

TRABAJO FIN DE GRADO DE MEDICINA



MARCADORES TISULARES RELACIONADOS CON EL PROCESO DE CARCINOGENESIS Y PROLIFERACIÓN CELULAR Y SU IMPLICACIÓN EN LA EVOLUCIÓN DEL HEPATOCARCINOMA TRAS EL TRASPLANTE HEPÁTICO.

TISSUE MARKERS RELATED TO THE PROCESS OF
CARCINOGENESIS AND CELLULAR PROLIFERATION AND ITS
INVOLVEMENT IN THE EVOLUTION OF HEPATOCELLULAR
CARCINOMA AFTER HEPATIC TRANSPLANTATION.

Autora: Lorena Gómez Latorre
Directora: Dra. M^º José Morandeira García
Codirectores: Dr. Ariel Gonzales Sejas y
Dra. M^ª Teresa Ramírez Gasca
Curso 2016-2017



Universidad
Zaragoza

ÍNDICE

Resumen.	2
Abstract.	3
1. Introducción.	4
1.1. Epidemiología.	4
1.2. Factores de riesgo.	4
1.3. Manifestaciones clínicas.	6
1.4. Diagnóstico.	6
1.5. Pronóstico y tratamiento.	7
1.6. Trasplante hepático.	9
1.7. Morfología.	9
1.8. Marcadores inmunohistoquímicos relacionados con la progresión y el pronóstico del hepatocarcinoma.	11
1.8.1. Ciclooxigenasa 2.	11
1.8.2. Ki67.	12
2. Hipótesis y objetivos.	12
2.1. Hipótesis.	12
2.2. Objetivos.	13
3. Material y métodos.	13
3.1. Material.	13
3.2. Métodos.	13
3.2.1. Valoración de la inmunohistoquímica.	15
3.2.2. Análisis estadístico.	16
4. Resultados.	17
4.1. Resultados descriptivos de la primera muestra.	17
4.2. Resultados descriptivos de la segunda muestra.	23
4.3. Resultados de los marcadores inmunohistoquímicos.	25
4.3.1. Valoración de COX2.	25
4.3.2. Valoración de Ki67.	27
5. Discusión.	29
6. Conclusiones.	33
7. Bibliografía.	34

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El hepatocarcinoma es la neoplasia primaria de hígado más frecuente (1). Por ello, actualmente hay un gran interés en conocer la implicación de diferentes marcadores biológicos que podrían estar implicados en el pronóstico y la recidiva tumoral (2).

Uno de estos marcadores, relacionado con la inflamación y la carcinogénesis, es la COX2. El interés en su estudio, ha derivado de su implicación en la progresión del cáncer de colon, esófago y estómago, pero no se conoce con exactitud cuál es su papel pronóstico en el hepatocarcinoma (27, 28, 29).

Otro marcador interesante relacionado con la proliferación celular es el Ki67. Su elevada expresión se ha asociado con un mal pronóstico del tumor (36, 37).

El estudio de COX2 y Ki67 podría identificar a un subgrupo de pacientes de riesgo y realizar un tratamiento más específico en el futuro (2).

HIPÓTESIS: ¿Podrían existir marcadores relacionados con la inflamación (COX2) y la proliferación celular (ki67) del hepatocarcinoma implicados en la agresividad del tumor y en su probabilidad de recurrencia tras el trasplante?

PALABRAS CLAVE: Hepatocarcinoma, COX2, Ki67, recidiva, pronóstico, trasplante.

CONCLUSIONES:

1. Los marcadores estudiados (COX2 y Ki67) tienen, por lo general, una mayor expresión en el tejido tumoral que en el peritumoral.
2. El marcador de proliferación celular, Ki67, presentó de forma general una tinción débil en el tumor, por lo que podemos afirmar que, en nuestro trabajo, el hepatocarcinoma ha presentado un bajo índice de proliferación celular.
3. Con los resultados obtenidos en nuestro estudio, no podemos afirmar que exista asociación entre la expresión de COX2 y Ki67 y la recidiva del hepatocarcinoma tras el trasplante hepático.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Hepatocellular carcinoma is the most common primary malignancy in the liver (1). Therefore, there is currently a great interest in knowing the implication of different biological markers that could be involved in prognosis and tumor recurrence (2).

One of these markers, related to inflammation and carcinogenesis, is COX2. Interest in their study has derived from their involvement in the progression of colon, oesophageal and stomach cancer, but it is not known exactly what its prognostic role in hepatocellular carcinoma (27, 28, 29).

Another interesting marker related to cell proliferation is Ki67. Its high expression has been associated with a poor prognosis of the tumor (36, 37).

The COX2 and Ki67 study could identify a subset of patients at risk and perform a more specific treatment in the future (2).

HYPOTHESIS: Could there be markers related to inflammation (COX2) and cell proliferation (ki67) of hepatocellular carcinoma involved in the aggressiveness of the tumor and its probability of recurrence after transplantation?

KEYWORDS: Hepatocellular carcinoma, COX2, Ki67, recurrence, prognosis, transplantation.

CONCLUSIONS:

1. The markers studied (COX2 and Ki67) generally have a greater expression in tumor tissue than in peritumoral tissue.
2. The cell proliferation marker, Ki67, generally had a weak staining in the tumor, so we can state that, in our study, hepatocellular carcinoma has presented a low rate of cell proliferation.
3. With the results obtained in our study, we can not affirm that there is an association between the expression of COX2 and Ki67 and the recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (HCC) es la neoplasia primaria de hígado más frecuente del adulto. En las últimas décadas, ha presentado un aumento progresivo de su incidencia en el mundo occidental, siendo la sexta neoplasia más frecuente y ocupando el tercer lugar entre las causas de mortalidad relacionadas con el cáncer, así como la principal causa de muerte en pacientes cirróticos (1).

La incidencia varía de unas regiones a otras, diferenciándose tres categorías: alta, intermedia y baja. Las zonas de alta incidencia, de 13,5 a 35,5 casos por 100.000 habitantes, corresponden al sudeste de Asia, China y África subsahariana. España y el sur de Europa representan zonas de incidencia intermedia (5-9,8 casos nuevos por 100.000 habitantes). Por último, las zonas de baja incidencia son Norteamérica, Oceanía y el norte de Europa, con 2,2-4,8 casos por 100.000 habitantes (2). Estas variaciones geográficas van en paralelo a factores raciales o genéticos y a factores ambientales.

En nuestro medio se prevé un aumento de incidencia en los próximos años debido al incremento de infectados por virus de la hepatitis C (VHC) durante 1940-1960 y por el aumento de la inmigración. Sin embargo, también se prevé una disminución de HCC secundario a infección crónica por virus de la hepatitis B (VHB), gracias a la vacunación.

La edad de presentación más frecuente es entre la sexta y la séptima décadas de la vida, salvo en las zonas de alta incidencia donde la edad de presentación es más temprana, en la tercera y la cuarta décadas de la vida. Es más frecuente en varones con una proporción de entre 2:1 y 6:1, dependiendo del área geográfica (3).

1.2. FACTORES DE RIESGO

El desarrollo del HCC está vinculado en el 80% de los casos a la existencia de cirrosis hepática de cualquier etiología (2). Los factores de riesgo más conocidos son:

- La infección crónica por VHB. Este hecho explica la alta incidencia de HCC en zonas endémicas en virus B, como Asia oriental y África subsahariana. Parece ser que el VHB actúa como un agente carcinógeno tanto indirecta como directamente. Cuando la infección se cronifica, se producen fenómenos de inflamación crónica, necrosis y regeneración, que pueden ocasionar una cirrosis, sobre la cual, se desarrollaría el tumor (vía indirecta). Con respecto a la vía directa de la

carcinogénesis, al ser un virus DNA, el VHB puede integrarse en el genoma del huésped y provocar alteraciones genéticas que finalmente podrían conducir al desarrollo de un hepatocarcinoma en ausencia de cirrosis (4). Entre el 10 y 30% de los HCC relacionados con VHB se desarrollan sobre hígado no cirrótico (5).

- La infección crónica por VHC: es la causa más frecuente en Estados Unidos, Europa y el área mediterránea. En España, entre un 60-75% de los HCC se asocian a infección por VHC (2). A diferencia del VHB, el VHC no se integra en el genoma de la célula huésped, por lo que el mecanismo carcinogénico es indirecto, a través de procesos inflamatorios, de muerte celular, fibrosis y cirrosis (6). La progresión a cirrosis se ve potenciada por otros factores, como la edad, sexo masculino, obesidad, diabetes, coinfección por VIH y VHB, tabaco, alcohol, etc (2).
- Aflatoxina B: es una microtoxina producida en pequeñas concentraciones por hongos del género *Aspergillus*. Esta toxina contamina los cereales almacenados en condiciones de humedad en regiones de África y Asia. La aflatoxina puede causar mutaciones en los protooncogenes o en los genes supresores de tumores, en especial el p53 (7). Parece que existe un efecto sinérgico entre la aflatoxina y coexistencia con infección del VHB, aumentando 60 veces el riesgo de desarrollar HCC (2).
- Enolismo: la ingesta alcohólica elevada (definida como 50-70 grs al día) está relacionada con el riesgo de desarrollar cirrosis y, por tanto, hepatocarcinoma. La coexistencia de infección crónica por VHC o VHB y la ingesta de alcohol potencia el riesgo de desarrollar HCC (8).
- Cirrosis hepática de otro origen: los pacientes afectados de hepatopatía crónica o cirrosis hepática de cualquier etiología (hemocromatosis, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Willson, etc), tienen un riesgo más elevado de padecer HCC (2).
- La esteatohepatitis no alcohólica, la obesidad y la diabetes mellitus: varios estudios epidemiológicos establecen la relación entre diabetes mellitus, esteatohepatitis no alcohólica e incremento del riesgo de HCC, debido a que se produce una mayor actividad necroinflamatoria y fibrosis (9).

1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Habitualmente el HCC es asintomático. El desarrollo de síntomas no suele producirse hasta que el tumor alcanza tamaños entre 4,5 y 8 cm. La mayoría de HCC se desarrollan sobre un hígado cirrótico, por ello el paciente suele padecer los síntomas propios de la cirrosis (dolor mal definido en abdomen superior, malestar, fatiga, pérdida de peso o sensación de plenitud abdominal), siendo frecuente la palpación de hepatomegalia. La descompensación de un cirrótico debe hacer pensar en la aparición de un HCC entre otras causas (5).

Han sido descritas en la literatura otras presentaciones más raras, como la ictericia obstructiva cuando la tumoración comprime la vía biliar, hemobilia si la tumoración se rompe hacia el conducto biliar, hemoperitoneo si se rompe hacia el peritoneo, dolor óseo o disnea si la presentación es metastásica y fiebre si el HCC es grande y presenta necrosis central tumoral (7).

Estos pacientes pueden desarrollar síndromes paraneoplásicos, asociados a mal pronóstico. Entre los más comunes se encuentran la aparición de hipoglucemia debida a aumento de metabolismo, hipercalcemia por secreción de proteínas relacionadas con la hormona paratiroidea o metástasis óseas, eritrocitosis por secreción de eritropoyetina o diarrea acuosa severa que se relaciona con la secreción de péptidos (10).

1.4. DIAGNÓSTICO

En la actualidad, las guías clínicas de la American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) recomiendan la realización de screening de hepatocarcinoma en determinados grupos de riesgo a través de ecografías en intervalos de 6 meses. La ecografía posee una sensibilidad del 94% para la detección de HCC, aunque disminuye a sólo 63% para el diagnóstico de lesiones precoces. A esto puede añadirse la determinación de niveles de alfa fetoproteína (AFP) en sangre. Se aconseja screening de HCC en:

- Varones asiáticos ≥ 40 años y mujeres asiáticas ≥ 50 años portadores del VHB.
- Pacientes cirróticos con VHB.
- Historia familiar de HCC.
- Pacientes cirróticos por alcohol, VHC, hemocromatosis, cirrosis biliar primaria o cualquier hepatopatía inflamatoria como deficiencia de alfa-1-antitripsina, esteatohepatitis no alcohólica y hepatitis autoinmune.

- Pacientes en lista de espera para trasplante hepático.

El seguimiento mediante ecografía y detección de alfa-fetoproteína debe hacerse de la siguiente manera:

- Los nódulos < 1 cm deben ser seguidos con ecografía cada 3 meses. Si no hay crecimiento en dos años, se debe volver al seguimiento habitual (cada 6 meses).
- Los nódulos entre 1 y 2 cm por ecografía, deben ser estudiados con otras dos pruebas: TC, RM o ecografía con contraste. Si las pruebas sugieren HCC (hipervascular en fase arterial y lavado en las fases portal y venosa) en dos pruebas, el nódulo debe ser considerado HCC. Si las pruebas no son concluyentes deben ser biopsiados.
- Los nódulos > 2 cm con estudio ecográfico sugestivo de HCC y una alfa-fetoproteína > 200 ng/ml no necesitan ser biopsiados (se considera ya diagnóstico de HCC). En caso contrario o en nódulos que aparecen sobre hígado sano, sí se requiere biopsia (11). (Anexo 1: tabla 1).

1.5. PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO

El hepatocarcinoma suele aparecer en el contexto de una enfermedad hepática evolucionada. Las opciones de tratamiento y por lo tanto su pronóstico, estarán condicionados no sólo por la extensión del tumor, sino también por la funcionalidad del hígado sobre el que se desarrolla, evaluada por la escala de Child-Pugh entre otras.

Tabla 1. Escala de Child Pugh

Parámetro	Puntos asignados		
	1	2	3
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada
Bilirrubina	< 2 mg/dL	2-3 mg/dL	>3 mg/dL
Albumina	>3.5 g/dL	2.8 - 3.5 g/dL	< 2.8 g/dL
Tiempo de potrombina			
INR	<1.7	1.7 - 2.3	>2.3
Segundos por encima del control	<4	4 - 6	>6
Encefalopatía	No	Grado 1 - 2	Grado 3 - 4

Se han desarrollado múltiples herramientas para establecer el pronóstico del hepatocarcinoma. Desde un punto de vista práctico, las dos más utilizadas son el TNM (sistema de estadificación por tumor, ganglios y metástasis.) y el propuesto por el

BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) (5). De forma global la mediana de supervivencia de los pacientes en el momento del diagnóstico suele ser de 6 a 20 meses (12) (Anexo 1: tabla 2 y 3).

El TNM no tiene en cuenta la función hepática o la presencia de síntomas, que son las que determinarán la posibilidad de tratamiento y con ello el pronóstico en los pacientes cirróticos (5).

El sistema BCLC aporta una visión más global, incluye variables asociadas al estadio tumoral, la reserva funcional hepática y la presencia de síntomas, y establece el pronóstico de acuerdo con 5 estadios que se vinculan a la posible indicación de tratamiento (13, 5):

- Estadio 0 (muy inicial): Incluye a pacientes con buena función hepática (Child-Pugh A), ausencia de síntomas, y con un único tumor en un estadio muy inicial o carcinoma in situ. En este grupo, mediante tratamiento con hepatectomía o ablación (ya sea por radiofrecuencia o alcoholización) la supervivencia esperada a los 5 años es de entorno al 80% (2).
- Estadio A (estadio inicial): tumor único < 5 cm o un máximo de tres nódulos < 3 cm, en pacientes con buena función hepática y ausencia de síntomas (Child A-B). Son candidatos a tratamientos con intención curativa: resección quirúrgica, trasplante hepático y ablación percutánea, pudiendo presentar una supervivencia a los 5 años del 50-70%.
- Estadio B (estadio intermedio): tumores que exceden los límites del estadio A, sin afectación vascular ni invasión extrahepática, con buena función hepática y estado general conservado. El único tratamiento que ha mostrado aumento de la supervivencia es la quimioembolización transarterial, obteniendo una supervivencia aproximada de 20 meses.
- Estadio C (estadio avanzado): tumores con invasión vascular y/o extrahepática en pacientes con buena función hepática y afectación leve del estado general. En estos casos, el único tratamiento que hasta la fecha ha demostrado alargar la supervivencia es el sorafenib. En estos pacientes la supervivencia estimada es de unos 11 meses.
- Estadio D (estadio terminal): son aquellos pacientes con tumor de gran tamaño, con disfunción hepática severa o síntomas invalidantes (Child C). La supervivencia suele ser menor de 6 meses y únicamente se puede ofrecer tratamiento sintomático o paliativo (13). (Anexo 1: Tabla 3)

1.6. TRASPLANTE HEPÁTICO

Indicado en pacientes no candidatos a resección que presenten los criterios de Milán: a) tumor único ≤ 5 cm; b) tres tumores, ninguno mayor de 3 cm; c) sin invasión vascular, y d) sin metástasis ganglionares ni a distancia. La tasa de supervivencia es superior al 75% a los cinco años. Estas cifras de supervivencia son similares o sólo discretamente peores a las de aquellos pacientes trasplantados por causas no malignas (14, 2).

Las desventajas del trasplante son la escasez de donantes y, por tanto, el tiempo en lista de espera, lo que puede hacer progresar la enfermedad. Para evitar la progresión del HCC en lista de espera, algunos autores defienden la quimioembolización transarterial (TACE) o la radiofrecuencia (RFA), así como la opción de donante vivo (3).

Aunque los criterios de Milán sean un buen límite para establecer el riesgo de recidiva, no son exactos. Aun cumpliendo estrictamente los criterios pretrasplante pueden presentar una recidiva del hepatocarcinoma. Por ello, cada vez hay más interés en estudiar factores anatomopatológicos (grado de diferenciación tumoral, microsatélites, microinvasión vascular, presencia de cápsula tumoral, etc) y moleculares (marcadores de inflamación, angiogénesis, proliferación celular, mutaciones como el p53, etc) que permitan predecir con mayor precisión la recidiva del tumor con la consiguiente optimización del tratamiento (15, 2).

1.7. MORFOLOGÍA

Morfológicamente el carcinoma hepatocelular puede presentarse como una masa única, ser multifocal o un cáncer infiltrativo difuso. Estas tres presentaciones pueden causar hepatomegalia, siendo más evidente en las dos primeras (7). (Anexo 2: imagen 1, 2, 3, 4, 5)

Las características macroscópicas del HCC varían dependiendo del tamaño del tumor y de la presencia o ausencia de cirrosis hepática. En general, la mayoría de HCC asociados a cirrosis, tienden a presentarse como un tumor expansivo con una cápsula fibrosa y septos intratumorales, mientras los no asociados a hígado cirrótico tienden a ser masivos y no encapsulados. Los diferentes grados de infiltración, la presencia de

trombos tumorales en la vena porta y de metástasis intrahepáticas, modifican su aspecto macroscópico. (Anexo 2: imagen 6 y 7)

Con respecto a la histopatología, el HCC puede presentar diferentes patrones estructurales:

- Trabecular: patrón más común en tumores bien y moderadamente diferenciados. Las células tumorales crecen en cordones separados por espacios sinusoidales. (Anexo 2: imagen 8)
- Pseudoglandular y acinar: es frecuente la presencia de un patrón glandular, a menudo mezclado con un patrón trabecular. Su estructura consta de una sola capa de células tumorales. Estas estructuras glandulares y acinares se forman por la dilatación de canalículos biliares entre las células tumorales. (Anexo 2: imagen 9)
- Compacto: espacios sinusoidales poco visibles, dando al tumor una apariencia sólida.
- Escirro: patrón poco común, caracterizado por una marcada fibrosis en los espacios sinusoidales con diferentes grados de atrofia, sobre un tumor trabecular. También puede haber cambios fibróticos similares tras quimioterapia, radiación y quimioembolización arterial.

Podemos encontrar otras variantes citológicas, como el tumor de células pleomórficas, que aparece en las formas pobremente diferenciadas, y presenta numerosas células gigantes anaplásicas, o el tumor de células claras, con citoplasma claro por la presencia de glucógeno (Anexo 2: imagen 10).

Existe una variante sarcomatosa con células fusiformes, difícil de distinguir de fibrosarcomas o sarcomas miogénicos. Suele darse con frecuencia tras quimioterapia y quimioembolización (Anexo 2: imagen 11 y 12).

Una variante peculiar es el carcinoma fibrolamelar. Este tumor se produce en pacientes jóvenes (entre 20 y 40 años de edad), no tiene asociación con los factores de riesgo anteriormente descritos y tiene mejor pronóstico. Se presenta como un nódulo único constituido por células poligonales bien diferenciadas. Las células tumorales crecen en láminas o pequeñas trabéculas separadas por fibras de colágeno con un patrón lamelar característico (Anexo 2: imagen 13,14).

Todos los patrones de HCC tienen propensión a la invasión de los canales vasculares. Aparecen grandes metástasis intrahepáticas y, en ocasiones, grandes masas

serpiginosas tumorales que invaden la vena porta, con oclusión de la circulación portal, o la vena cava inferior, extendiéndose incluso hasta el lado derecho del corazón.

Las metástasis fuera del hígado se producen por vía venosa, en especial dentro del sistema venoso hepático. Las metástasis hematógenas, especialmente las pulmonares, se dan en estadios tardíos de la enfermedad.

Las metástasis a ganglios linfáticos, se desarrollan en menos de la mitad de los hepatocarcinomas que se propagan fuera del hígado (16).

1.8. MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS RELACIONADOS CON LA PROGRESIÓN Y EL PRONÓSTICO DEL HEPATOCARCINOMA

En la actualidad hay un gran interés en conocer la implicación de diferentes marcadores biológicos relacionados con la carcinogénesis y la proliferación celular, ya que nos aportarían importante información a cerca del pronóstico de la enfermedad.

1.8.1. CICLOOXIGENASA 2 (COX2):

Es la enzima que cataliza la transformación del ácido araquidónico (AA) a prostaglandina H₂. Existen dos isoformas de la COX, la COX1, que se expresa de forma constitutiva en prácticamente todos los tejidos y está involucrada en las funciones homeostáticas de las prostaglandinas, y la COX2, que aparece en procesos inflamatorios y en algunos tipos de neoplasia (17).

El interés del estudio de la relación de la COX2 con la hepatocarcinogénesis ha derivado de la implicación de COX2 en la carcinogénesis en otros tejidos, principalmente en el cáncer de colon (18), adenocarcinoma de esófago, gástrico y carcinoma de células escamosas (19).

En el hígado, la COX2 y las prostaglandinas producidas por su inducción se han implicado en la regeneración hepática, la remodelación tisular y la hipertensión portal (17).

No se conoce con exactitud el mecanismo molecular por el cual la COX2 se relaciona con la carcinogénesis. En el proceso carcinogénico hepático, parece claro que está implicada en la inducción de angiogénesis vía factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), en la inhibición de la vía apoptótica y el aumento de la adhesión a la matriz extracelular de las células que sobreexpresaban COX2 (20, 21).

Con respecto a su relación con la angiogénesis, numerosos estudios han concluido que la COX2, al aumentar la producción de prostaglandinas, estimula la

producción del VEGF. (22) Del mismo modo, parece ser que la COX2, a través de la estimulación de la vía del VEGF, podría intervenir en el inicio de la angiogénesis del hepatocarcinoma, ya que se ha descrito la asociación entre los niveles de ambas sustancias, tanto a nivel tumoral como peritumoral. En cuanto a su relación con marcadores anatomopatológicos, los niveles elevados de COX2 en el tumor podrían además estar asociados con un estadio tumoral avanzado en la clasificación TNM y en definitiva, un mal pronóstico de la enfermedad (23, 24, 25).

Sobre la base de evidencias experimentales la inhibición selectiva de COX2 podría ser útil en la quimioprevención de los tumores hepáticos primarios (21).

1.8.2. KI67:

Es un antígeno nuclear que ha demostrado tener un papel importante en la regulación del ciclo celular. El gen del Ki67 está ubicado en el brazo largo del cromosoma humano número 10. No aparece en las células estacionadas o sin replicación, y alcanza niveles máximos de expresión durante la mitosis, concretamente se expresa en las fases G1, S, G2, M y no se expresa en las células en fase G0. El nivel de expresión de Ki67 da una idea por lo tanto del estado proliferativo de la célula tumoral y de su dinámica.

El Ki67 se ha utilizado en diversos estudios para evaluar la actividad proliferativa del hepatocarcinoma. Un índice de proliferación elevado, se asocia con la recidiva tumoral tras hepatectomía y con un peor pronóstico (26, 27).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS:

¿Podrían existir marcadores relacionados con la inflamación (COX2) y la proliferación celular (ki67) del hepatocarcinoma implicados en la agresividad del tumor y en su probabilidad de recurrencia tras el trasplante?

El estudio de estos marcadores nos permitiría identificar un subgrupo de pacientes con un mayor riesgo de recidiva y que, por tanto, precisarían un mayor seguimiento o quizás, en un futuro, un tratamiento más específico.

2.2. OBJETIVOS:

- Estudiar si la expresión de factores de inflamación (COX2), tanto en tejido tumoral como peritumoral, se relaciona con la recidiva del hepatocarcinoma tras el trasplante hepático.
- Investigar si la expresión de marcadores de proliferación celular, como el Ki67, en tejido tumoral y peritumoral, se relaciona con la recidiva del hepatocarcinoma tras el trasplante hepático.
- Analizar si la presencia de determinados factores morfológicos y anatomopatológicos de agresividad tumoral se relacionan con la recidiva postrasplante del hepatocarcinoma.
- Estudiar si existe una relación entre la expresión inmunohistoquímica de estos marcadores de inflamación y proliferación celular con otros factores morfológicos y anatomopatológicos de agresividad tumoral.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Para alcanzar los objetivos en nuestro trabajo, en primer lugar, se revisaron los 577 trasplantes hepáticos realizados en el Hospital Clínico universitario Lozano Blesa de Zaragoza entre diciembre de 1998 y diciembre de 2016.

De estos trasplantes, 138 fueron diagnosticados de hepatocarcinoma en la pieza de explante (hígado nativo), y de ellos, seleccionamos como muestra para nuestro estudio, los 100 últimos trasplantes que cumplían los siguientes requisitos:

- Pacientes trasplantados hepáticos en el periodo de tiempo establecido.
- Presencia de hepatocarcinoma en el explante.
- Muestras anatomopatológicas disponibles, tanto de tejido tumoral como peritumoral, en el archivo del HCU Lozano Blesa.

En segundo lugar, dentro de los 100 trasplantes anteriores, se seleccionó una muestra más reducida que comprendía las piezas de los últimos 20 explantes, habiéndose producido en 2 de ellos recidiva del hepatocarcinoma (18 sin recidiva).

3.2. MÉTODOS

En nuestra primera muestra de 100 pacientes, estudiamos sus características epidemiológicas, clínicas y anatomopatológicas:

- Sexo
- Edad en el momento del trasplante
- Patología hepática de base
- Presencia de cirrosis
- Recidiva tumoral
- Grado del HCC
- N° de nódulos tumorales
- Tamaño de los nódulos tumorales
- Presencia de necrosis
- Invasión vascular
- Presencia de cápsula

Además, en el segundo grupo de 20 pacientes, hemos estudiado la expresión de marcadores relacionados con la carcinogénesis y la proliferación celular, como COX2 y Ki67, mediante técnicas de inmunohistoquímica en el tejido hepático, tanto a nivel del hepatocarcinoma, como a nivel peritumoral.

Tras el trasplante hepático, las muestras fueron fijadas en formaldehído al 10% durante, al menos, 48 horas y luego incluidas en bloques de parafina, que se almacenaron en el archivo de Anatomía Patológica del centro.

Todos los explantes fueron estudiados por un anatomopatólogo especializado en patología hepática. Tras una evaluación inicial del hígado entero, éste fue seccionado en láminas de unos 2 cm de grosor. De las zonas que se consideran más interesantes a nivel macroscópico, incluidas las tumoraciones, se cortan bloques que también se conservan incluidos en parafina y son archivados. A partir de estos bloques, se obtienen cortes de 3 μm de grosor y son teñidos con Hematoxilina-Eosina.

Una vez realizada la selección de los cortes, se realizaron los siguientes pasos para llevar a cabo las técnicas de inmunohistoquímica:

- a. Desparafinado.
- b. Hidratación: con etanol al 96% y 70% sucesivamente, y posteriormente, en agua destilada.
- c. Recuperación antigénica: por calor.
- d. Tinción: se realiza la misma técnica con todos los anticuerpos empleados en este trabajo:

- Inhibición de la peroxidada endógena con Peroxidasa Bloqueante.
 - Lavados con buffer-tampón, 5 minutos.
 - Incubación con el anticuerpo primario durante 30 minutos.
 - Tres lavados con buffer de lavado, de 5 minutos cada uno.
- e. Amplificación de la señal: Se incuban las muestras con un anticuerpo secundario durante 30 minutos.
- f. Tres lavados, de 5 minutos cada uno.
- g. Deshidratación:
- Alcohol al 70% durante 2 minutos.
 - Alcohol al 96% durante 3 minutos.
 - Alcohol al 100% durante 5 minutos
 - Unos pases rápidos con xilol
- h. Contratación: Con Hematoxilina durante 5 minutos.
- i. Montaje de las muestras con Eukitt.

3.2.1. Valoración de la Inmunohistoquímica

La COX2 fue valorada mediante una escala semicuantitativa. Actualmente no existe una escala de valoración estandarizada para valorar la tinción de este marcador. Por ello, tras revisar la literatura (2), se decidió emplear la escala semicuantitativa de Koga para valorar la COX2, por estimarla completa y de fácil interpretación.

Parámetro	Puntuación	
Intensidad Máxima en la muestra	0-3	0= No tinción 1= Tinción levemente positiva 2= Tinción moderadamente positiva 3= Tinción muy positiva
Intensidad más frecuente en la muestra	0-3	0= No tinción 1= Tinción levemente positiva 2= Tinción moderadamente positiva 3= Tinción muy positiva
Extensión de Positividad	1-4	1= 0-25% de las células teñidas 2= 25-50% de las células teñidas 3= 50-75% de las células teñidas 4= 75-100% de las células teñidas
Total	1-10	

Tabla 1: Escala semicuantitativa de Koga

La tinción mediante inmunohistoquímica de marcadores de proliferación celular, como el Ki67, se valora en modo estándar mediante el Índice de Proliferación celular, que equivale al porcentaje de células con núcleo teñido respecto al total de células.

3.2.2. Análisis estadístico

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio descriptivo de la muestra, en concreto un estudio transversal o de prevalencia (análisis de las variables de la enfermedad en un momento concreto en el tiempo). Posteriormente, en los últimos 20 pacientes de la muestra, se valoró la relación entre el aumento de expresión de marcadores inmunohistoquímicos (COX2 y Ki67) y la recidiva tumoral tras el trasplante.

La relación establecida en el estudio descriptivo debe ser posteriormente verificada por un estudio analítico para lo cual se planteó un estudio de casos y controles:

- Casos: aquellos pacientes trasplantados hepáticos por HCC que presentan recidiva tumoral postrasplante.
- Controles: aquellos pacientes trasplantados hepáticos por HCC que no presentan recidiva tumoral postrasplante.
- Factor de riesgo/protector: presencia de marcadores inmunohistoquímicos en la pieza de explante (COX2 y Ki67).

La fuerza de asociación entre el factor de riesgo/protector y la recidiva tumoral tras el trasplante, fue medida mediante la odds ratio, la cual se define como la posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo de que ocurra en otro grupo de población de similares características en relación a la exposición previa a un factor de riesgo.

	Recidiva	No recidiva	
Positividad COX2/ Ki67	a	b	Total Expuestos
Negatividad COX2/ Ki67	c	d	Total no expuestos
	Total casos	Total controles	Total muestra

Tabla 2: Cálculo de odds ratio

En nuestro caso, la odds ratio es el cociente entre la oportunidad de enfermedad del grupo expuesto (positividad marcador) a/b y la oportunidad de enfermedad del grupo no expuesto (negatividad marcador) c/d . Fórmula de cálculo odds ratio:

$$OR = \frac{a/b}{c/d}$$

Posibles resultados:

- $OR > 1$: La positividad del marcador supondría un factor de riesgo para la supervivencia en el HCC.
- $OR < 1$: La positividad del marcador supondría un factor protector para la supervivencia en el HCC.
- $OR = 1$: No hay asociación entre las variables, es decir, el pronóstico de la enfermedad no varía en relación con la positividad del marcador.

Una vez realizados los estudios epidemiológicos se planteó la realización de un análisis estadístico mediante un estudio de contraste de hipótesis para lo cual se aplicó el test U de Mann-Whitney, una prueba no paramétrica útil para mostrar la relación entre dos variables independientes en una muestra pequeña (menor de 30 sujetos).

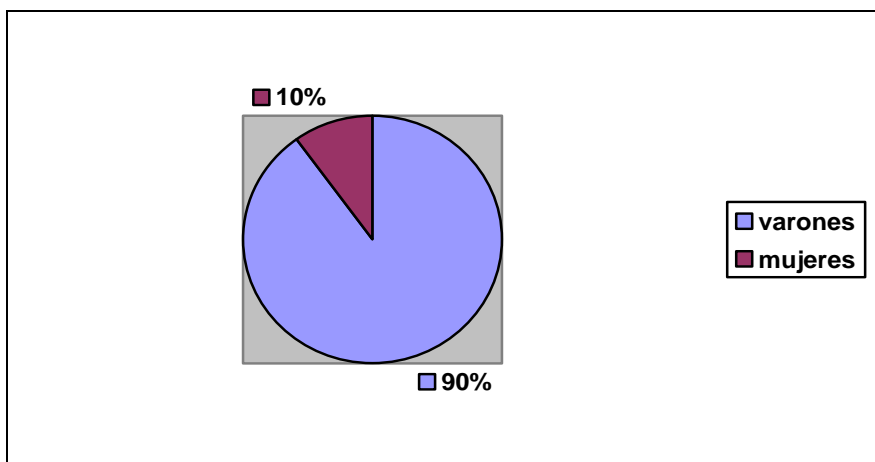
Para toda la investigación se estableció el nivel de significación estadística p menor de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA PRIMERA MUESTRA

Se incluyeron en el estudio 100 pacientes trasplantados por hepatocarcinoma, de los cuales, 90 eran varones (90%) y 10 eran mujeres (10%).

Gráfico 1: Sexo

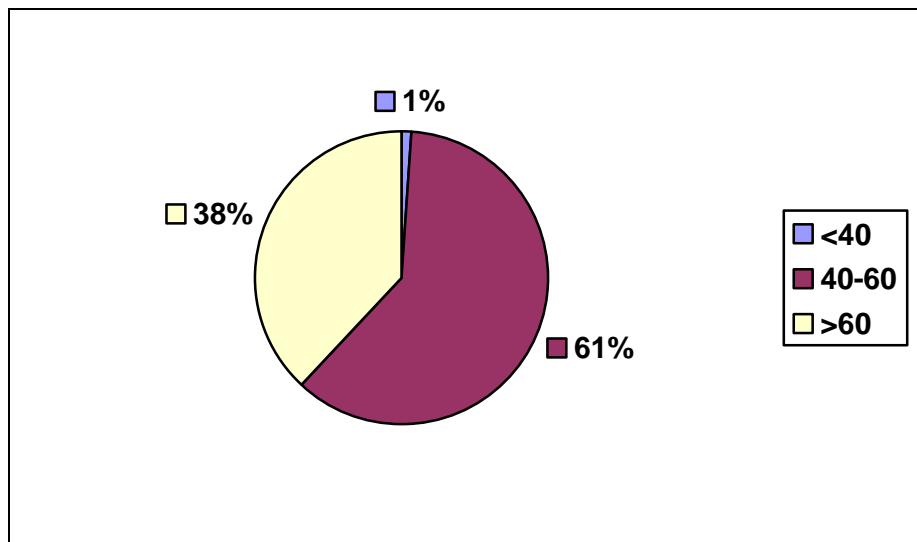


La edad media de la muestra fue de 56,7 años, con un rango de edades situado entre 35 y 68 años. Para analizar la edad de aparición de los hepatocarcinomas, dividimos a los pacientes en 3 grupos:

- <40 años.
- 40-60 años.
- >60 años.

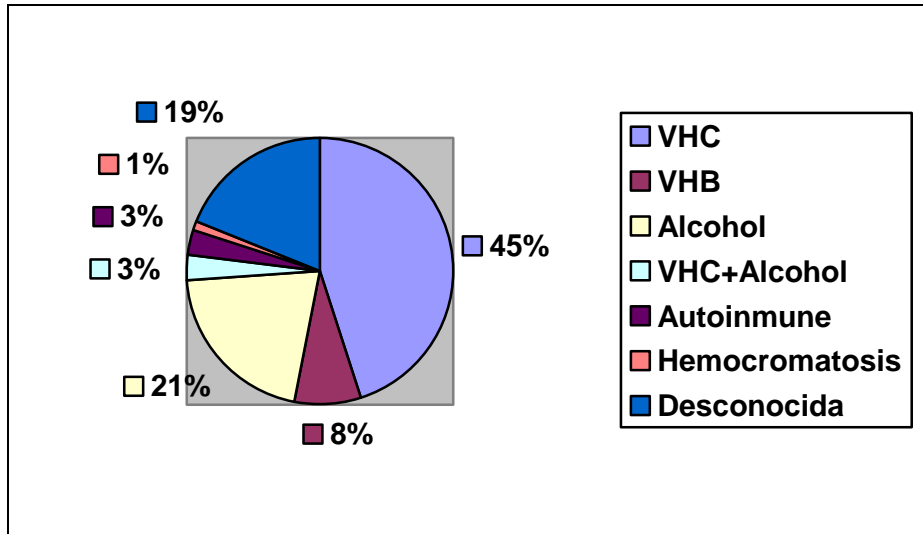
En nuestra muestra, encontramos 1 paciente menor de 40 años (1%), 61 pacientes con una edad entre 40 y 60 años (61%) y 38 pacientes mayores de 60 años (38%).

Gráfico 2: Edad



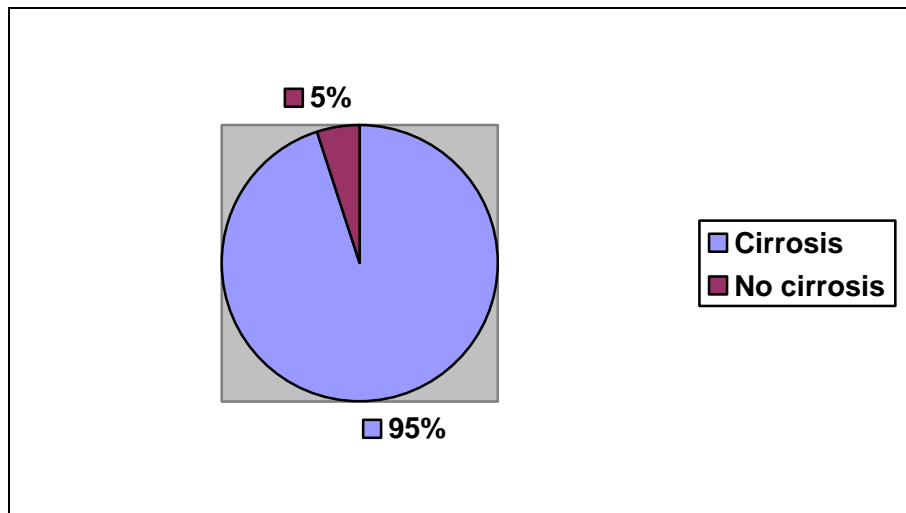
La etiología más frecuente fue la infección por el virus de la hepatitis C presentada por 45 pacientes (45%), seguida de enolismo con 21 pacientes (21%). 19 pacientes muestran una etiología desconocida o sin filiar (19%). Con un porcentaje menor, se encuentran la asociación de VHC y alcohol (3%), la etiología autoinmune (3%) y la hemocromatosis (1%).

Gráfico 3: Etiología



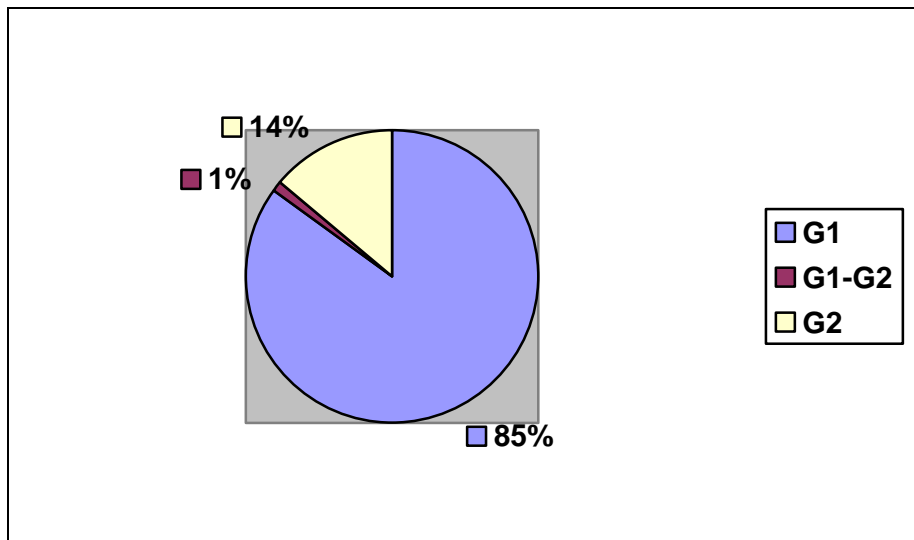
De los pacientes estudiados, 95 presentaban un hígado cirrótico (95%) y únicamente 5 de ellos no presentaban cirrosis (5%).

Gráfico 4: Presencia de cirrosis



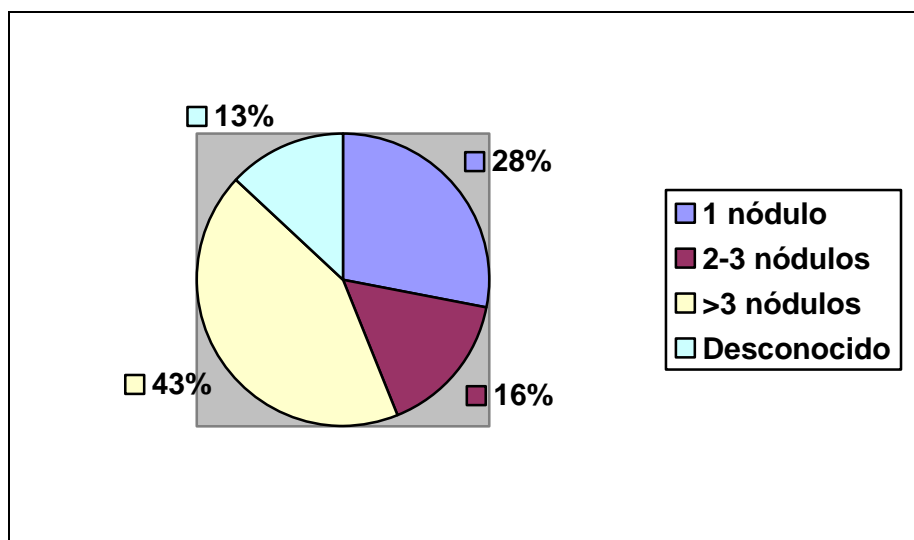
Con respecto al grado histológico del Hepatocarcinoma, se consideraron 85 pacientes como un G1, 14 pacientes como un G2 y 1 paciente clasificado como grado intermedio entre G1-G2.

Gráfico 5: Grado Histológico



Otro aspecto a valorar en el hepatocarcinoma fue el número de nódulos presentes en el hígado. En nuestra muestra se hizo una clasificación en función de la presencia de un único nódulo (28 pacientes), entre 2 y 3 nódulos (16 pacientes) o más de 3 nódulos (43 pacientes). El último grupo estaba formado por aquellos cuyo número de nódulos hepáticos era desconocido (13 pacientes).

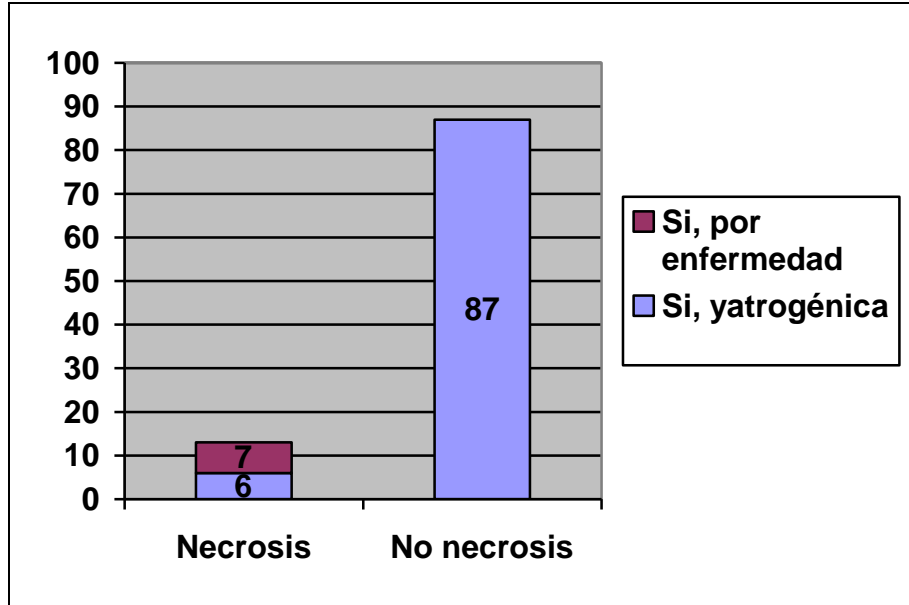
Gráfico 6: Número de nódulos hepáticos



La necrosis en el hepatocarcinoma, la presentaban únicamente 13 de los casos estudiados (13% del total) frente a 87 casos que no la presentaban (87%). Esta necrosis podía considerarse como propia de la enfermedad en 7 de los casos. En los 6 casos

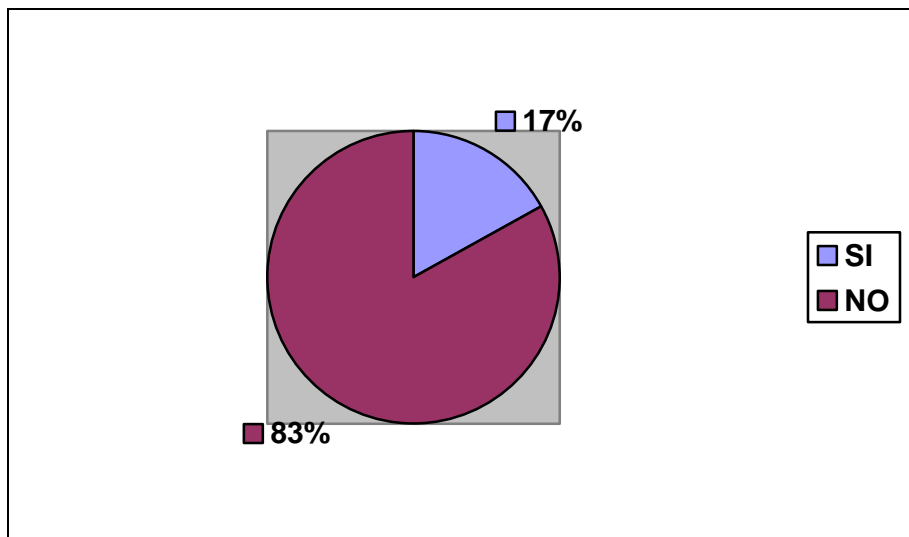
restantes que presentaban necrosis, la causa fue yatrogénica por quimioembolización del tumor.

Gráfico 7: Presencia de Necrosis



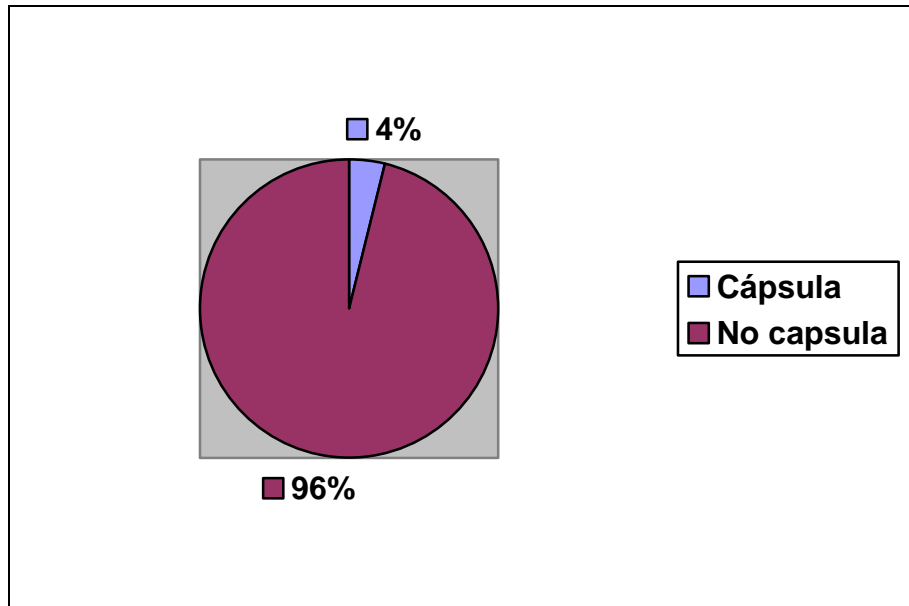
En nuestro estudio, 17 de los pacientes estudiados presentaban invasión vascular (17%) y los 83 restantes no la presentaban (83%).

Gráfico 8: Invasión vascular



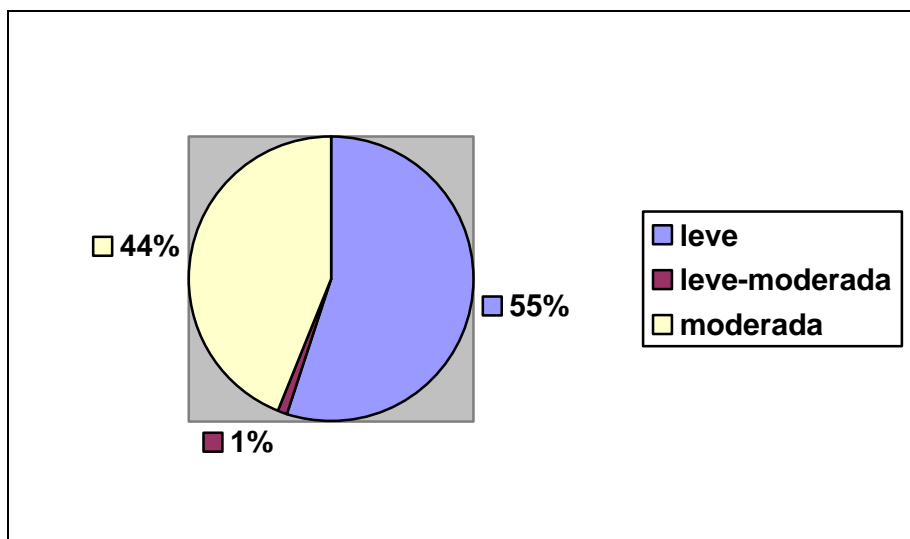
Otra característica anatomopatológica que hemos estudiado, ha sido la presencia o no de cápsula periférica tumoral. Aparecía únicamente en 4 de nuestros pacientes (4%).

Gráfico 9: Presencia de cápsula tumoral



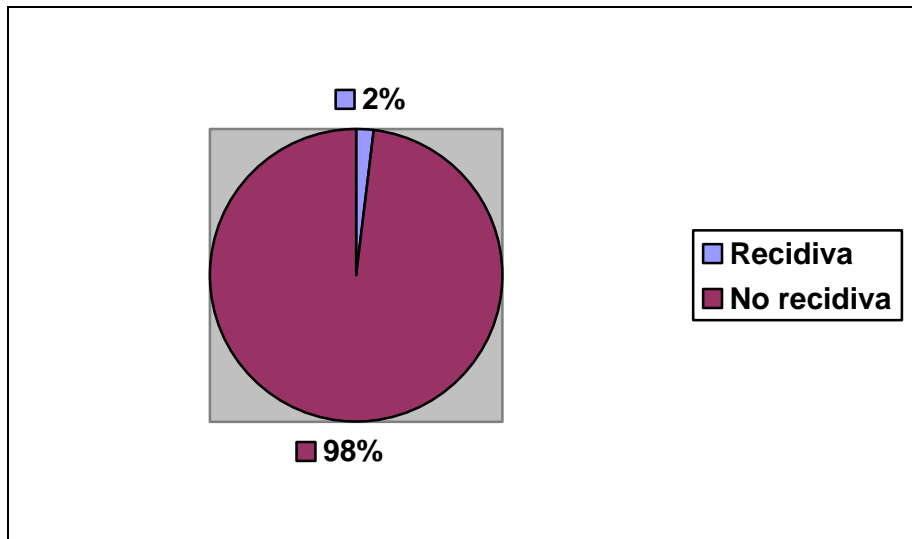
El último criterio anatomopatológico que hemos examinado, ha sido el grado de inflamación del hepatocarcinoma. 55 de nuestros pacientes presentaban inflamación leve (55%), 44 inflamación moderada (44%), 1 inflamación leve-moderada (1%).

Gráfico 10: Grado de inflamación



De nuestros 100 pacientes estudiados, únicamente 2 de ellos presentaron recidiva del hepatocarcinoma tras el trasplante hepático (2%).

Gráfico 11: Recidiva tumoral postrasplante



4.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA SEGUNDA MUESTRA

En nuestra muestra más reducida de 20 pacientes, 2 de ellos presentaban recidiva tumoral tras el trasplante (casos) y 18 no la presentaban (controles). A continuación, se expone una comparación de las características anatomopatológicas de agresividad tumoral presentes en las recidivas y en los tumores no recidivantes. (Anexo 1: Tabla 4)

Gráfico 12: Grado Histológico

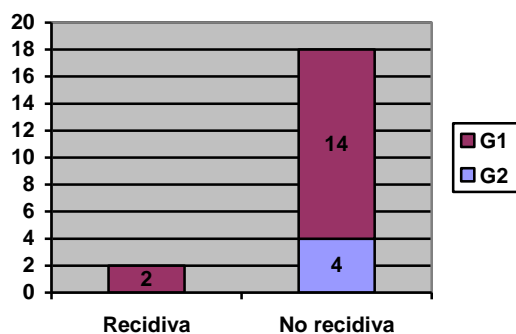


Gráfico 13: N° de nódulos tumorales

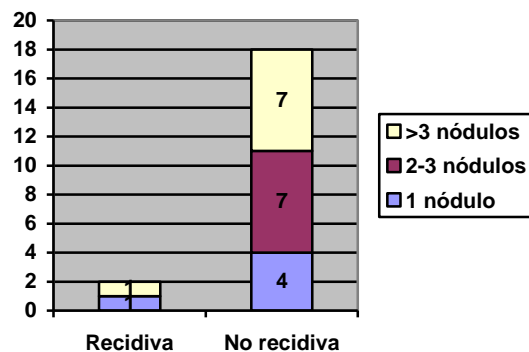


Gráfico 14: Necrosis tumoral

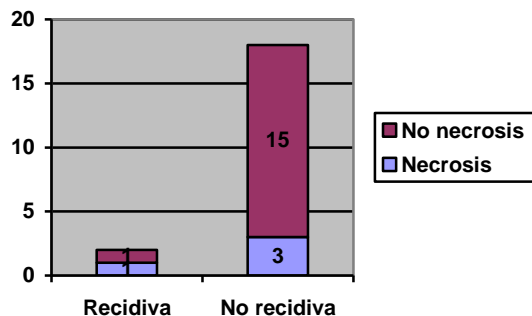


Gráfico 15: Invasión vascular por el tumor

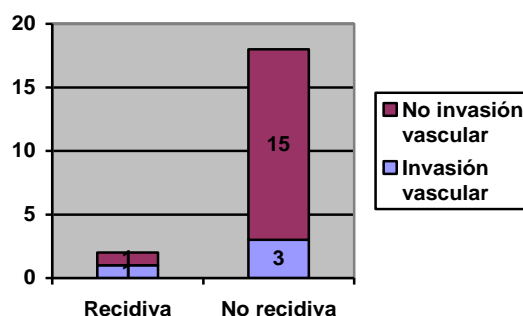


Gráfico 16: Presencia de cápsula tumoral

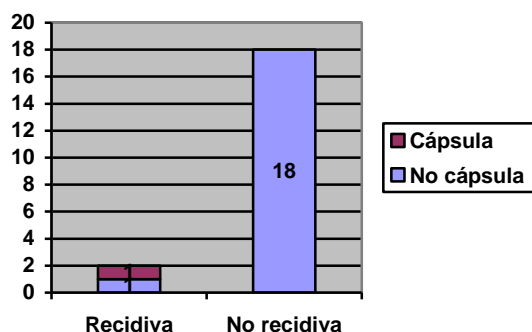
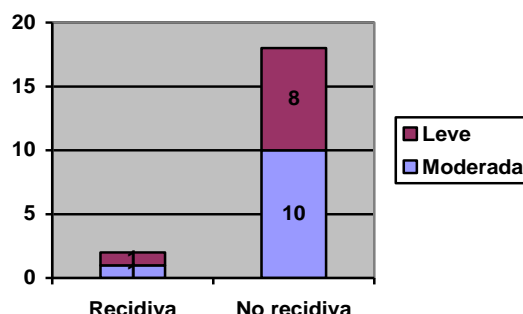


Gráfico 17: Grado de inflamación tumoral



En relación a las características de agresividad del tumor:

- Ninguna de las dos recidivas presentó una diferenciación pobre del tumor (G2), ambas eran bien diferenciadas (G1). En cifras totales, el 12,5% de los tumores considerados como G1 presentaron recidiva postrasplante.
- 8 de los 20 pacientes presentaron multifocalidad (>3 nódulos) y 5 de ellos presentaron un único nódulo. En cifras totales, el 12,5% de los tumores multifocales y el 20% de los tumores con un único nódulo presentaron recidiva tras el trasplante.
- Únicamente 4 de los 20 pacientes totales (20%) presentaron necrosis tumoral. De aquellos que presentaban necrosis, el 25% recidivó tras el trasplante.
- La invasión vascular se dio en 4 pacientes, de los cuales, uno de ellos (25%) presentó recidiva posterior.
- La cápsula tumoral únicamente se observó en uno de los pacientes de la muestra (5%), que además presentó recidiva postrasplante. En el resto de pacientes, en los que no se observó cápsula tumoral, se produjo recidiva del tumor en el 5,2%.
- 11 de los 20 pacientes (55% de la muestra) presentaron un grado de inflamación moderado en el tumor. De ellos, el 9% presentó recidiva tras el trasplante hepático.

En relación al tiempo transcurrido entre la fecha del trasplante y la recidiva tumoral, en el primero de los casos pasaron 9 años y 3 meses y en el segundo caso, 1 año y 7 meses. En los 18 controles que no presentaban recidiva tumoral, el tiempo medio libre de enfermedad fue de 3,71 años (con un tiempo mínimo de 3 meses y un máximo de 6 años y 8 meses).

Cabe destacar, que 6 de los pacientes de la muestra (30%) fallecieron antes del primer año postrasplante, por lo que presentaron un tiempo libre de enfermedad corto.

4.3. RESULTADOS DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

4.3.1. Valoración de COX2

La COX2 se expresó como una proteína citoplasmática. Se evidenció su expresión tanto en tejido cirrótico peritumoral como en las células tumorales, pero en ocasiones de un modo poco homogéneo. Este hecho queda debidamente recogido en la escala de Koga que hemos empleado.

Tabla 1: Expresión de COX2 en tumor y tejido peritumoral según la Escala Koga.

No Recidiva	Intensidad Máxima		Intensidad más frecuente		Extensión de Positividad		Total	
	Tumor	Peritumoral	Tumor	Peritumoral	Tumor	Peritumoral	Tumor	Peritumoral
1	3	3	3	3	4	4	10	10
2	3	2	3	2	4	4	10	8
3	2	2	2	1	4	4	8	7
4	2	2	2	2	4	4	8	8
5	3	2	2	2	4	4	9	8
6	2	2	2	2	4	4	8	8
7	1	0	0	0	1	0	2	0
8	3	2	2	2	4	4	9	8
9	3	2	3	2	4	4	10	8
10	3	3	1	1	4	4	8	8
11	2	2	2	2	4	4	8	8
12	2	1	2	1	4	4	8	6
13	2	2	2	2	4	4	8	8
14	3	2	3	2	4	4	12	10
15	3	3	3	3	4	4	12	12
16	3	2	1	1	3	3	7	6
17	2	3	1	1	4	4	7	8
18	2	2	1	1	3	3	6	6

Recidiva	Intensidad Máxima		Intensidad más frecuente		Extensión de Positividad		Total	
	Tumor	Peritumoral	Tumor	Peritumoral	Tumor	Peritumoral	Tumor	Peritumoral
19	1	1	1	1	3	3	5	5
20	1	2	1	1	2	2	4	5

Tabla 2: Extensión de la positividad para COX2 en tejido tumoral y peritumoral según la recidiva.

	Tumor		Tejido Peritumoral	
	COX2 <50% céls	COX2 >50% céls	COX2 <50% céls	COX2 >50% céls
Recidiva (n=2)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)
No recidiva (n=18)	1 (5,6%)	17 (94,4%)	1 (5,6%)	17 (94,4%)

En los 18 pacientes que no presentaron recidiva tras el trasplante, hemos obtenido:

- Una Intensidad Máxima media de 2,44 en el tejido tumoral y de 2,05 en el tejido peritumoral
- La Intensidad más frecuente media fue de 1,94 en el tumor y de 1,67 en el tejido peritumoral.
- La Extensión de positividad media fue de 3,72 en el tumor y de 3,67 en el tejido peritumoral, que en ambos casos se correspondería con una tinción media de más del 50% de las células.
- Una puntuación total media en la escala Koga de 8,33 en el tumor y de 7,61 en el tejido peritumoral.

En los 2 pacientes que presentaron recidiva postrasplante observamos:

- Una Intensidad Máxima media de 1 en el tumor y de 1,5 en el tejido peritumoral.
- La Intensidad más frecuente media fue de 1 tanto en el tumor como en el tejido peritumoral.
- La Extensión de positividad media fue de 2,5 en región tumoral y peritumoral, existiendo en uno de los casos una tinción de menos del 50% de las células tanto en tejido tumoral como peritumoral.

- La Puntuación total media en la escala de Koga fue de 4,5 en el tumoral y de 5 en el peritumoral.

Como podemos observar, en el grupo que no presenta recidiva, encontramos una mayor expresión de la COX2 a nivel tumoral que a nivel peritumoral.

En los casos que recidivan tras el trasplante, la expresión de la COX2 es a nivel general menor que en el grupo control. Además, se ha expresado con mayor intensidad en el tejido peritumoral que en el tumoral.

Gráfico 18: COX2 en el tumor

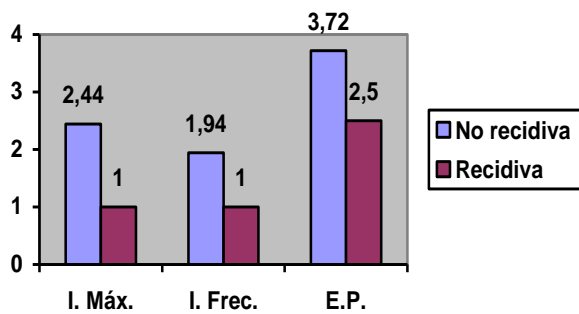
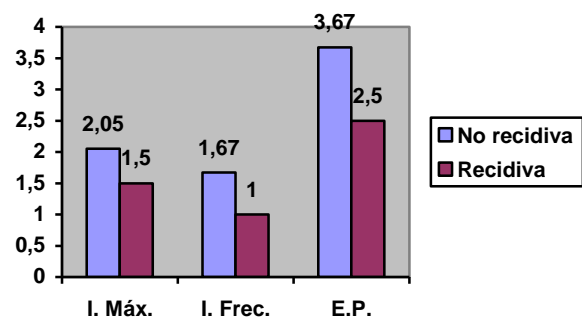


Gráfico 19: COX2 en tejido peritumoral



4.3.2. Valoración del Ki67

La tinción inmunohistoquímica del Ki67, se localizó a nivel de los núcleos de las células en proliferación, tanto a nivel tumoral como peritumoral.

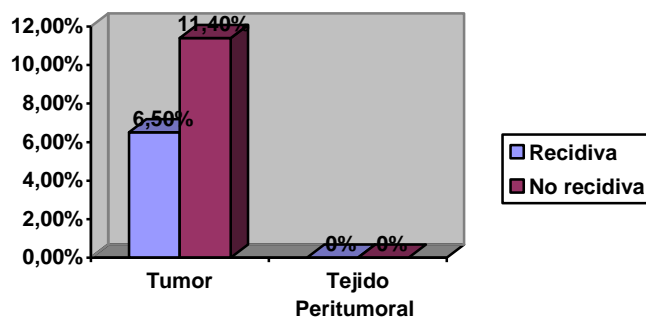
La expresión de Ki67 fue baja a nivel global en nuestra muestra. A nivel peritumoral no se evidenció expresión del Ki67 en ninguna de las piezas (porcentaje medio de expresión del 0%).

A nivel tumoral, en los sujetos que no presentaron recidiva, el porcentaje medio de expresión del Ki67 fue del 11,4%, mientras que en las recidivas postrasplante el porcentaje medio fue del 6,5%.

Tabla 3: Porcentaje de expresión de Ki67 en tejido tumoral y peritumoral según la recidiva.

No Recidivas	Porcentaje de proliferación Celular	
	Tumor	Peritumoral
1	0%	0%
2	4%	0%
3	0%	0%
4	5%	0%
5	2%	0%
6	40%	0%
7	38%	0%
8	1%	0%
9	3%	0%
10	4%	0%
11	2%	0%
12	20%	0%
13	60%	0%
14	6%	0%
15	20%	0%
16	0%	0%
17	0%	0%
18	0%	0%
Recidivas	Porcentaje de proliferación Celular	
	Tumor	Peritumoral
19	1%	0%
20	12%	0%

Gráfico 20: Expresión media de Ki67



En un segundo análisis, se decidió dividir a los tejidos tumorales en bajo o alto nivel de proliferación celular, usando como punto de corte el percentil 75 de la distribución:

- Percentil 75 Ki67 tumoral: 12%

Tabla 4: Relación entre recidiva tumoral y grado de proliferación celular en el HCC.

Tejido Tumoral	Baja proliferación Celular (<12%)	Alta proliferación Celular (>12%)
No recidiva (n=18)	13 (72,2%)	5 (27,8%)
Recidiva (n=2)	2 (100%)	0 (0%)

Los dos casos que recidivaron tras el trasplante, presentaron un bajo nivel de proliferación celular (<12% de células teñidas con Ki67), así como la mayoría de los pacientes sin recidiva tumoral. Únicamente presentaron un nivel de proliferación elevado (>12% de células teñidas con Ki67), el 27,8 % de las piezas que no recidivan postrasplante.

5. DISCUSIÓN

El principal objetivo de nuestro trabajo ha sido la evaluación de diferentes marcadores de inflamación y de proliferación celular (COX2 y Ki67), así como la presencia de determinadas características anatomopatológicas en el tumor, y su relación con la recidiva del hepatocarcinoma tras el trasplante hepático.

Una vez obtenidos los resultados de nuestro estudio, procedemos a realizar un análisis de los mismos y una comparación con bibliografía y estudios previos.

En primer lugar, hemos encontrado una mayor prevalencia del hepatocarcinoma en varones, con una proporción de 9:1 con respecto al sexo femenino. La edad de presentación más frecuente estaba comprendida entre la cuarta y sexta década de vida. La bibliografía revisada apoya estos resultados, indicando un claro predominio del hepatocarcinoma en varones a nivel mundial, así como una mayor prevalencia entre los 45 y los 60 años, existiendo variaciones según el área geográfica y el grado de desarrollo (5).

Con respecto a la etiología, hemos observado un predominio de la infección crónica por el VHC, seguida de la causa enólica. Siendo poco frecuentes, la causa autoinmune, metabólica o la asentación sobre un hígado sano. Referencias publicadas,

afirman que, en los países desarrollados, los factores de riesgo más frecuentemente asociados al HCC son la infección crónica por el VHC y el alcoholismo (28).

La etiología autoinmune ha sido menos frecuente entre las causas de HCC. Cabe destacar, que de los 3 pacientes que presentaban patología autoinmune, 2 de ellos eran mujeres. En la bibliografía se hace referencia a una mayor incidencia de cirrosis secundaria a hepatitis autoinmune en el sexo femenino (29). Para que el tumor llegue a producirse, es necesario que haya un hígado cirrótico secundario a la hepatitis autoinmune crónica. Una vez desarrollada la cirrosis, el riesgo del desarrollo del tumor es comparable con el riesgo de carcinoma hepatocelular en pacientes con cirrosis secundaria a VHB, VHC, hemocromatosis o etiología alcohólica (30).

La presencia de cirrosis parece ser el factor de mayor relevancia en el desarrollo del hepatocarcinoma. En nuestra muestra, estaba presente en el 95% de las piezas de explante, coincidiendo con los datos bibliográficos que estiman que más del 80% de los HCC aparecen sobre un hígado cirrótico (13).

Uno de los factores anatomopatológicos a tener en cuenta en el pronóstico del tumor es el Grado histológico. La mayoría de los tumores estudiados (85%) eran bien diferenciados, por lo que se consideraron como G1. Los tumores pobremente diferenciados o indiferenciados, se relacionan con una mayor agresividad y progresión del tumor, así como con una mayor probabilidad de invasión del territorio vascular (31). Los dos pacientes estudiados que presentaban recidiva, eran bien diferenciados, por lo que, en este caso, no hemos encontrado asociación o no ha sido ésta la causa de la recidiva.

Otro aspecto destacable a valorar en el hepatocarcinoma, fue el número de nódulos tumorales presentes en el hígado. Existen evidencias de que la presencia de multifocalidad y de un tamaño nodular elevado son factores de mal pronóstico en el tumor. La presencia de varios nódulos puede deberse a metástasis del hepatocarcinoma inicial o bien a varios tumores distintos que se desarrollan de forma sincrónica. Esta última situación es más frecuente en pacientes infectados por el VHB (5).

En nuestra muestra, casi la mitad de piezas hepáticas (43%) presentaban más de 3 nódulos tumorales, aunque se aplicaron correctamente los criterios de Milán para el trasplante hepático. Esto puede explicarse por la progresión del tumor durante el tiempo de lista de espera. En cuanto a los dos casos que recidivaron tras el trasplante, uno de ellos presentó 6 nódulos menores de 3 cm y el otro, un único nódulo de 20 cm de diámetro, por lo que la multifocalidad y el gran tamaño sí que han podido influir en la

reaparición de estos tumores postrasplante, aunque no podemos afirmarlo con significación estadística debido al limitado tamaño muestral.

La presencia de cápsula tumoral, necrosis e invasión vascular han sido características anatomopatológicas poco frecuentes en nuestra muestra.

En nuestro estudio, únicamente 4 de las piezas presentaban cápsula tumoral. La presencia o ausencia de cápsula influye en el tratamiento quirúrgico del hepatocarcinoma ya que la existencia de un tumor localizado y encapsulado apoya a la resección de la lesión, mientras que un tumor multifocal e infiltrante apoya al trasplante hepático, siempre que cumpla los criterios de Milán (32). La población de la cual ha sido obtenida la muestra está compuesta por hígados que han sido trasplantados, por lo tanto, gran parte de estos hepatocarcinomas no presentarán cápsula o si la presentan, ésta habrá sido infiltrada por el tumor.

La necrosis tumoral se considera una característica de agresividad en el hepatocarcinoma. Únicamente en el 7% de los hígados estudiados se observó una necrosis producida por la propia enfermedad. Otra causa secundaria de necrosis, es la yatrogénica, producida en pacientes tratados con quimioembolización, que se observó en el 6% de los casos.

La invasión vascular por el tumor es también una característica histológica de agresividad, y existen evidencias de que posee un papel importante en cuanto al pronóstico y la recidiva de la enfermedad tras el trasplante (33). En nuestro estudio, sólo ha estado presente en el 17% de los pacientes.

En uno de los casos recidivantes, hemos encontrado necrosis, invasión vascular y una cápsula invadida por el tumor, todas ellas, características de mal pronóstico. En el otro caso que presenta recidiva, no hemos encontrado necrosis ni invasión vascular en la pieza de explante, pero sí una inflamación importante en la región tumoral.

Con respecto a los marcadores inmunohistoquímicos estudiados (COX2 y Ki67), los resultados obtenidos no nos permiten confirmar su relación con el pronóstico del hepatocarcinoma y la recidiva tras el trasplante hepático.

Nuestro estudio tiene como principales limitaciones el haberse llevado a cabo de modo retrospectivo y con un tamaño muestral limitado. A ello hay que añadir que los casos, es decir, los pacientes trasplantados con hepatocarcinoma y posterior recidiva tumoral, suponen un grupo reducido en nuestro medio. De los 100 pacientes seleccionados en nuestra muestra, únicamente 2 de ellos presentaron recidiva, que

posteriormente utilizamos como casos en nuestro estudio. Como controles se seleccionaron 18 pacientes con hepatocarcinoma en el explante sin posterior recidiva.

Otro aspecto a tener en cuenta, fue el tiempo que transcurrió desde la fecha de trasplante hasta la recidiva, siendo de 9 años y 3 meses en uno de los casos y de 1 año y 7 meses en el otro. El 30% de los controles de nuestro estudio, fallecieron en el primer año postrasplante, por lo que no habría existido tiempo suficiente para que se desarrollara una recidiva de la enfermedad.

En cuanto a la valoración de COX2, al comparar su expresión en el tumor y en el tejido peritumoral, se observó cómo ésta era superior en las células tumorales. Revisando la bibliografía, encontramos resultados similares (34), aunque existen diferencias entre los distintos estudios según la escala de medición utilizada en la valoración de la COX2. En otros trabajos, como el de Tang (35) se observó una expresión similar en el tejido tumoral y peritumoral. Esto puede ser debido a que, al ser llevados a cabo en Asia, incluyen una mayoría de pacientes con VHB, que podría producir una inflamación y una expresión de COX2 más generalizada. En nuestro caso, dada la limitación del tamaño muestral, no se llevó a cabo un análisis según la etiología de la cirrosis.

Al analizar el valor pronóstico de la COX2, no encontramos asociación entre su expresión en el tumor y la recidiva tumoral postrasplante, ya que no contamos con resultados estadísticamente significativos. La bibliografía revisada si que defiende una relación entre el aumento de COX2 y la progresión del daño hepático, así como una mayor recurrencia tumoral y una menor supervivencia libre de enfermedad (36).

Por último, se estudió la proliferación celular en el hepatocarcinoma mediante la cuantificación de núcleos que expresaban el marcador Ki67. En el tejido peritumoral, no se expresó el marcador en ninguna de las muestras y en el tumor, se expresó de forma débil. Por ello, podemos afirmar que el Ki67 presentó una baja expresión en el hepatocarcinoma. La bibliografía revisada indica que, por lo general, la expresión del Ki67 en el hepatocarcinoma es baja, salvo en tumores muy agresivos, que suelen presentar una expresión elevada (27).

En cuanto al valor pronóstico del Ki67, no observamos que su nivel de expresión se asociara con la recidiva tumoral y no contamos con la suficiente significación estadística. La baja o nula expresión del Ki67 en algunas de las muestras, puede ser debida a un defecto en la tinción inmunohistoquímica debido a la antigüedad de las piezas utilizadas, por lo que podríamos estar frente a resultados falsos negativos.

La mayoría de trabajos revisados sí que apuntan a que un índice elevado de proliferación celular, se asocia con la recidiva tumoral tras la hepatectomía (26, 27).

6. CONCLUSIONES

- En nuestro estudio, el hepatocarcinoma es más frecuente en el sexo masculino (90%) y en edades medias de la vida (61% entre 40 y 60 años).
- Se trata de un tumor de elevada incidencia en determinados grupos de riesgo, como pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C (45%) y alcoholismo (21%).
- La mayoría de hepatocarcinomas se producen sobre un hígado cirrótico (95%).
- El marcador de proliferación celular, Ki67, presentó de forma general una tinción débil en el tumor, por lo que podemos afirmar que el hepatocarcinoma ha presentado un bajo índice de proliferación celular en nuestro trabajo.
- Los marcadores estudiados (COX2 y Ki67) tienen, por lo general, una mayor expresión en el tejido tumoral que en el peritumoral.
- Con los resultados obtenidos en nuestro estudio, no podemos afirmar que exista asociación entre la expresión de COX2 y Ki67 y la recidiva del hepatocarcinoma tras el trasplante hepático.
- Las dos recidivas estudiadas, presentaban 6 nódulos y un tumor único de 20 cm respectivamente, por lo que la multifocalidad y el gran tamaño del tumor sí que parecen tener un papel pronóstico.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Parkin, D.M., et al., Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005. 55(2):74-108.
2. Campillo A, Morandeira M^aJ, Sostres C, Lorente S, Garcia A, Serrano M^aT. Marcadores tisulares del proceso de angiogénesis y evolución del hepatocarcinoma después del trasplante hepático. Zaragoza. 2010.
3. Bilbao I, Lázaro J.L, Castells L, Charco R. Estado actual del hepatocarcinoma y perspectivas futuras. *Jano*. 2010.
4. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. 2006;295:65-73.
5. Pin N, Guerrero A, Delgado A. Hepatocarcinoma: estado actual. *Galicía Clin* 2014;75(4):171-181.
6. Maki A, Kono H, Gupta M, Asakawa M, Suzuki T, Matsuda M, et al. Predictive power of biomarkers of oxidative stress and inflammation in patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:1182-90.
7. Kumar V, Abbas BK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7^a ed. Madrid: Elsevier; 2005.
8. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: The effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*. 2002;155:323-31.
9. El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: A systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:369-80.
10. Luo JC, Hwang SJ, Wu JC, Lai CR, Li CP, Chang FY et al. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma patients with paraneoplastic syndromes. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1315-9.
11. Bruix J, Sherman M. AASLD practice guideline. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020-2.
12. Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut*. 2014;63:844-55.
13. Forner A, Ayuso C, Real MI, Sastre J, Robles R, Sangro B, Varela M, de la Mata M, Buti M, Martí-Bonmatí L, Bru C, Tabernero J, Llovet JM, Bruix J. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. *Med Clin (Barc)*. 2009;132(07):272-87
14. Wong SN, Reddy KR, Keeffe EB, Han SH, Gaglio PJ, Perrillo RP et al. Comparison of clinical outcomes in chronic hepatitis B liver transplant candidates with and without hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2007;13:334-42.
15. Vivarelli M, Cucchetti A, Piscaglia F, La Barba G, Bolondi L, Cavallari A, et al. Analysis of risk factors for tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Key role of immunosuppression. *Liver Transpl*. 2005;11:497-503.
16. Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press: Lyon 2000:159-172.
17. Nuñez Martínez O, et al. Papel de la ciclooxigenasa 2 en la patogenia de las enfermedades del hígado. *Med Clin (Barc)* 2003;121(19):743-8

18. Ota S, Bamba H, Kato A, Kawamoto C, Yoshida Y, Fujiwara K. Review article: COX-2, prostanoids and colon cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(Suppl 2):102-6.
19. Piazuolo E, Jimenez P, Lanás A. COX-2 inhibition in esophagitis, Barrett's esophagus and esophageal cancer. *Curr Pharm Des*, 2003. 9 (27): p.2267-80.
20. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner M, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000; 60:1306-11.
21. Bae SH, Jung ES, Park YM, Kim BS, Kim BK, Kim DG, et al. Expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Hepatocellular Carcinoma and Growth Inhibition of Hepatoma Cell Lines by a COX-2 Inhibitor, NS-398. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1410-1418.
22. Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2004;10:2323-6.
23. Tang, TC, et al. Tumor cyclooxygenase-2 levels correlate with tumor invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2005.11(13):1896-902.
24. Yang HJ, Jiang JH, Yang YT, Yang XD, Guo Z, Qi YP, et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with initiation of hepatocellular carcinoma, while prostaglandin receptor-1 expression predicts survival. *World J Gastroenterol*, 2016;22(39):8798–8805.
25. Chen G, Li X, Yang J, Li J, Wang X, He J, Huang Z. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 expression in patients with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Arch Med Sci*, 2016;12(5):1110-1117.
26. Cui J, et al. Effect of c-myc, Ki-67, MMP-2 and VEGF expression on prognosis of hepatocellular carcinoma patients undergoing tumor resection. *World J Gastroenterol*, 2004.10(10):1533-6.
27. Bay K, Cao Y, Huang Q, Jiang Y, Lv L. Prognostic value of Ki67 expression for patients with surgically resected hepatocellular carcinoma: Perspectives from a high incidence area. *Clin Lab*, 2017;63(2):355-364.
28. Mei-Hsuan L, Hwai-I Y, Yong Y, Gilbert LI, and Chien-Jen Ch. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, 2014;20(28):9270–9280.
29. Geramizadeh B, Nikeghbalian S, Shamsaifar A, Kazemi K, MalekHosseini SA. Hepatocellular Carcinoma in Two Patients with Autoimmune Hepatitis. A Single Center Experience and Review of the Literature. *Hepat Mon*, 2015; 15(4):e26459.
30. Wong RJ, Gish R, Frederick T, Bzowej N, Frenette C. Development of hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis patients: a case series. *Dig Dis Sci*, 2011;56(2):578-85.
31. Osorio FM, Vidigal PV, Ferrari TC, Lima AS, Lauer GM, Couto CA. Histologic Grade and Mitotic Index as Predictors of Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma. *Exp Clin Transplant*, 2015;13(5):421-5.
32. Lu SD, Wang YY, Peng NF, Peng YC, Zhong JH, Qin HG, Xiang BD, You XM, Ma L, Li LQ. Preoperative Ratio of Neutrophils to Lymphocytes Predicts Postresection Survival in Selected Patients With Early or Intermediate Stage Hepatocellular Carcinoma. *Medicine (Baltimore)*, 2016;95(5):e2722
33. Rodriguez-Perálvarez M, Luong TV, Andreana L, Meller T, Dhillon AP, Burroughs AK. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular

- carcinoma: diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol*, 2013;20(1):325-39.
34. Koga, H, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology*, 1999;29(3):688-96.
 35. Tang, TC, et al. Tumor cyclooxygenase-2 levels correlate with tumor invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2005;11(13):1896-902.
 36. Pazirandesh, S, et al. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma, cirrhosis and chronic hepatitis in the United States. *Dig Dis Sci*, 2007;52(1):220-7.

ANEXO 1

Tabla 1: Algoritmo diagnóstico y terapéutico de un nódulo hepático. (3)

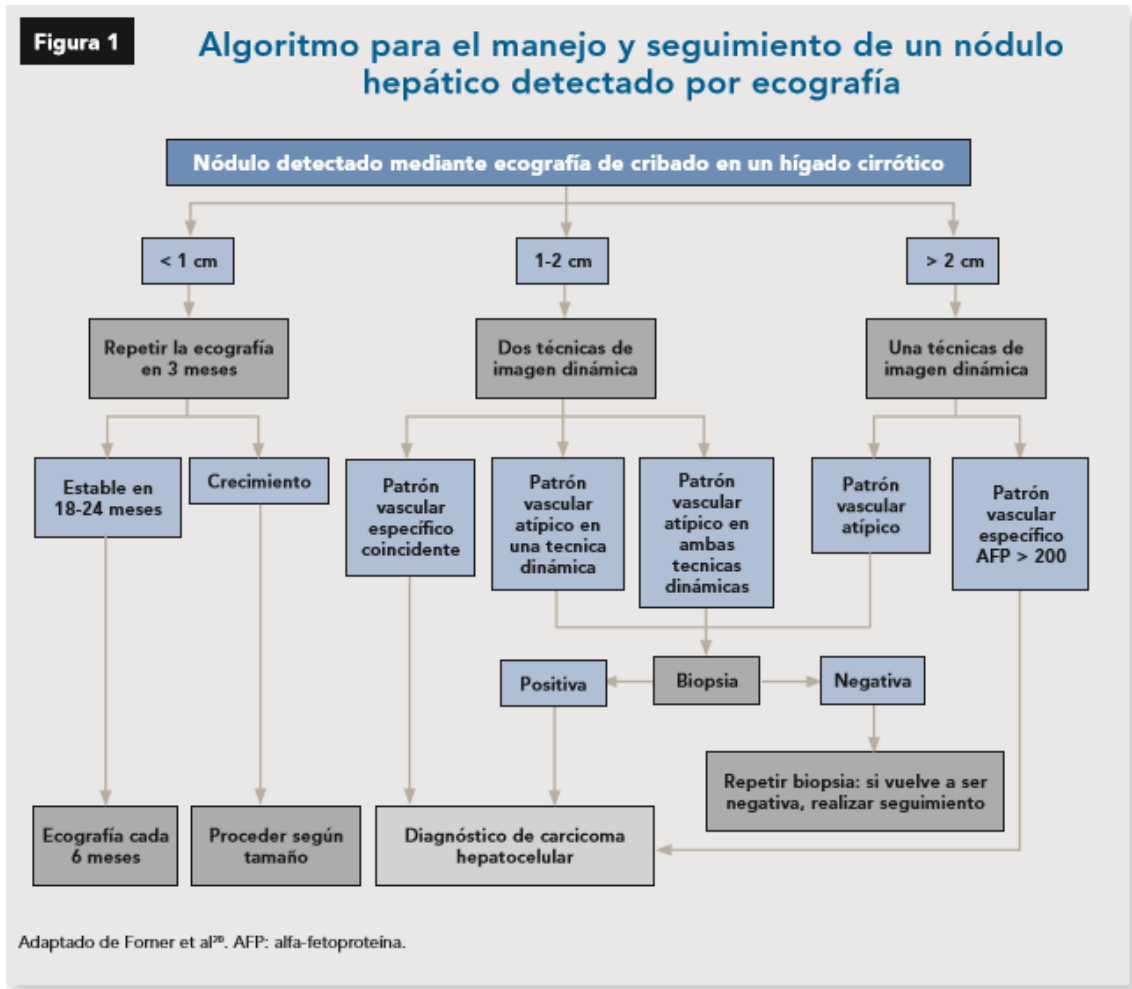


Tabla 2: TNM del hepatocarcinoma. (3)

Tabla 1 Clasificación TNM para el hepatocarcinoma según el American Joint Committee on Cancer**			
Estadificación TNM para el hepatocarcinoma			
Tumor primario (T)			
TX	Tumor primario que no puede ser verificado		
T0	Sin evidencia de tumor primario		
T1	Tumor solitario sin invasión vascular		
T2	Tumor solitario con invasión vascular, o tumores múltiples ninguno mayor de 5 cm		
T3	Tumores múltiples mayores de 5 cm o tumor que afecta a una rama mayor portal o de venas suprahepáticas		
T4	Tumores con invasión directa de órganos adyacentes, diferente a la vesícula biliar o invadiendo el peritoneo visceral		
Ganglios linfáticos regionales (N)			
NX	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser verificados		
N0	Sin metástasis a ganglios linfáticos regionales		
N1	Metástasis a ganglios linfáticos regionales		
Metástasis a distancia (M)			
MX	La metástasis a distancia no puede ser verificada		
M0	Sin metástasis a distancia		
M1	Metástasis a distancia		
Grado de fibrosis (F)*			
F0	Fibrosis grado 0-4 (fibrosis de nula a moderada)		
F1	Fibrosis grado 5-6 (fibrosis severa o cirrosis)		
Estadios			
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio IIIA	T3	N0	M0
Estadio IIIB	T4	N0	M0
Estadio IIIC	Cualquier T	N1	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

*El grado de fibrosis corresponde a la definición de Ishak²¹. El grado de fibrosis se considera en este esquema por su valor pronóstico en la supervivencia global, pero no se tiene en cuenta para la definición del estadio.
 **AJCC Cancer Staging Manual, 6th edition. New York: Springer-Verlag; 2002.

Tabla 3: Sistema de estadificación del BCLC (3).

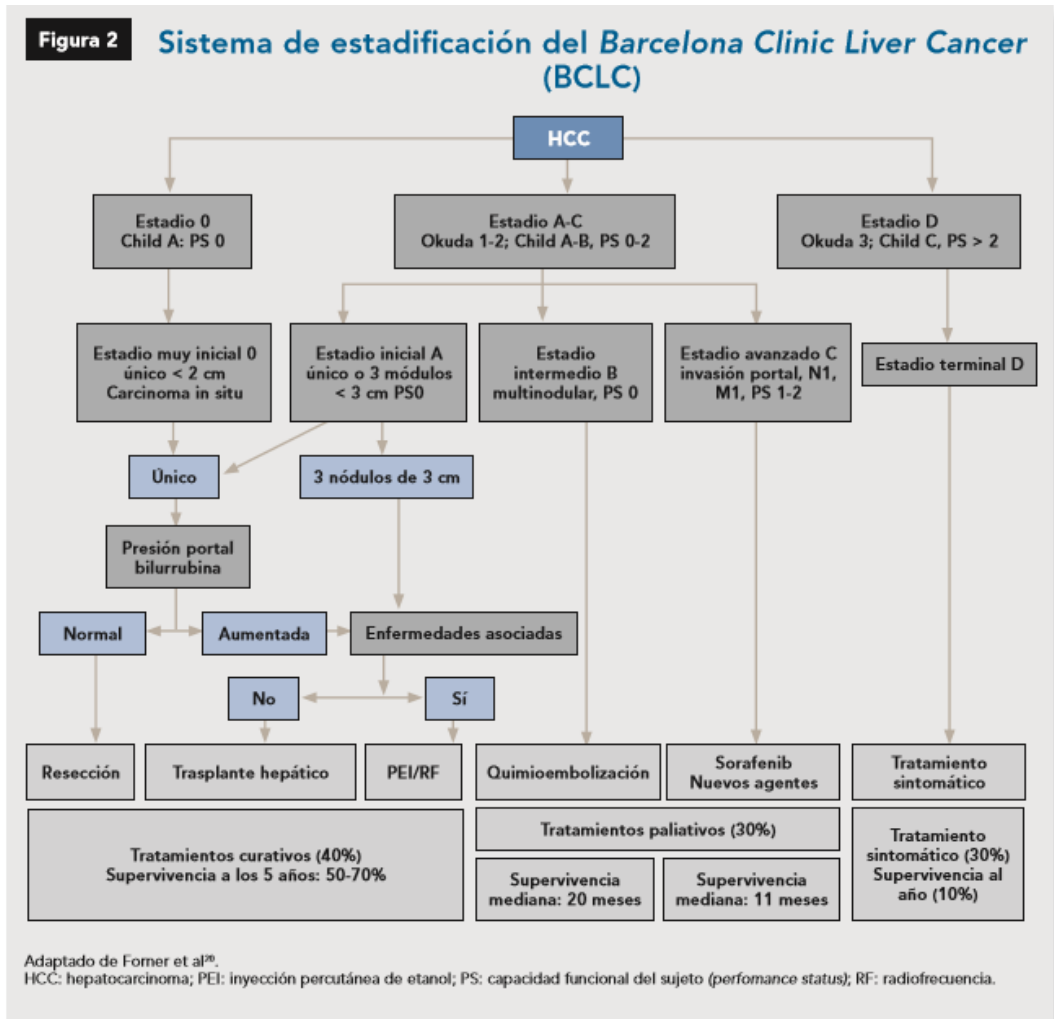


Tabla 4: Características anatomopatológicas de la muestra estudiada (20 pacientes).

Sexo	Edad	Etiología	Cirrosis	Grado	Nódulos	Necrosis	Invasión vascular	Cápsula	Inflamación	Fecha TX
V	58	Autoinmune (CBP)	Si	G1	6	No	No	No	Moderada	04/07/2001
V	63	Enólica	Si	G1	1(20cm)	Si	Si	Si	Leve	15/05/2000
M	50	No conocida	Si	G1	Multifocal	No	No	No	Moderada	15/09/2010
V	47	VHC	Si	G1	2	No	Si	No	Moderada	16/09/2010
V	64	Enólica	Si	G1	2	No	No	No	Leve	04/10/2010
V	50	VHC	Si	G1	Multifocal	Si	Si	No	Moderada	22/01/2011
V	61	VHC	Si	G1	2	No	No	No	Moderada	13/05/2011
V	62	VHC	Si	G2	6	No	Si	No	Moderada	03/09/2011
V	50	VHC	Si	G1	3	No	No	No	Leve	23/12/2011
V	65	No conocida	Si	G1	3	No	No	No	Leve	24/05/2012
V	50	Enólica	Si	G1	3	No	No	No	Moderada	31/01/2013
V	56	No conocida	Si	G1	Multifocal	No	No	No	Moderada	16/02/2013
V	64	No conocida	Si	G1	Multifocal	No	No	No	Moderada	26/03/2013
V	63	Enólica	Si	G2	4	No	No	No	Leve	06/06/2011
V	65	Enólica	Si	G2	7	No	No	No	Moderada	14/09/2012
V	54	VHC	Si	G1	1	No	No	No	Moderada	02/04/2013
V	44	VHC+ Alcohol	Si	G1	2	Si	No	No	Leve	26/02/2016
V	55	Enólica	Si	G2	1	No	No	No	Leve	24/12/2011
M	66	Autoinmune	Si	G1	1	Si	No	No	Leve	06/04/2012
V	51	VHC	Si	G1	1	No	No	No	Leve	27/09/2012

Recidiva del tumor tras el trasplante hepático.

No recidiva del tumor tras el trasplante hepático.

ANEXO 2

Imagen 1: Imagen macroscópica en fresco. Hepatectomía con cirrosis por VHC (superficie micronodular).



Imagen 2: Imagen macroscópica a la apertura de la cavidad abdominal durante una autopsia. Hígado con cirrosis (superficie hepática macro-micro nodular)



Imagen 3: Imagen macroscópica en fresco. Corte de hepatectomía con cirrosis (superficie macro-micro nodular) y nódulo correspondiente a hepatocarcinoma.



Imagen 4: HE. Imagen microscópica de hígado cirrótico, en la que se observan septos fibrosos dividiendo al parénquima en micronódulos.

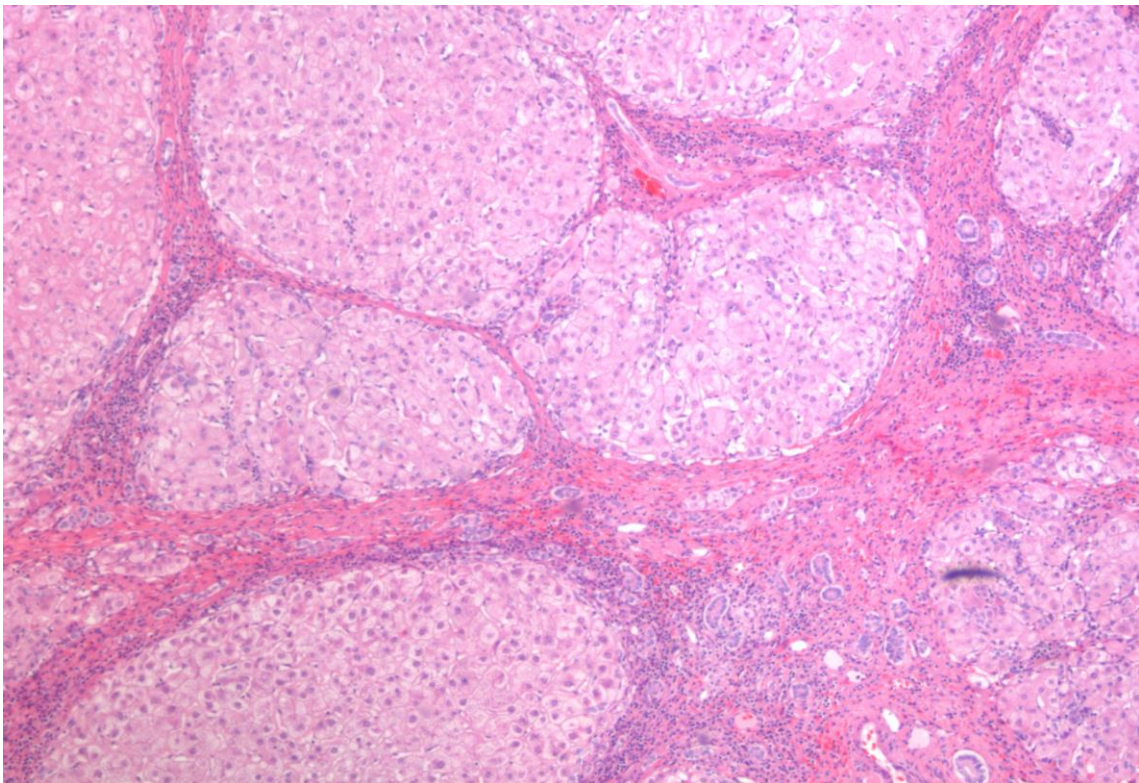


Imagen 5: Tricrómico de Masson. Imagen microscópica de infección por VHC, en la que se observa la fibrosis de color azul, dividiendo el parénquima en micronódulos.

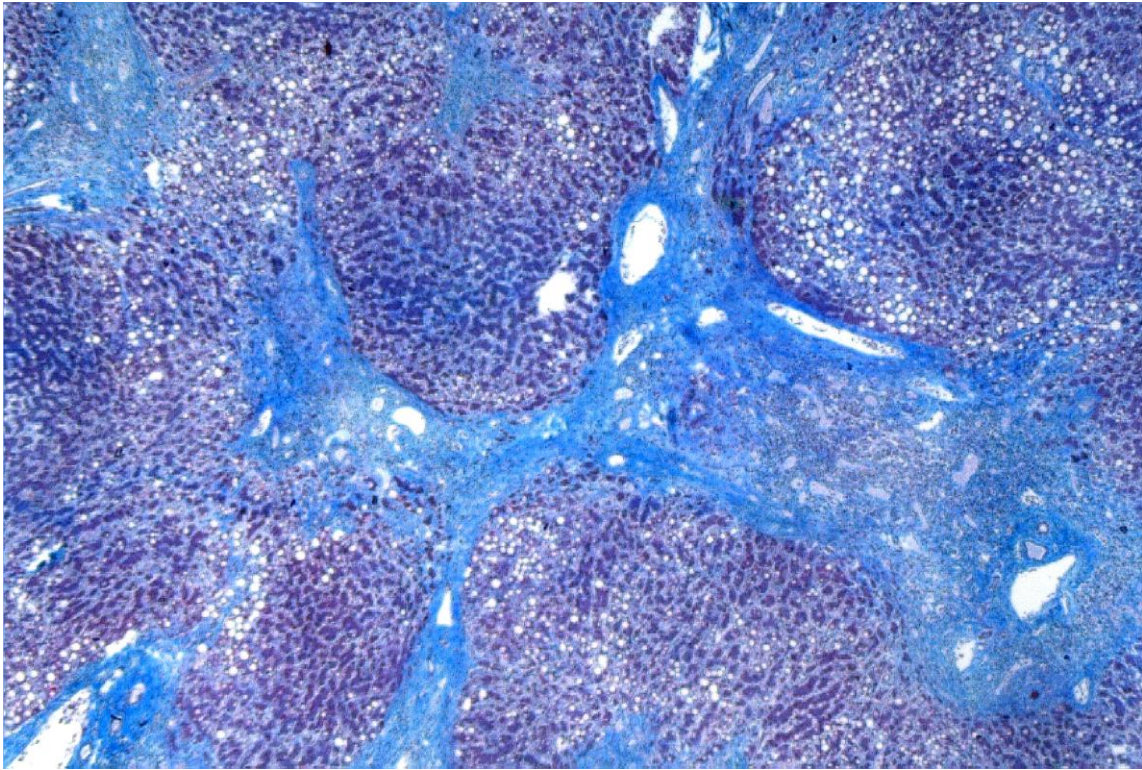


Imagen 6: Imagen macroscópica de hepatocarcinoma sobre hígado cirrótico.



Imagen 7: Imagen macroscópica de hepatocarcinoma sobre hígado cirrótico con superficie macro-micro nodular.



Imagen 8: HE. Imagen microscópica de hepatocarcinoma con patrón trabecular y zona de transición con tejido hepático sano.

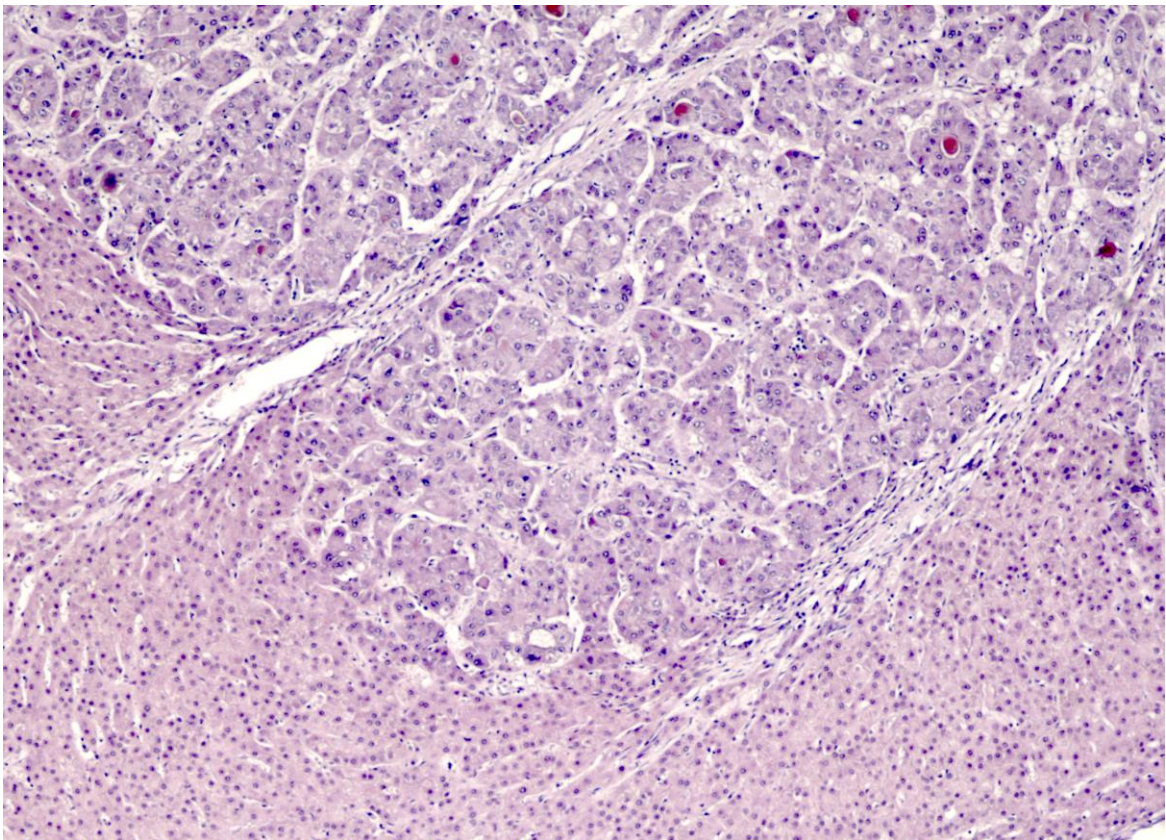


Imagen 9: HE. Imagen microscópica de hepatocarcinoma con patrón pseudoglandular.

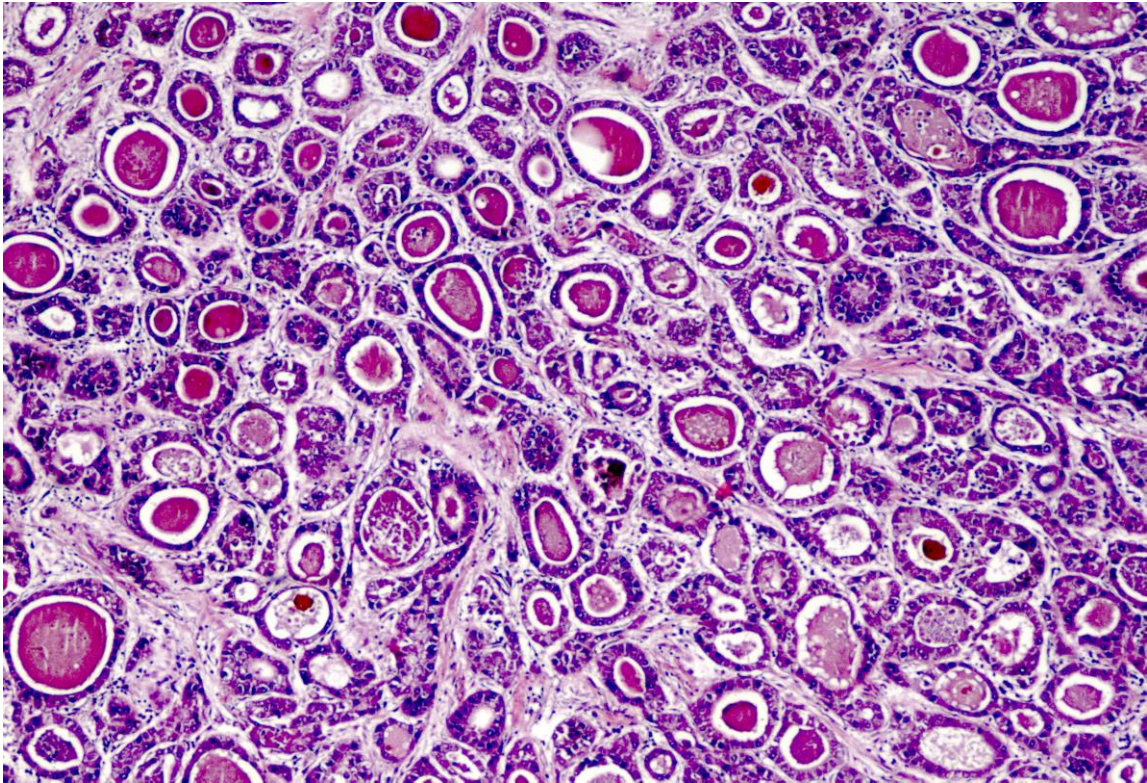


Imagen 10: HE. Imagen microscópica de hepatocarcinoma con variante citológica de células claras.

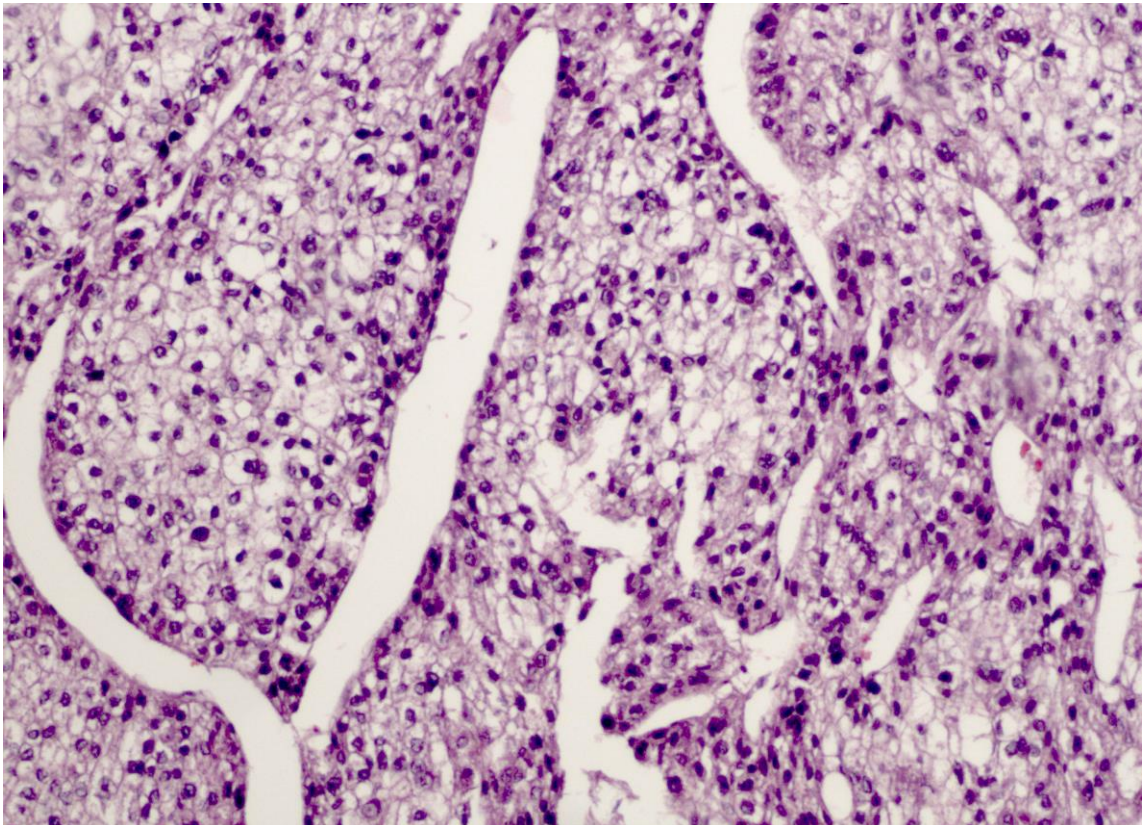


Imagen 11: HE. Imagen microscópica de necrosis tisular y oclusión vascular, tras tratamiento de un hepatocarcinoma con quimioembolización arterial.

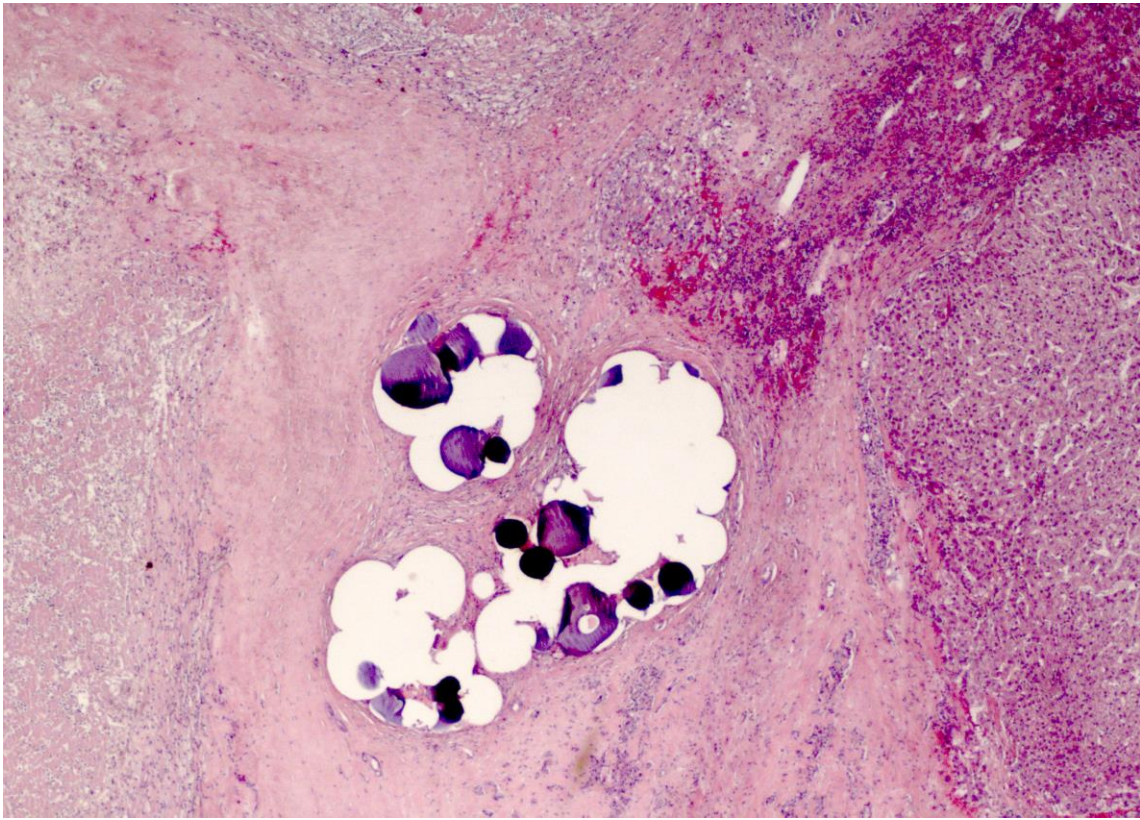


Imagen 12: HE. Imagen microscópica de necrosis tisular y oclusión vascular, tras tratamiento de un hepatocarcinoma con quimioembolización arterial.

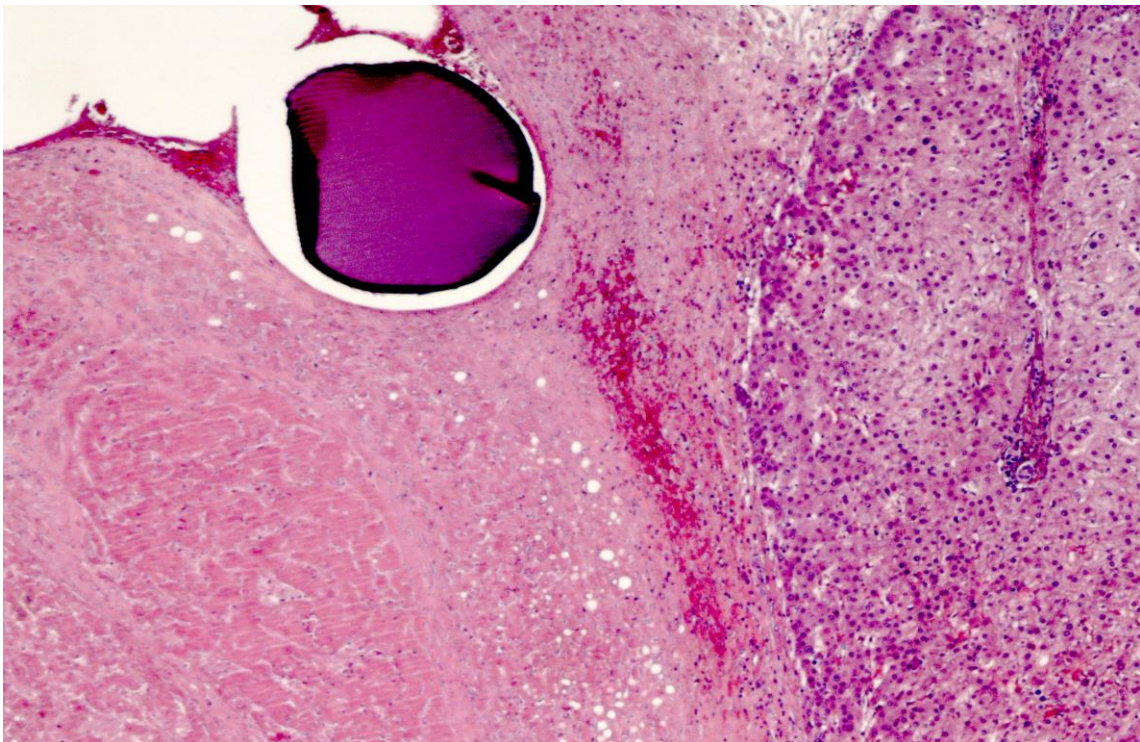


Imagen 13: Imagen macroscópica de un hepatocarcinoma fibrolamelar.



Imagen 14: HE. Imagen microscópica de hepatocarcinoma fibrolamelar.

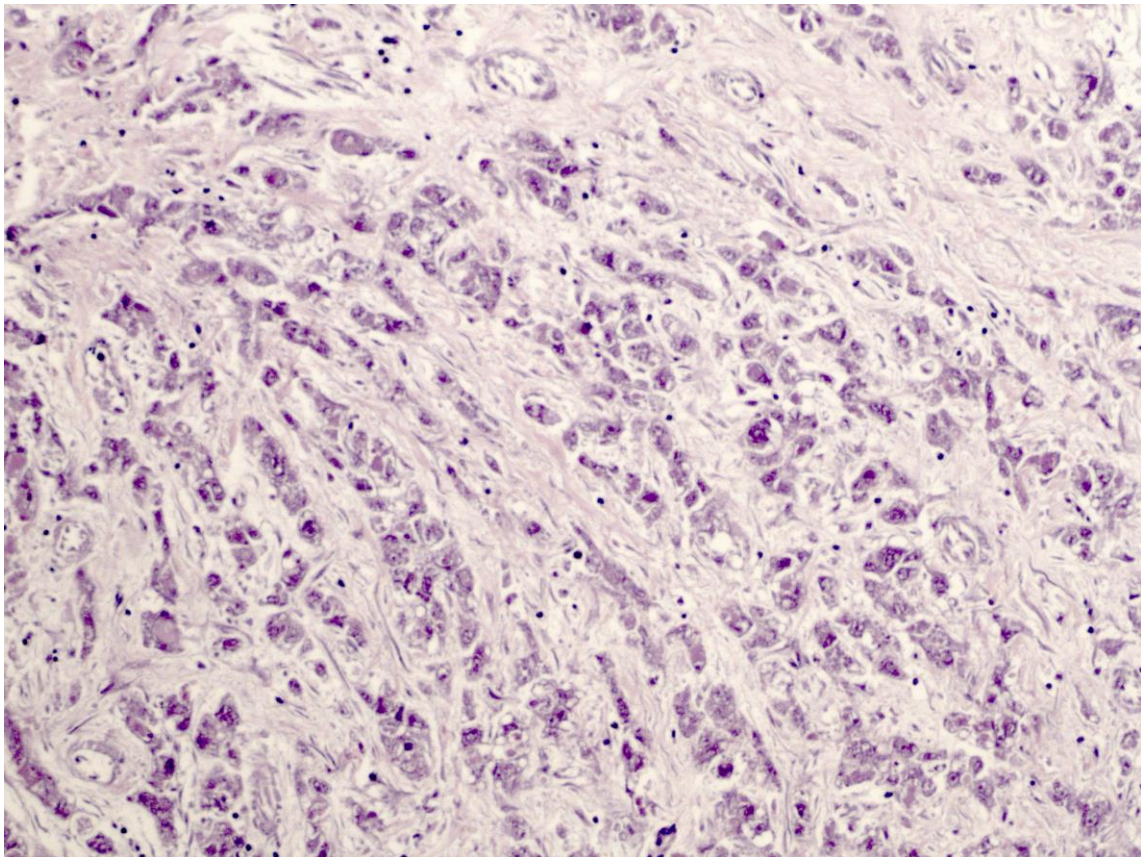


Imagen 15: HE. Imagen microscópica de atipia nuclear (flecha) en el contexto de un hepatocarcinoma.

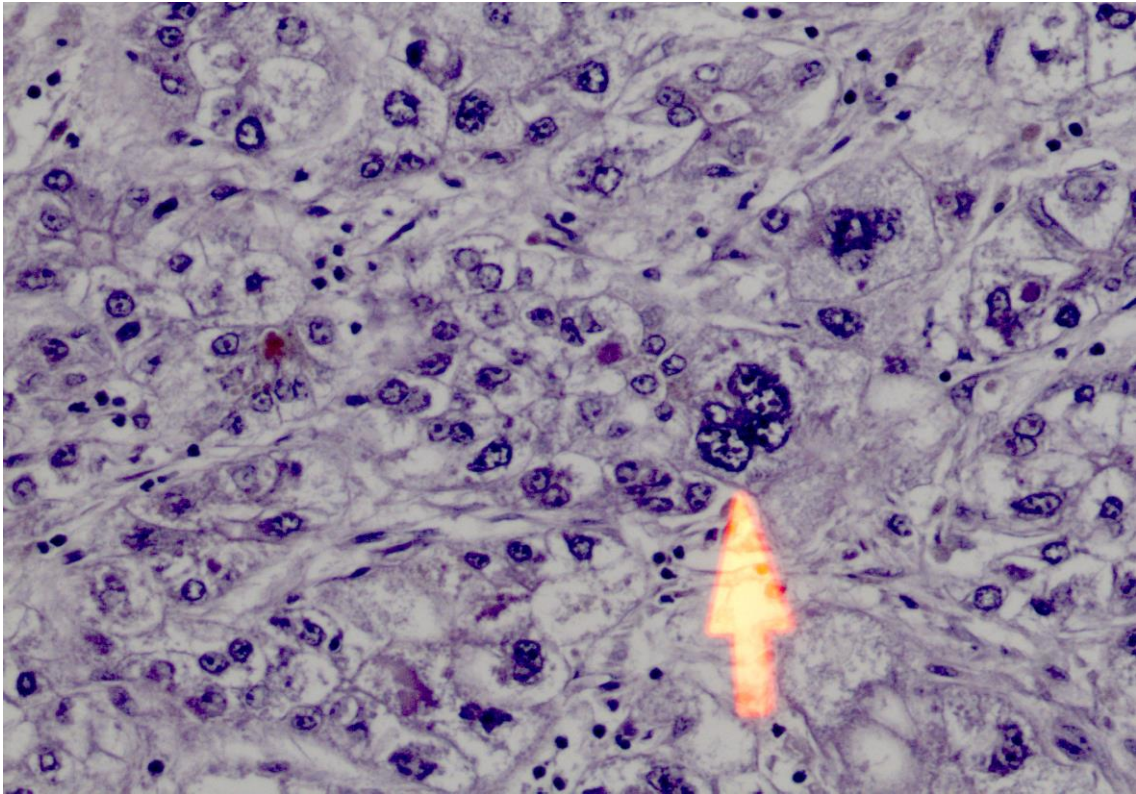
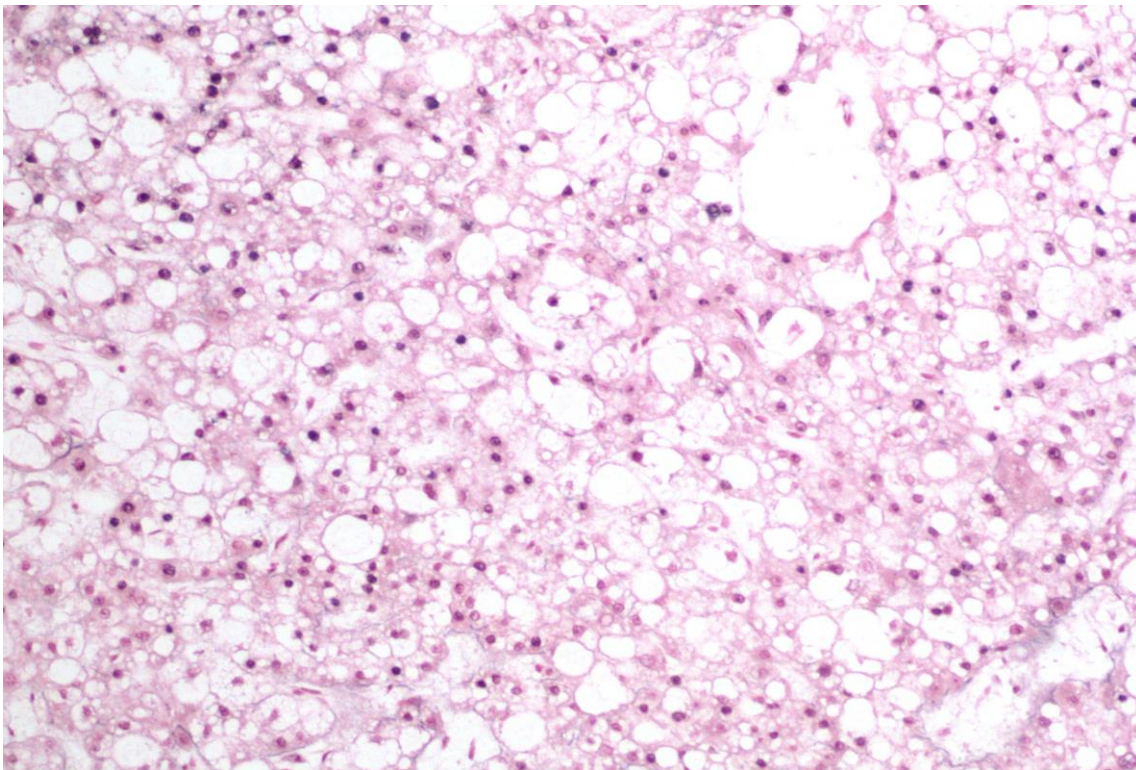


Imagen 16: Pérdida de la trama de reticulina en Hepatocarcinoma bien diferenciado.



**Fuente de las imágenes: Servicio de AP HCULB*