerknimitr R, Treeprasertsuk S, Chaiterakij R. Circulating tumor cells as a prognostic biomarker in patients with hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2022 Nov 4;12(1):18686. doi: 10.1038/s41598-022-21888-9. PMID: 36333384; PMCID: PMC9636215.
232. Chan LK, Tsui YM, Ho DW, Ng IO. Cellular heterogeneity and plasticity in liver cancer. *Semin Cancer Biol.* 2022 Jul;82:134-149. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.02.015. Epub 2021 Feb 26. PMID: 33647386.
233. Lu LC, Hsu CH, Hsu C, Cheng AL. Tumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma: Facing the Challenges. *Liver Cancer.* 2016 Apr;5(2):128-38. doi: 10.1159/000367754. Epub 2016 Mar 17. PMID: 27386431; PMCID: PMC4906428.
234. Li J, Chen L, Zhang X, Zhang Y, Liu H, Sun B, Zhao L, Ge N, Qian H, Yang Y, Wu M, Yin Z. Detection of circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma using antibodies against asialoglycoprotein receptor, carbamoyl phosphate synthetase 1 and pan-cytokeratin. *PLoS One.* 2014 Apr 24;9(4):e96185. doi: 10.1371/journal.pone.0096185. PMID: 24763545; PMCID: PMC3999270.



235. Xu W, Cao L, Chen L, Li J, Zhang XF, Qian HH, Kang XY, Zhang Y, Liao J, Shi LH, Yang YF, Wu MC, Yin ZF. 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. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0498. Epub 2011 Apr 28. PMID: 21527564.
236. Kim Y, Jo M, Schmidt J, Luo X, Prakash TP, Zhou T, Klein S, Xiao X, Post N, Yin Z, MacLeod AR. Enhanced Potency of GalNAc-Conjugated Antisense Oligonucleotides in Hepatocellular Cancer Models. *Mol Ther*. 2019 Sep 4;27(9):1547-1557. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.06.009. Epub 2019 Jun 29. PMID: 31303442; PMCID: PMC6731179.
237. Gupta GS. *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*. 1st ed. Springer-Verlag; 2012. doi:10.1007/978-3-7091-1065-2. ISBN 978-3-7091-1064-5.
238. Susan-Resiga D, Girard E, Essalmani R, Roubtsova A, Marcinkiewicz J, Derbali RM, Evagelidis A, Byun JH, Lebeau PF, Austin RC, Seidah NG. Asialoglycoprotein receptor 1 is a novel PCSK9-independent ligand of liver LDLR cleaved by furin. *J Biol Chem*. 2021 Oct;297(4):101177. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101177. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34508778; PMCID: PMC8479480.
239. Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 – [citado 2023/08/10]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/432>
240. Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 – [citado 2023/08/10]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/433>
241. Das S, Kudale P, Dandekar P, Devarajan P.V. Asialoglycoprotein Receptor and Targeting Strategies. In: Devarajan P, Dandekar P, D'Souza A. *Targeted Intracellular Drug Delivery by Receptor Mediated Endocytosis*. AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series, vol 39. Springer; 2019. p. 353–381. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-29168-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-29168-6_12). Online ISBN 978-3-030-29168-6
242. Xie B, Shi X, Li Y, Xia B, Zhou J, Du M, Xing X, Bai L, Liu E, Alvarez F, Jin L, Deng S, Mitchell GA, Pan D, Li M, Wu J. Deficiency of ASGR1 in pigs recapitulates reduced risk factor for cardiovascular disease in humans. *PLoS Genet*. 2021 Nov 11;17(11):e1009891. doi: 10.1371/journal.pgen.1009891. PMID: 34762653; PMCID: PMC8584755.
243. Wang JQ, Li LL, Hu A, Deng G, Wei J, Li YF, Liu YB, Lu XY, Qiu ZP, Shi XJ, Zhao X, Luo J, Song BL. Inhibition of ASGR1 decreases lipid levels by promoting cholesterol excretion. *Nature*. 2022 Aug;608(7922):413-420. doi: 10.1038/s41586-022-05006-3. Epub 2022 Aug 3. PMID: 35922515.
244. Gu Y, Cao J, Zhang X, Gao H, Wang Y, Wang J, He J, Jiang X, Zhang J, Shen G, Yang J, Zheng X, Hu G, Zhu Y, Du S, Zhu Y, Zhang R, Xu J, Lan F, Qu D, Xu G, Zhao Y, Gao D, Xie Y, Luo M, Lu Z. Receptome profiling identifies KREMEN1 and ASGR1 as alternative functional receptors of SARS-CoV-2. *Cell Res*. 2022 Jan;32(1):24-37. doi: 10.1038/s41422-021-00595-6. Epub 2021 Nov 26. Erratum in: *Cell Res*. 2022 Jun;32(6):600. PMID: 34837059; PMCID: PMC8617373.
245. Hoffmann M, Pöhlmann S. Novel SARS-CoV-2 receptors: ASGR1 and KREMEN1. *Cell Res*. 2022 Jan;32(1):1-2. doi: 10.1038/s41422-021-00603-9. PMID: 34903854; PMCID: PMC8666617.
246. Monestier M, Charbonnier P, Gateau C, Cuillel M, Robert F, Lebrun C, Mintz E, Renaudet O, Delangle P. ASGPR-Mediated Uptake of Multivalent Glycoconjugates for Drug

- Delivery in Hepatocytes. *Chembiochem*. 2016 Apr 1;17(7):590-4. doi: 10.1002/cbic.201600023. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26781030.
247. Zhang Z, Broderick C, Nishimoto M, Yamaguchi T, Lee SJ, Zhang H, Chen H, Patel M, Ye J, Ponce A, Brady J, Baribault H, Li Y, Yeh WC. Tissue-targeted R-spondin mimetics for liver regeneration. *Sci Rep*. 2020 Aug 18;10(1):13951. doi: 10.1038/s41598-020-70912-3. PMID: 32811902; PMCID: PMC7435267.
248. Gu D, Jin H, Jin G, Wang C, Wang N, Hu F, Luo Q, Chu W, Yao M, Qin W. The asialoglycoprotein receptor suppresses the metastasis of hepatocellular carcinoma via LASS2-mediated inhibition of V-ATPase activity. *Cancer Lett*. 2016 Aug 28;379(1):107-16. doi: 10.1016/j.canlet.2016.05.030. Epub 2016 May 27. PMID: 27241665.
249. Zhu X, Song G, Zhang S, Chen J, Hu X, Zhu H, Jia X, Li Z, Song W, Chen J, Jin C, Zhou M, Zhao Y, Xie H, Zheng S, Song P. Asialoglycoprotein Receptor 1 Functions as a Tumor Suppressor in Liver Cancer via Inhibition of STAT3. *Cancer Res*. 2022 Nov 2;82(21):3987-4000. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-4337. PMID: 36043912.
250. Witzigmann D, Quagliata L, Schenk SH, Quintavalle C, Terracciano LM, Huwyler J. Variable asialoglycoprotein receptor 1 expression in liver disease: Implications for therapeutic intervention. *Hepatol Res*. 2016 Jun;46(7):686-96. doi: 10.1111/hepr.12599. Epub 2015 Oct 29. PMID: 26422581.
251. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5. PMID: 14744438.
252. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):350-5. doi: 10.1038/nature02871. PMID: 15372042.
253. Hua HW, Jiang F, Huang Q, Liao Z, Ding G. MicroRNA-153 promotes Wnt/ $\beta$ -catenin activation in hepatocellular carcinoma through suppression of WWOX. *Oncotarget*. 2015 Feb 28;6(6):3840-7. doi: 10.18632/oncotarget.2927. PMID: 25708809; PMCID: PMC4414157.
254. Wu LM, Ji JS, Yang Z, Xing CY, Pan TT, Xie HY, Zhang F, Zhuang L, Zhou L, Zheng SS. Oncogenic role of microRNA-423-5p in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2015 Dec;14(6):613-8. doi: 10.1016/s1499-3872(15)60038-8. PMID: 26663009.
255. Wen DY, Huang JC, Wang JY, Pan WY, Zeng JH, Pang YY, Yang H. Potential clinical value and putative biological function of miR-122-5p in hepatocellular carcinoma: A comprehensive study using microarray and RNA sequencing data. *Oncol Lett*. 2018 Dec;16(6):6918-6929. doi: 10.3892/ol.2018.9523. Epub 2018 Sep 28. PMID: 30546424; PMCID: PMC6256359.
256. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci*. 2012 Nov;37(11):460-5. doi: 10.1016/j.tibs.2012.08.003. Epub 2012 Sep 1. PMID: 22944280.
257. Ji C, Guo X. The clinical potential of circulating microRNAs in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2019 Dec;15(12):731-743. doi: 10.1038/s41574-019-0260-0. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31611648.
258. Machado MT, Navega S, Dias F, de Sousa MJ, Teixeira AL, Medeiros R. microRNAs for peripheral blood fraction identification: Origin, pathways and forensic relevance. *Life Sci*. 2015 Dec 15;143:98-104. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.029. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26522049.
259. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a

- novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008 Oct;18(10):997-1006. doi: 10.1038/cr.2008.282. PMID: 18766170.
260. Fang Y, Yan D, Wang L, Zhang J, He Q. Circulating microRNAs (miR-16, miR-22, miR-122) expression and early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *J Clin Lab Anal.* 2022 Jul;36(7):e24541. doi: 10.1002/jcla.24541. Epub 2022 Jun 6. PMID: 35666610; PMCID: PMC9279946.
261. Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell.* 2012 May;3(5):364-71. doi: 10.1007/s13238-012-2036-3. Epub 2012 May 18. PMID: 22610888; PMCID: PMC4875471.
262. Jin Y, Wang J, Han J, Luo D, Sun Z. MiR-122 inhibits epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by targeting Snail1 and Snail2 and suppressing WNT/ $\beta$ -cadherin signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2017 Nov 15;360(2):210-217. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.09.010. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28890291.
263. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6092-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4607. PMID: 17616664.
264. Jin Y, Wong YS, Goh BKP, Chan CY, Cheow PC, Chow PKH, Lim TKH, Goh GBB, Krishnamoorthy TL, Kumar R, Ng TP, Chong SS, Tan HH, Chung AYF, Ooi LLPJ, Chang JPE, Tan CK, Lee CGL. Circulating microRNAs as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep.* 2019 Jul 18;9(1):10464. doi: 10.1038/s41598-019-46872-8. PMID: 31320713; PMCID: PMC6639394.
265. Wang X, Zhang P, Deng K. MYC Promotes LDHA Expression through MicroRNA-122-5p to Potentiate Glycolysis in Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2022 Aug 18;2022:1435173. doi: 10.1155/2022/1435173. PMID: 36033372; PMCID: PMC9410951.
266. Nadal R, Ortega FG, Salido M, Lorente JA, Rodríguez-Rivera M, Delgado-Rodríguez M, Macià M, Fernández A, Corominas JM, García-Puche JL, Sánchez-Rovira P, Solé F, Serrano MJ. CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: potential role in resistance to chemotherapy. *Int J Cancer.* 2013 Nov 15;133(10):2398-407. doi: 10.1002/ijc.28263. Epub 2013 Jul 6. PMID: 23661576.
267. Ortega FG, Lorente JA, Garcia Puche JL, Ruiz MP, Sanchez-Martin RM, de Miguel-Pérez D, Diaz-Mochon JJ, Serrano MJ. miRNA in situ hybridization in circulating tumor cells--MishCTC. *Sci Rep.* 2015 Mar 17;5:9207. doi: 10.1038/srep09207. PMID: 25777797; PMCID: PMC4361864.
268. Chen C, Li K, Jiang H, Song F, Gao H, Pan X, Shi B, Bi Y, Wang H, Wang H, Li Z. Development of T cells carrying two complementary chimeric antigen receptors against glypican-3 and asialoglycoprotein receptor 1 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2017 Apr;66(4):475-489. doi: 10.1007/s00262-016-1949-8. Epub 2016 Dec 29. PMID: 28035433.
269. Nair AB, Shah J, Al-Dhubiab BE, Patel SS, Morsy MA, Patel V, Chavda V, Jacob S, Sreeharsha N, Shinu P, Attimarad M, Venugopala KN. Development of Asialoglycoprotein Receptor-Targeted Nanoparticles for Selective Delivery of Gemcitabine to Hepatocellular Carcinoma. *Molecules.* 2019 Dec 13;24(24):4566. doi: 10.3390/molecules24244566. PMID: 31847085; PMCID: PMC6943439.

270. Saunier B, Triyatni M, Ulianich L, Maruvada P, Yen P, Kohn LD. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol.* 2003 Jan;77(1):546-59. doi: 10.1128/jvi.77.1.546-559.2003. PMID: 12477859; PMCID: PMC140572.
271. Ueno S, Mojic M, Ohashi Y, Higashi N, Hayakawa Y, Irimura T. Asialoglycoprotein receptor promotes cancer metastasis by activating the EGFR-ERK pathway. *Cancer Res.* 2011 Oct 15;71(20):6419-27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1773. Epub 2011 Aug 25. PMID: 21868757.
272. Ise H, Nikaido T, Negishi N, Sugihara N, Suzuki F, Akaike T, Ikeda U. Effective hepatocyte transplantation using rat hepatocytes with low asialoglycoprotein receptor expression. *Am J Pathol.* 2004 Aug;165(2):501-10. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63315-9. PMID: 15277224; PMCID: PMC1618566.
273. Shi B, Abrams M, Sepp-Lorenzino L. Expression of asialoglycoprotein receptor 1 in human hepatocellular carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2013 Dec;61(12):901-9. doi: 10.1369/0022155413503662. Epub 2013 Aug 26. PMID: 23979840; PMCID: PMC3840742.
274. Fang J, Izawa R, Gomez-Santos L, Ueno S, Sawaguchi T, Usami K, Nodera Y, Takeuchi H, Ohashi Y, Higashi N, Irimura T. Potentiation of proliferation of some but not all human colon carcinoma cell lines by immobilized hepatic asialoglycoprotein receptor 1. *Oncol Res.* 2009;17(10):437-45. doi: 10.3727/096504009789735440. PMID: 19725223.
275. Harris RL, van den Berg CW, Bowen DJ. ASGR1 and ASGR2, the Genes that Encode the Asialoglycoprotein Receptor (Ashwell Receptor), Are Expressed in Peripheral Blood Monocytes and Show Interindividual Differences in Transcript Profile. *Mol Biol Int.* 2012;2012:283974. doi: 10.1155/2012/283974. Epub 2012 Aug 2. PMID: 22919488; PMCID: PMC3419429.
276. Sørensen AL, Rumjantseva V, Nayeb-Hashemi S, Clausen H, Hartwig JH, Wandall HH, Hoffmeister KM. Role of sialic acid for platelet life span: exposure of beta-galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood.* 2009 Aug 20;114(8):1645-54. doi: 10.1182/blood-2009-01-199414. Epub 2009 Jun 11. PMID: 19520807; PMCID: PMC2731641.
277. Wang W, Wei C. Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Genes Dis.* 2020 Jan 27;7(3):308-319. doi: 10.1016/j.gendis.2020.01.014. PMID: 32884985; PMCID: PMC7452544.
278. Bhan I, Haber DA, Chung RT, Ting DT. Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma. 2019 Aug 6. In: Hoshida Y, editor. *Hepatocellular Carcinoma: Translational Precision Medicine Approaches* [Internet]. Cham (CH): Humana Press; 2019. Chapter 7. PMID: 32078276.
279. Ahn JC, Teng PC, Chen PJ, Posadas E, Tseng HR, Lu SC, Yang JD. Detection of Circulating Tumor Cells and Their Implications as a Biomarker for Diagnosis, Prognostication, and Therapeutic Monitoring in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* 2021 Jan;73(1):422-436. doi: 10.1002/hep.31165. Epub 2021 Jan 18. PMID: 32017145; PMCID: PMC8183673.
280. Pelizzaro F, Cardin R, Penzo B, Pinto E, Vitale A, Cillo U, Russo FP, Farinati F. Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma: Where Are We Now? *Cancers (Basel).* 2021 May 10;13(9):2274. doi: 10.3390/cancers13092274. PMID: 34068786; PMCID: PMC8126224.
281. Barrera-Saldaña HA, Fernández-Garza LE, Barrera-Barrera SA. Liquid biopsy in chronic liver disease. *Ann Hepatol.* 2021 Jan-Feb;20:100197. doi: 10.1016/j.aohep.2020.03.008. Epub 2020 May 6. PMID: 32444248.

282. Di Tommaso L, Spadaccini M, Donadon M, Personeni N, Elamin A, Aghemo A, Lleo A. Role of liver biopsy in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2019 Oct 28;25(40):6041-6052. doi: 10.3748/wjg.v25.i40.6041. PMID: 31686761; PMCID: PMC6824282.
283. López Panqueva RDP. Neoplasias hepáticas malignas: Hepatocarcinoma: papel de la biopsia hepática, estudios de inmunohistoquímica y otros aspectos importantes. *Rev Col Gastroenterol*. 2015 Jun;30(2):232-242.
284. Rodríguez-Perálvarez M, Gómez-Bravo MÁ, Sánchez-Antolín G, De la Rosa G, Bilbao I, Colmenero J; on behalf of the Spanish Society of Liver Transplantation (SETH) Consensus Panel. Expanding Indications of Liver Transplantation in Spain: Consensus Statement and Recommendations by the Spanish Society of Liver Transplantation. *Transplantation*. 2021 Mar 1;105(3):602-607. doi: 10.1097/TP.0000000000003281. PMID: 32345868.
285. Sapisochin G, Hibi T, Ghobrial M, Man K. The ILTS Consensus Conference on Transplant Oncology: Setting the Stage. *Transplantation*. 2020 Jun;104(6):1119-1120. doi: 10.1097/TP.0000000000003175. PMID: 32217941.
286. Silva MF, Sherman M. Criteria for liver transplantation for HCC: what should the limits be? *J Hepatol*. 2011 Nov;55(5):1137-47. doi: 10.1016/j.jhep.2011.05.012. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21718672.
287. Amado V, Rodríguez-Perálvarez M, Ferrín G, De la Mata M. Selecting patients with hepatocellular carcinoma for liver transplantation: incorporating tumor biology criteria. *J Hepatocell Carcinoma*. 2018 Dec 21;6:1-10. doi: 10.2147/JHC.S174549. PMID: 30613572; PMCID: PMC6306074.
288. Rodríguez-Perálvarez M, Luong TV, Andreana L, Meyer T, Dhillon AP, Burroughs AK. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol*. 2013 Jan;20(1):325-39. doi: 10.1245/s10434-012-2513-1. Epub 2012 Nov 13. PMID: 23149850.
289. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Roayaie S, Schwartz ME, Grazi GL, Adam R, Neuhaus P, Salizzoni M, Bruix J, Forner A, De Carlis L, Cillo U, Burroughs AK, Troisi R, Rossi M, Gerunda GE, Lerut J, Belghiti J, Boin I, Gugenheim J, Rochling F, Van Hoek B, Majno P; Metroticket Investigator Study Group. 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. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70284-5. Epub 2008 Dec 4. PMID: 19058754.
290. Duvoux C, Roudot-Thoraval F, Decaens T, Pessione F, Badran H, Piardi T, Francoz C, Compagnon P, Vanlemmens C, Dumortier J, Dharancy S, Gugenheim J, Bernard PH, Adam R, Radenne S, Muscari F, Conti F, Hardwigsen J, Pageaux GP, Chazouillères O, Salame E, Hilleret MN, Lebray P, Abergel A, Debette-Gratien M, Kluger MD, Mallat A, Azoulay D, Cherqui D; Liver Transplantation French Study Group. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a model including  $\alpha$ -fetoprotein improves the performance of Milan criteria. *Gastroenterology*. 2012 Oct;143(4):986-94.e3; quiz e14-5. doi: 10.1053/j.gastro.2012.05.052. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22750200.
291. Notarpaolo A, Layese R, Magistri P, Gambato M, Colledan M, Magini G, Miglioresi L, Vitale A, Vennarecci G, Ambrosio CD, Burra P, Di Benedetto F, Fagioli S, Colasanti M, Maria Ettore G, Andreoli A, Cillo U, Laurent A, Katsahian S, Audureau E, Roudot-Thoraval F, Duvoux C. Validation of the AFP model as a predictor of HCC recurrence in patients with viral

- hepatitis-related cirrhosis who had received a liver transplant for HCC. *J Hepatol*. 2017 Mar;66(3):552-559. doi: 10.1016/j.jhep.2016.10.038. Epub 2016 Nov 27. PMID: 27899297.
292. Pardo F, Pons JA, Castells L, Colmenero J, Gómez MÁ, Lladó L, Pérez B, Prieto M, Briceño J. VI consensus document by the Spanish Liver Transplantation Society. *Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jun-Jul;41(6):406-421. English, Spanish. doi: 10.1016/j.gastrohep.2018.05.012. Epub 2018 Jun 1. PMID: 29866511.
293. Roayaie S, Obeidat K, Sposito C, Mariani L, Bhoori S, Pellegrinelli A, Labow D, Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection of hepatocellular cancer  $\leq 2$  cm: results from two Western centers. *Hepatology*. 2013 Apr;57(4):1426-35. doi: 10.1002/hep.25832. Epub 2013 Jan 25. PMID: 22576353; PMCID: PMC3442120.
294. Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, Sugawara Y, Minagawa M, Takayama T, Kawasaki S, Makuuchi M. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol*. 2003 Feb;38(2):200-7. doi: 10.1016/s0168-8278(02)00360-4. PMID: 12547409.
295. Ferrer-Fàbrega J, Forner A, Llicioni A, Miquel R, Molina V, Navasa M, Fondevila C, García-Valdecasas JC, Bruix J, Fuster J. Prospective validation of ab initio liver transplantation in hepatocellular carcinoma upon detection of risk factors for recurrence after resection. *Hepatology*. 2016 Mar;63(3):839-49. doi: 10.1002/hep.28339. Epub 2016 Jan 13. PMID: 26567038.
296. Sun YF, Guo W, Xu Y, Shi YH, Gong ZJ, Ji Y, Du M, Zhang X, Hu B, Huang A, Chen GG, Lai PBS, Cao Y, Qiu SJ, Zhou J, Yang XR, Fan J. Circulating Tumor Cells from Different Vascular Sites Exhibit Spatial Heterogeneity in Epithelial and Mesenchymal Composition and Distinct Clinical Significance in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2018 Feb 1;24(3):547-559. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1063. Epub 2017 Oct 25. PMID: 29070526.
297. Lin D, Luo R, Ye Z, Wei Q, Bae H, Juon HS, Hann HW, Posey J, Wang C. Genomic characterization of early-stage hepatocellular carcinoma patients with Hepatitis B using circulating tumor DNA. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2023 Aug;47(7):102161. doi: 10.1016/j.clinre.2023.102161. Epub 2023 Jun 10. PMID: 37307947.

## 12. DERECHOS Y PERMISOS

**Permiso de la revista *Frontiers in Molecular Biosciences* para la utilización de las figuras y el contenido del artículo:**

Roa-Colomo A, López Garrido MÁ, Molina-Vallejo P, Rojas A, Sanchez MG, Aranda-García V, Salmeron J, Romero-Gomez M, Muntane J, Padillo J, Alamo JM, Lorente JA, Serrano MJ, Garrido-Navas MC. Hepatocellular carcinoma risk-stratification based on ASGR1 in circulating epithelial cells for cancer interception. *Front Mol Biosci.* 2022 Nov 28;9:1074277. doi: 10.3389/fmolb.2022.1074277. PMID: 36518850; PMCID: PMC9742249.

### **Copyright statement:**

Under the Frontiers Conditions for Website Use and the Frontiers General Conditions for Authors, authors of articles published in Frontiers journals retain copyright on their articles, except for any third-party images and other materials added by Frontiers, which are subject to copyright of their respective owners. Authors are therefore free to disseminate and re-publish their articles, subject to any requirements of third-party copyright owners and subject to the original publication being fully cited. The ability to copy, download, forward or otherwise distribute any materials is always subject to any copyright notices displayed. Copyright notices must be displayed prominently and may not be obliterated, deleted or hidden, totally or partially.