



Universidad
Zaragoza

VALORACIÓN DE LOS MARCADORES CD34 Y Ki67 EN EL HEPATOCARCINOMA

EVALUATION OF CD34 AND Ki67 MARKERS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Inés Falcón Lancina

Trabajo de fin de grado
Facultad de Medicina, Junio 2019

DIRECTORES:

Dra. Maria José Morandeira García
Dra. Maria Teresa Ramírez Gasca
Dr. Ariel G. Gonzales Sejas

SÍNTESIS

Introducción: Los tumores hepáticos primitivos malignos suponen una importante causa de muerte debida al cáncer. Cada vez existen más trabajos que tratan de definir el origen y evolución de estos tumores, a través de vías moleculares y diferentes marcadores. En este trabajo estudiaremos la relación entre la positividad de los marcadores CD34 y Ki67 en el hepatocarcinoma con la supervivencia y evolución del mismo.

Material y Métodos: Estudio retrospectivo sobre una serie de 50 pacientes diagnosticados de hepatocarcinoma durante un periodo de 18 años (1999 – 2017) en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, estudiando sus características clínicas e histopatológicas. Las variables principales de estudio son el índice de proliferación Ki-67, la densidad de microvasos con el marcador CD34 y la supervivencia. La expresividad de los marcadores se ha valorado con la escala semicuantitativa de Zhang. Se ha realizado un análisis descriptivo y analítico para determinar si existe relación entre las variables a estudio.

Resultados: Las 50 biopsias estudiadas son hepatocarcinomas que asientan en su totalidad sobre un hígado cirrótico y su causa principal es el virus de la hepatitis C. El 90% eran varones y el 81,2% tumores bien diferenciados (G1), no encontrando ningún tumor indiferenciado (G3) y la supervivencia media era de 8,45 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la expresión del CD34 tumoral y peritumoral con la supervivencia ni con la expresión de Ki67 tumoral con la supervivencia.

Conclusiones: El uso de los marcadores Ki67 y CD34 puede ser útil para el diagnóstico diferencial entre lesiones hepáticas benignas y tumores malignos pero en nuestro estudio no se han encontrado evidencias de que puedan servir como indicador pronóstico de en el hepatocarcinoma.

Palabras Clave: Carcinoma hepatocelular, CD34, Ki67, trasplante hepático.

ABSTRACT

Introduction: Malignant primitive liver tumors are an important cause of death due to cancer. Every time there are more works that try to define the origin and evolution of these tumors, through molecular pathways and different markers. In this paper we will study the relationship between the positivity of the CD34 and Ki67 markers in hepatocellular carcinoma with the survival and evolution of the same.

Materials and Methods: Retrospective study on a series of 50 patients diagnosed with hepatocellular carcinoma during a period of 18 years (1999 - 2017) at the Lozano Blesa University Clinical Hospital, studying their clinical and histopathological characteristics. The main variables of study are the proliferation index Ki-67, the density of microvessels with CD34 and survival. The expressiveness of the markers has been assessed with Zhang's semiquantitative scale. A descriptive and analytical analysis has been carried out to determine if there is a relationship between the variables under study.

Results: The 50 biopsies studied are hepatocellular carcinomas that settle completely on a cirrhotic liver and its main cause is the hepatitis C virus. 90% were male and 81.2% well differentiated tumors (G1), not finding any undifferentiated tumor (G3) and the mean survival was 8.45 years. No statistically significant differences were found between the expression of tumor and peritumoral CD34 with survival or with the expression of tumor Ki67 with survival.

Conclusions: The use of Ki67 and CD34 markers may be useful for the differential diagnosis between benign hepatic lesions and malignant tumors, but in our study there was no evidence that they could serve as a prognostic indicator in hepatocellular carcinoma.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, CD34, Ki67, liver transplant.

ÍNDICE

SÍNTESIS	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 ANATOMÍA HEPÁTICA.....	5
1.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	6
1.3 ESTUDIOS MOLECULARES EN LOS TUMORES MALIGNOS HEPÁTICOS:.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
3. HIPÓTESIS.....	14
4. MATERIAL MÉTODOS	15
4.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA:	15
4.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:	15
4.3 VARIABLES ESTUDIADAS Y PROCEDIMIENTO DE VALORACIÓN:.....	15
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1 RELACIÓN CD34 TUMORAL Y EL GRADO HISTOLÓGICO:	23
5.2 RELACIÓN VALOR CD34 PERITUMORAL Y EL GRADO HISTOLÓGICO:	24
5.3 RELACIÓN ENTRE LA SUPERVIVENCIA Y EL GRADO HISTOLÓGICO:	24
5.4 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN CD34 PERITUMORAL Y LA SUPERVIVENCIA:.....	25
5.5 RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN CD34 TUMORAL Y LA SUPERVIVENCIA:	26
5.6 RELACIÓN ENTRE EL VALOR DE KI67 Y EL GRADO HISTOLÓGICO:.....	27
5.7 RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE Ki67 TUMORAL Y LA SUPERVIVENCIA :	27
6. DISCUSIÓN.....	29
7. CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXO 1: TABLAS DE SUPERVIVENCIA.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 2: IMÁGENES.....	¡Error! Marcador no definido.

ABREVIATURAS

CHC: Carcinoma hepatocelular.

CCR: Carcinoma colorrectal

VHC: Virus de la hepatitis C.

VHB: Virus de la hepatitis B.

AFP: Alfafetoproteína.

TC: Tomografía computerizada.

RM: Resonancia magnética.

TACE: Quimioembolización transarterial.

HCULB: Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

IHQ: Inmunohistoquímica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANATOMÍA HEPÁTICA

El hígado es un órgano fundamental en el mantenimiento de la homeostasis metabólica del organismo y puede desarrollar numerosas patologías que hagan peligrar tanto la salud como la vida del paciente.¹

1.1.1) ORGANIZACIÓN MACROSCÓPICA

El hígado es el órgano parenquimatoso más voluminoso del organismo. Está constituido por dos lóbulos, derecho e izquierdo, divididos por el ligamento falciforme. Desde un punto de vista embriológico, el hígado deriva de la yema endodérmica del intestino anterior.²

Su color es pardo y su peso normal oscila entre los 1400 y los 1600g. El hígado recibe una oxigenación doble, la arteria hepática y la vena Porta. La arteria hepática aporta el 30-40% de la sangre al parénquima hepático mientras que la vena porta suministra el 60-70% del total. La sangre del hígado drena a la vena cava inferior a través de las venas suprahepáticas. La bilis formada en el hígado, drena por los canalículos de los lobulillos que se van ramificando y aumentando su calibre y se fusionan en los conductos hepáticos derecho e izquierdo, que se unen en el hilio formando el conducto colédoco.²

1.1.2) ORGANIZACIÓN MICROSCÓPICA

El hígado se divide desde un punto de vista funcional en lobulillos de forma hexagonal, cuya parte central la ocupan las venas hepáticas terminales o venas centrolobulillares que proceden de la vena suprahepática, y en la periferia de los lobulillos se encuentran los espacios porta. Cada uno de los espacios porta contiene una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta, un conductillo biliar y un capilar linfático. Los cordones hepáticos se disponen desde la vena centrolobulillar, formando hileras únicas de un hepatocito de grosor a ambos lados del canalículo biliar que fluye hasta el espacio porta.¹⁻³

El lobulillo presenta tres zonas, definidas por su relación con la triada portal:

- Zona 1: Es periportal y recibe la sangre más oxigenada puesto que es la zona más cercana al aporte vascular.
- Zona 2: Corresponde a la zona central del lobulillo hepático.
- Zona 3: Es centrolobulillar y es la que peor vascularización recibe, por encontrarse al lado de la vena hepática terminal.

1.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR

1.2.1) EPIDEMIOLOGÍA

Según la OMS el cáncer de hígado supone la sexta neoplasia más frecuente (incidencia 841.000 nuevos casos en 2018) y la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo (781.631 muertes en 2018) tras el cáncer de pulmón, el carcinoma colorrectal (CCR) y el cáncer de estómago.⁴

Los varones presentan mayor riesgo que las mujeres de padecer dicho tumor.⁵ El patrón de distribución mundial del CHC tiene importantes variaciones geográficas. Las incidencias más altas de CHC se encuentran en África Subsahariana y en el Sudeste Asiático, con cifras mayores a 15 casos/ 100.000 habitantes/año, donde la prevalencia de infección por el Virus de la Hepatitis B (VHB) es muy alta.⁶ El norte de Europa y en América presenta una incidencia más baja, con unos 5 casos/100.000 habitantes/año. España, y en general el sur de Europa presentan unas incidencias medias, con 5-10 casos/100.000 habitantes/año donde los factores más relacionados con el CHC son el virus de la Hepatitis C (VHC) y el alcoholismo.^{6,7}

1.2.2) FACTORES DE RIESGO:

Los principales factores de riesgo para el CHC son los virus hepatotropos (VHC y VHB), la enfermedad hepática alcohólica y la esteatosis hepática no alcohólica.⁷ La mayoría de los factores de riesgo para el CHC actúan como carcinógenos de forma indirecta, mediante la provocación de una cirrosis hepática (fibrosis y nódulos de regeneración), que aumenta el riesgo de aparición de un CHC 3-7% al año. De presentar solo fibrosis, el riesgo aumenta en un 1% al año.^{1, 5-7}

Se ha estudiado cómo la integración del ADN del VHB induce la inestabilidad genética y la mutagénesis de varios genes relacionados con el cáncer. La proteína HBx presente en el VHB estimula la expresión y la replicación de los genes del virus y algunas vías del ciclo celular, importantes para la supervivencia y crecimiento de los hepatocitos. El papel concreto del VHC en el desarrollo del CHC sigue siendo desconocido, pero se está investigando el poder oncogénico de algunas proteínas, como la proteína central del VHC.^{7,8}

También se han asociado sustancias asociadas al desarrollo de CHC como el Thorotrast, un contraste radiológico de dióxido de torio que provoca la aparición de CHC con una latencia de 20 años, o la aflatoxina B1 que induce mutaciones en el p53 y actúa sinérgicamente con el VHB potenciando la carcinogénesis.⁷

Varios trastornos metabólicos también pueden ser factores de riesgo, como son la hemocromatosis hereditaria, el déficit de alfa 1 antitripsina, la enfermedad de Wilson o las glucogenosis (especialmente la tipo Ia), la tirosinemia hereditaria y la porfiria cutánea parda.⁷ Más recientemente, se ha observado que hay factores como la diabetes mellitus, la obesidad o

el síndrome metabólico, que se relacionan con un incremento de muerte relacionada con este tumor.⁶

1.2.3) PREVENCIÓN:

La vacunación frente al VHB es la medida más eficaz de evitar el desarrollo del CHC. Los pacientes infectados con VHB o VHC se tratan con los fármacos antivirales pertinentes previniéndose así la evolución a cirrosis. También es importante el cese de contacto con los factores de riesgo como el consumo de alcohol, exposición a aflatoxinas etc.⁶

1.2.4) CRIBADO:

Existe indicación de cribado de CHC mediante ecografías seriadas cada 6 meses a todo paciente cirrótico (excepto pacientes en estadio Child-C que no sean candidatos a trasplante hepático).⁶

1.2.5) TIPOS DE CHC ^{5,9, 10}.

1.2.5.1) CLASIFICACIÓN MACROSCÓPICA:

- *CHC pequeño*: menos de 2 cm de diámetro
- *Masivo*: Una única masa que compromete un lóbulo completo. Puede haber zonas con hemorragia o necrosis.
- *Nodular*: Masa única, multinodular.
- *Infiltrante difuso*: Múltiples nódulos que asemejan una cirrosis
- *Infiltrativo*: Pobrementemente demarcado, no encapsulado.

1.2.5.2) CLASIFICACIÓN MICROSCÓPICA:

La atipia celular depende del grado histológico del tumor. Las células tumorales se disponen en trabéculas o hileras de más de dos células, los núcleos cambian de tamaño y de forma y hay un aumento en la relación núcleo-citoplasma con un nucléolo prominente y citoplasma eoisinófilo.¹⁰

- *Trabecular*: Es el patrón más frecuente. Cordones gruesos de células tumorales rodeados por células sinusoidales capilarizadas.
- *Acinar/pseudoglandular*: Los hepatocitos tumorales forman estructuras glandulares.

- *Sólido o compacto*: Crecimiento trabecular muy denso que comprime los sinusoides. Se asemeja a tumores sólidos metastásicos.

1.2.5.3. VARIANTES DE CHC:

Existen variantes morfológicas del CHC como son el carcinoma escirroso que contiene gran cantidad de estroma fibrosos, el CHC sarcomatoide, CHC de células claras que se caracteriza por su citoplasma grande lleno de colágeno, el inflamatorio, linfoepitelioma “*like*” o medular.¹⁰

El CHC fibrolamelar es una variante que constituye el 5% de los hepatocarcinomas. Predomina en adultos jóvenes y no existe diferencia entre sexos. Se caracteriza por aparecer sobre un hígado sano, sin patología previa ni cirrosis. Se presenta como una masa única y grande, en general con una cicatriz fibrosa central. Presenta dos marcadores específicos: la nurotensina y la proteína anormal de unión a la vitamina B12. Es el de mejor pronóstico de todos los CHC.^{1,5,9}

1.2.6) DISEMINACIÓN:

El CHC puede extenderse en el propio hígado mediante nódulos satélites. Es característica la diseminación por vía venosa-portal.¹ El CHC metastatiza mayor frecuencia en pulmón, seguido de los nódulos linfáticos y el hueso⁷. Es más común la diseminación metastásica en aquellos tumores que no asientan sobre cirrosis previa. El cerebro, las suprarrenales y cabeza y cuello son localizaciones menos frecuentes.⁷ Las metástasis en el ovario, deben distinguirse de los tumores hepatoides primarios del ovario¹¹.

1.2.7) CLÍNICA:

En nuestro medio, el CHC se presenta generalmente con síntomas inespecíficos como anorexia, malestar, o dolor abdominal, además de ascitis y hepatomegalia en fases avanzadas. La ictericia obstructiva puede deberse a la invasión tumoral en el conducto biliar común. Se ha asociado con numerosas manifestaciones sistémicas como hipoglucemia, hipercolesterolemia, eritrocitosis, hipercalcemia, síndrome carcinoide, producción ectópica de gonadotropina coriónica y prostaglandinas, disfibrinogenemia y varias otras. En algunos casos, una fractura patológica puede ser el primer signo de enfermedad.⁷

1.2.8) DIAGNÓSTICO:

En el caso de que en el programa de cribado se encuentre un nódulo hepático, se seguirá el protocolo diagnóstico del CHC (figura1). Si el nódulo es menor de 1cm se realizarán vigilancia periódica cada 4 meses mediante ecografías. Si el nódulo es mayor de 1cm se realiza una prueba de imagen con contraste (TC o RM) que es diagnóstica si muestra hipercaptación del contraste en fase arterial y lavado precoz en fase venosa. Si la prueba de imagen no es

diagnóstica, se repite una segunda prueba de imagen. Si persisten dudas se realiza una biopsia hepática que es la prueba diagnóstica de mayor certeza.⁵

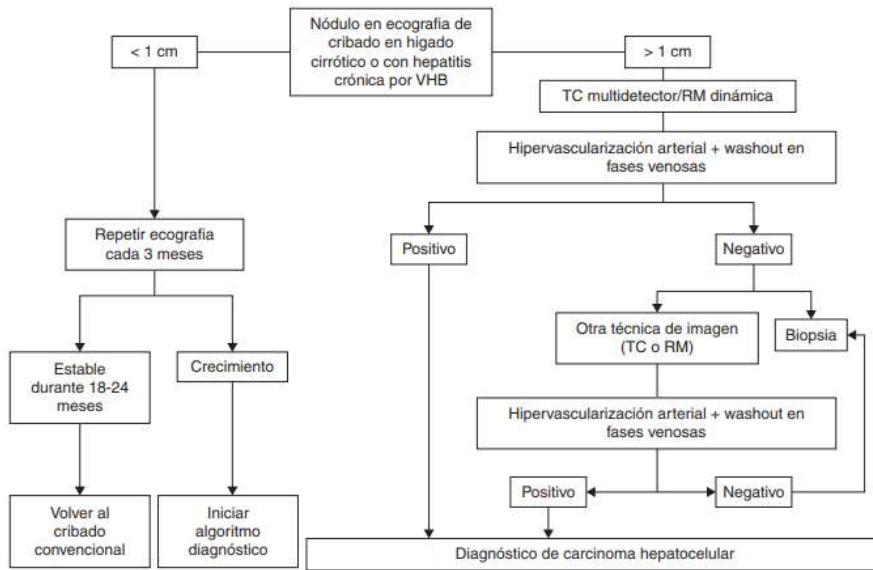


Figura 1: Algoritmo diagnóstico CHC.

1.2.9) PRONÓSTICO:

Para el pronóstico del CHC se utiliza principalmente la clasificación de Barcelona-Clinic- Liver-Cancer (BCLC) que relaciona la estadificación y el tratamiento. (Figura 2). También es un importante factor pronóstico la escala ECOG que objetiva la calidad de vida del paciente.⁶

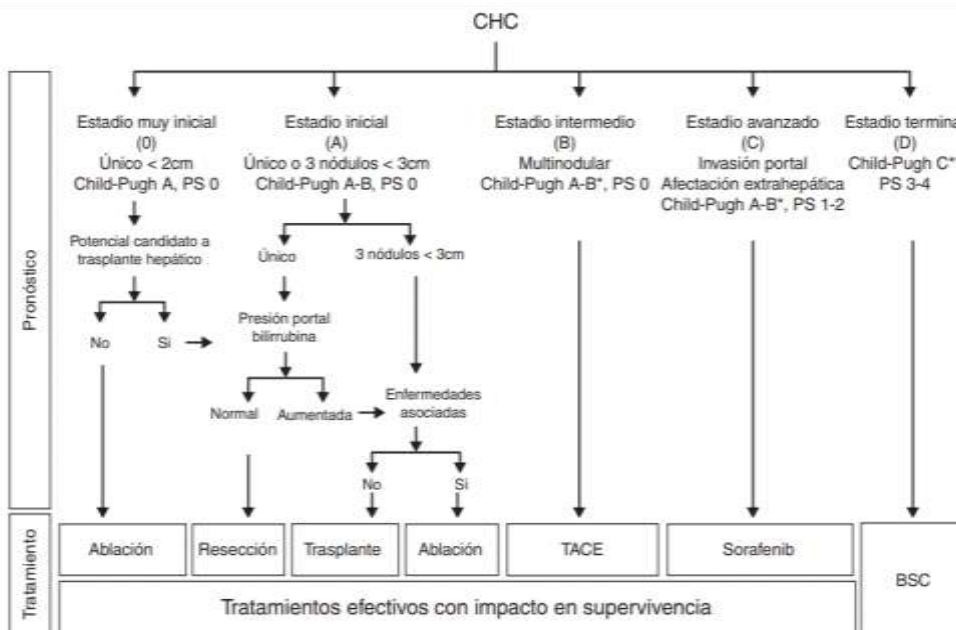


Figura 2: Estadificación y Pronóstico de Barcelona Clinic Liver Cancer

1.2.10) TRATAMIENTO ^{6,12}

Tratamientos quirúrgicos:

- **Resección quirúrgica:** Es el tratamiento de primera elección para los pacientes sin cirrosis que presentan un nódulo único con una buena función hepática y sin evidencias radiológica de invasión vascular. Si existe cirrosis, debe estar compensada pero existe un mayor riesgo de desarrollar un nuevo tumor tras la resección puesto que persiste la cirrosis de base y pueden aparecer nuevos CHC.
- **Trasplante hepático:** Es la mejor opción curativa para los pacientes que presentan cirrosis descompensada y CHC que cumpla criterios de Milán (tumores únicos menores de 5 cm o con un máximo de 3 nódulos menores de 3 cm, sin invasión vascular ni diseminación extrahepática).

Tratamientos no quirúrgicos:

- **Ablación percutánea:** La técnica de ablación percutánea incluye la radiofrecuencia y la inyección percutánea de etanol y constituye el tratamiento estándar en los pacientes con hepatocarcinoma en estadio 0 o A que no son candidatos a cirugía. Se prefiere la radiofrecuencia a la inyección de etanol puesto que se realiza una única sesión y se puede hacer durante una intervención quirúrgica o guiada con ecografía. Actúa produciendo una necrosis coagulativa del tumor. La ablación completa en tumores menores de 3cm es posible en más del 90% de los casos.
- **Quimioembolización Transarterial (TACE):** Consiste en la embolización de la rama nutricia del tumor procedente de la arteria hepática, para reducir el flujo de sangre arterial lo cual consigue la hipoxia tumoral y la necrosis del tumor. Además, se pueden administrar partículas de agentes quimioterápicos. Está indicado cuando existe un CHC multinodular sin invasión vascular, sin clínica asociada al cáncer y con la función hepática conservada.
- **Radioterapia Transarterial:** Consiste en introducir mediante un catéter dirigido microesferas con radioisótopo en la proximidades del tumor. Estas microesferas de itrio-90 (Y-90) emiten pequeñas cantidades de radiación al tumor. A diferencia de la TACE, donde supone una contraindicación, la radioterapia transarterial puede ser utilizada en caso de trombosis neoplásica de la vena Porta.¹²

Tratamientos sistémicos:

- **Sorafenib :** Tratamiento sistémico utilizado en CHC avanzado. Su actuación se lleva a cabo por bloqueo de distintas vías de señalización que están relacionadas con la hepatocarcinogénesis. Sobre todo lo hace en la vía RAF/MEK/ERK inhibiendo la Raf cinasa y

diferentes tirosin-cinasas (VEGFR2, PDGFR, receptores c-Kit). Sus principales acciones son reducir la angiogénesis y enlentecer la proliferación celular.

- Regorafenib: Para los pacientes que pierden la respuesta a Sorafenib se dispone actualmente de Regorafenib. El tratamiento con este fármaco es una opción para pacientes con CHC cuya enfermedad progresa durante el tratamiento con Sorafenib.¹²
- Actualmente se está estudiando un nuevo fármaco para el CHC, Palbociclib, como tratamiento de segunda línea en pacientes no respondedores a Sorafenib. Su mecanismo de acción es la inhibición selectiva de la cinasas dependientes de ciclina (CDK) 4 y 6 para conseguir la detención del ciclo celular.¹²

1.3 ESTUDIOS MOLECULARES EN LOS TUMORES MALIGNOS

HEPÁTICOS:

Los estudios de inmunohistoquímica son especialmente útiles en el diagnóstico diferencial entre carcinoma hepatocelular vs adenoma bien diferenciado o entre el hepatocarcinoma vs los tumores metastásicos. Existen numerosos marcadores que pueden ser útiles en casos de difícil interpretación para el diagnóstico de CHC como el antígeno carcinoembrionario policlonal (pCEA), el Hep-Par 1, la proteína HSP70, el glipican-3 (GPC-3), la glutaminasa-sintetasa (GS) o la arginasa-1 (Arg-1) (tabla 1).⁹

TUMOR	HEPATOCAARCINOMA	ADENOMA HEPATOCELULAR	CARCINOMA METASTÁSICO
MARCADORES POSITIVOS	HEPAR-1 CD10 pCEA (canalicular) TTF-1(citoplasmático) Glipican-3 CD34	HEPAR-1 CD10 pCEA (canalicular) TTF-1(citoplasmático)	Según origen (CK7, CK19, CK20) pCEA y mCEA (membranoso y canalicular) EMA, Ber-EP4 MOC31 Cromogranina Sinaptofisina
MARCADORES NEGATIVOS	CK20 TTF-1(nuclear) CDX2 PSA, Receptores hormonales	CK7, CK19, CK20 mCEA, TTF1(nuclear) CDX2, CD34 PSA, Receptores hormonales	

Tabla1: Perfil inmunohistoquímico de las principales lesiones hepáticas¹³

CD34:

El CD34 es una glucoproteína transmembrana que pertenece a la familia sialomucina de las moléculas de superficie. Se expresa selectivamente en células madre precursoras de la hematopoyésis, células endoteliales, fibroblastos embrionarios y células tumorales de origen endotelial.¹⁴

Las células endoteliales hepáticas tienen numerosas fenestras y carecen de membrana basal. La hepatopatía crónica produce una angiogénesis intrahepática y un remodelado sinusoidal caracterizado por la pérdida de las fenestras, la formación de una membrana basal y por la expresión de CD34. Este proceso se llama "Capilarización sinusoidal".¹⁵

El CD34 es uno de los marcadores inmunohistoquímicos más útiles en la distinción entre lesiones hepatocelulares malignas y benignas. En endotelio sinusoidal hepático no expresa este marcador. Sin embargo en el CHC, los capilares anormales expresan el marcador CD34 de forma intensa por todo el parénquima hepático.¹⁶ Los nódulos displásicos de bajo grado y los nódulos cirróticos regenerativos, en cambio, pueden mostrar cierta tinción de CD34 cerca de los septos fibrosos, en la periferia y en las áreas periportales.^{12,16,17} Es por ello que se considera que el CD34 es el marcador más sensible para evaluar la densidad de los microvasos que en su asociación con la inmunotinción puede constituir una distinción fiable entre CHC y enfermedades hepáticas no neoplásicas.¹⁷

En la neoangiogénesis del CHC, se produce un cambio en el aporte vascular, disminuyendo el flujo venoso portal y siendo irrigado el tumor en su totalidad por el flujo arterial. Este cambio en el suministro vascular, produce un aumento de flujo y presiones que pueden ser responsables de la capilarización sinusoidal y la expresión de CD34 en las células sinusoidales hepáticas.¹⁸ También puede ser la base biológica del diagnóstico radiológico mediante el TC con contraste, en el que se ve la imagen típica de hipercaptación tumoral en fase arterial sobre un fondo de parénquima hepático sin contraste y una imagen de lavado rápido en fase venosa. En el artículo realizado por Wei Xiong, Gregory Cheeney et al. pretendieron determinar si existía relación entre una mayor positividad en la expresión de CD34 en el tejido tumoral (aumento en la densidad de microvasos) y una mayor tasa de detección de CHC en el TC. En dicho estudio concluyeron que aquellos CHC que no eran detectados con técnicas de imagen correspondían a tumores pequeños (< 2cm), bien diferenciados, con menor expresión de CD34 y una menor densidad de microvasos.¹⁸

Por otra parte, en otro estudio realizado por Naoko Tsuji determinaron que la expresión de CD34 en los capilares y sinusoides del tejido hepático no canceroso es un factor de riesgo para la recurrencia multicéntrica de CHC y concluyen que la evaluación histológica del tejido hepático con inmunohistoquímica CD34 podría ser útil para la evaluación pronóstica de pacientes con CHC después de la cirugía.¹⁵

Ki67:

El Ki67 es una proteína codificada en el gen MKI67 que puede detectarse dentro del núcleo celular. Está presente en las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero está ausente en las fases de reposo (G0), es por ello que es un buen marcador de proliferación celular tanto en tejidos normales como en neoplásicos¹⁹⁻²¹. El Ki67 fue descubierto en la década 1980 por un grupo de investigadores alemanes y lo llamaron Ki por la Universidad de Kiel, Alemania y 67 en relación al número del clon.^{21, 22} Es conocida la relación pronóstica entre el Ki67 y los distintos tumores como el cáncer de mama, cáncer de laringe, adenomas hipofisarios, linfomas, carcinoma ovario, carcinoma adrenocortical etc.^{19,20}

Los resultados del metaanálisis de 54 estudios con un total de 4.996 pacientes con CHC revelaron que un nivel alto de ki67 se asocia significativamente con un estadio de CHC avanzado, tumores grandes e indiferenciados, con un mayor número de ganglios tumorales afectados, con metástasis, invasión venosa y el nivel de alfa-proteína. El artículo concluye que la alta expresión de Ki67 puede ser un factor pronóstico desfavorable para aquellos pacientes con CHC puesto que está asociado a un grado tumoral más alto y a una recurrencia más temprana de la enfermedad. En cambio este metaanálisis identificó que no existían evidencias estadísticamente significativas entre los pacientes sometidos a trasplante y la supervivencia tras el trasplante o el tiempo libre de enfermedad.²³

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es comprobar si existe relación entre los marcadores CD34 y Ki67 y la supervivencia y el grado histológico en el tumor hepático primitivo. Además, queremos estudiar:

- Si existe relación entre la positividad del CD34 en tejido tumoral y el grado histológico del tumor
- Si existe relación entre la positividad del CD34 en el tejido peritumoral y el grado histológico
- Si existe relación entre la mortalidad y el grado histológico
- Si existe relación entre la positividad del CD34 en el tejido peritumoral y la mortalidad
- Si existe relación entre la positividad del CD34 en el tejido tumoral y la mortalidad
- Si existe relación entre la positividad del Ki67 y el grado histológico
- Si existe relación entre la positividad del Ki67 y la mortalidad.

3. HIPÓTESIS

Según la literatura encontrada, prevemos encontrar una mayor agresividad y una mayor recurrencia en los tumores primarios hepáticos que presenten una mayor expresividad en los marcadores Ki67 y CD34.

4. MATERIAL MÉTODOS

4.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA:

Se ha llevado a cabo un análisis retrospectivo donde se han estudiado las muestras de los pacientes con CHC trasplantados durante el periodo comprendido desde el 24 de Mayo de 1999 hasta el 11 de Diciembre de 2017 que se encuentran almacenadas en el archivo del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

Se ha realizado un análisis básico para determinar su idoneidad para alcanzar los objetivos del estudio, siendo los criterios de inclusión de nuestro trabajo que las muestras procedan de pacientes mayores de 18 años, diagnosticados de hepatocarcinoma y que hayan sido trasplantados en el HCULB entre los años indicados.

4.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

Se procedió a observar las muestras de los pacientes incluidos bajo tinción de hematoxilina-eosina al microscopio óptico a 40x aumentos, identificando cortes en los que exista tumor y tejido adyacente no tumoral.

En las posiciones identificadas mediante hematoxilina eosina, se realizaron cortes de 3 micras y posteriormente fueron teñidas con los marcadores inmunohistoquímicos CD34 y Ki67. Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron utilizando el método del complejo de estreptavidina-biotina, con un sistema de tinción automatizado. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-CD34 (clon QBEnd-10, 1: 200; Dako) y anti-Ki67 (clon MIB-1, 1: 200; Dako)

Los portas de las biopsias obtenidos, fueron escaneadas mediante el programa Aperio Scan Scope (Leica Byosystems, Wetzlar Alemania) y posteriormente descargadas para su posterior recuento manual de las imágenes.

4.3 VARIABLES ESTUDIADAS Y PROCEDIMIENTO DE VALORACIÓN:

Se extraen a partir de la historia clínica de los pacientes y del programa Patwin, las variables demográficas: sexo y edad, las variables clínicas: tipo de tumor, retrasplantes y supervivencia, y las variables anatomopatológicas: etiología, grado de diferenciación histológica, cirrosis, número de nódulos, delimitación de los nódulos y la invasión vascular.

El grado de positividad de los marcadores se valoró mediante la escala semicuantitativa de Zhang (tabla 2). Mediante esta escala asociamos el porcentaje de expresividad tanto en la zona tumoral como peritumoral a un valor comprendido entre 0 y 3, correspondiendo 0 una ausencia de tinción y 3 una gran expresividad del marcador. Se utilizó el mismo procedimiento para la interpretación de ambos marcadores pero en el marcador Ki67 se valoró únicamente la zona tumoral debido a la ausencia de tinción en toda la zona peritumoral.

Escala semicuantitativa de Zhang	
Puntuación	Significado
0	Ausencia de tinción
1	0 – 10% de las células teñidas
2	10 – 50% de las células teñidas
3	50 – 100% de las células teñidas

Tabla 2: Escala semicuantitativa de Zhang

Mediante el estudio del Ki67 se pretende valorar el índice proliferativo del tumor, que está relacionado con el grado histológico y la agresividad tumoral. Existen diferentes patrones de expresión del ki67 según la fase del ciclo celular. En fase G1 encontramos una débil positividad nucleolar que se hace más intensa conforme evoluciona a la fase de síntesis donde la positividad es también nuclear pero se aprecia una imagen punteada. En fase G2, crece el citoplasma y desaparece el nucleolo y es cuando la célula presenta una mayor tinción del marcador. Algunas células endoteliales o células inflamatorias pueden teñirse por lo que es importante la previa identificación de las células tumorales. También es importante no valorar como mitosis imágenes confusas que puedan corresponder a apoptosis o a artefactos de la tinción.²⁴

Así pues, para la correcta valoración de Ki67 hay que contar todas las células tumorales que muestren positividad nuclear, independientemente de la intensidad de la misma ya que son células que se encuentran en proliferación celular. Las células en reposo están en G0 y son las únicas que no muestran expresión de ki67.²⁴

Para la correcta metodología en la valoración del marcador ki67 se siguieron las indicaciones de la OMS (adaptación de la publicación Neuroendocrine Tumor Society de 2008) donde propone el recuento de 500 a 2000 células en aquellas áreas donde la proliferación sea más positiva (áreas calientes). El resultado final se da en forma de porcentaje y se aconseja indicar el número total de células que se han valorado. Esta metodología es importante ya que la expresión de ki-67 no es homogénea por todo el tumor por lo que es fundamental su recuento siempre en zonas calientes.²⁴

El CD34 tiñe la membrana de las células endoteliales. En las figuras 3 y 4 y en las figuras 13, 14, 15, 16, 17 y 18 que se adjuntan en el Anexo 2 se muestran iconografía microscópica de las tinciones realizadas.

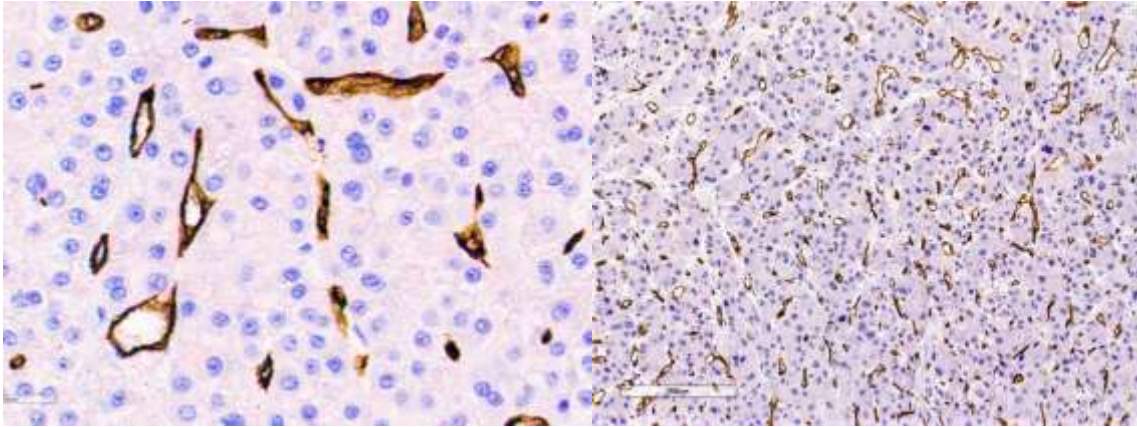


Figura 3: Positividad del marcador CD34 en un CHC

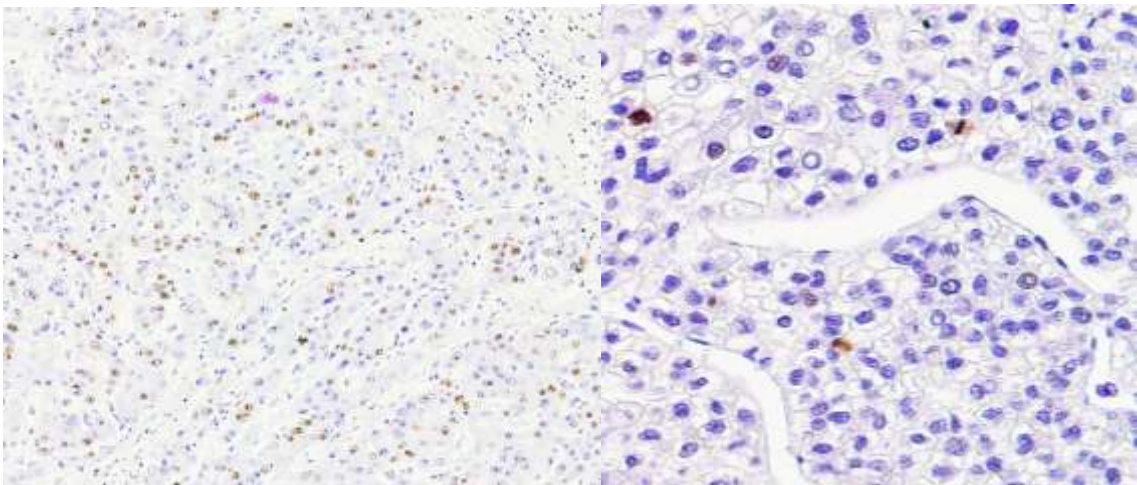


Figura 4: Positividad del marcador Ki67 en un CHC

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se introdujeron las variables previamente obtenidas en el programa Excel (Microsoft, Richmond EEUU) para su tabulación y su posterior análisis estadístico. El estudio descriptivo de nuestra muestra, se realizó a través de medidas de tendencia central (moda, mediana, media) y medidas de dispersión (rangos intercuartílicos, varianza etc.) con el fin de valorar el comportamiento de nuestras variables a estudio en la población a estudio en cuanto a su tendencia central y variabilidad.

Se cuantificó, mediante la escala de Zhang, la expresividad de la zona tumoral y peritumoral de los dos marcadores a estudiar en las muestras previamente y se introdujeron junto con el resto de datos en la tabla de excel.

Posteriormente se realizó un análisis estadístico mediante el programa IBM SPSS versión 20 para determinar si existe relación entre la supervivencia y la expresividad de ambas tinciones. A la hora de analizar la supervivencia y la relación entre la mortalidad y la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos (CD34 tumoral, CD34 peritumoral y Ki67 tumoral) se utilizaron las curvas de Kaplan Meier y el test estadístico de Breslow (Wilcoxon Generalizado). Para interpretar las variables cualitativas se ha obtenido por el Chi-cuadrado. En aquellas tablas 2x2 que no cumplieron los requisitos para usar el Chi-cuadrado, han sido analizadas mediante el estadístico de Fisher.

5. RESULTADOS

Siguiendo el protocolo del estudio se seleccionaron 100 casos de pacientes trasplantados en el H.C.U Lozano Blesa por un tumor hepático primario, de los cuales 42 muestras se descartaron tras el análisis debido a que los bloques de parafina contenían una muestra insuficiente o porque ya no estaban disponibles en el archivo. Se excluyen además otras 8 de las muestras debido a la difícil valoración por la presencia de necrosis secundaria a quimioembolización, se obteniendo finalmente una muestra de 50 pacientes (n=50). (Figura 5)

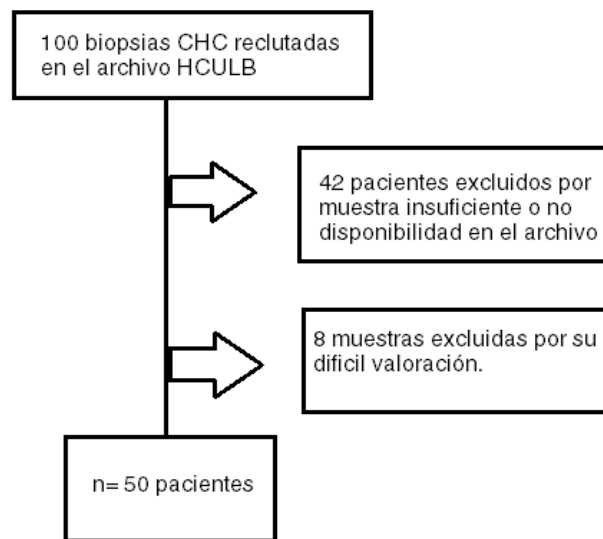


Figura 5: Diagrama de flujo del proceso de búsqueda de pacientes.

Sexo:

De estos 50 pacientes encontramos que 45 pacientes eran varones (90%) y 5 de los pacientes eran mujeres (10%). (Figura 6)

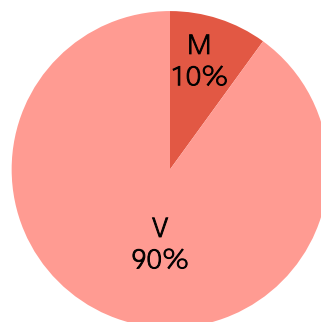


Figura 6: Diagrama distribución de la variable Sexo

Edad:

La muestra escogida presenta una edad media de 56,64, una moda de 61 años y una mediana de 58. La edad más precoz de aparición de CHC fue de 42 años y la edad más tardía de 68 años. La edad media entre las mujeres era de 53.2 años y entre los hombres de 57 años.

Etiología:

La etiología más frecuente fue debido al VHC representado por 26 pacientes (52%), seguida de la enólica con 14 pacientes (28%), coexistiendo en un 2% de los pacientes la causa enólica y el VHC. En una menor medida, encontramos que un 2% fue debido a hemocromatosis y en un 6% de los casos no se consiguió averiguar la causa. (tabla 3)

Etiología	Frecuencia	Porcentaje
VHC	26	52%
ENOLICA	14	28%
VHB	5	10%
CRIPTOGENICA	3	6%
HEMOCROMATOSIS	1	2%
VHC ENOLICA	1	2%
Total	50	100,0

Tabla 3: Distribución de la causas de CHC en nuestra muestra

Grado histológico:

En cuanto al grado histológico de los tumores, observamos que en nuestra muestra predominan los tumores bien diferenciados (G1) representando el 82%. Los tumores moderadamente diferenciados (G2) constituyeron el 18%, no presentando en nuestra muestra ningún tumor indiferenciado (G3).

Tipo tumoral:

Con respecto a los tipos de CHC en función de su organización microscópica, encontramos que 37 biopsias son de tipo trabecular, 6 acinares y 7 de tipo mixto (trabecular-acinar).

Cirrosis:

El 98% de los pacientes con CHC tenían antecedente de cirrosis (49 pacientes) y el 2% restante de los pacientes presentaban un estado precirrótico (1 paciente).

Invasión vascular:

El 30% de los CHC estudiados presentaron invasión vascular tumoral. De las 15 biopsias donde se apreciaba invasión vascular, 4 CHC eran de grado histológico moderadamente diferenciado (G2) y 11 CHC eran bien diferenciados G1. (Figura 7).

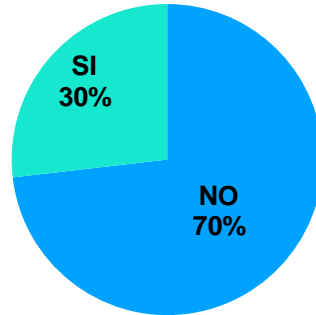


Figura 7 : Porcentaje de invasión vascular

Numero de nódulos tumorales:

El 34% de los CHC presentaban un único nódulo tumoral mientras que el 66% presentaban múltiples nódulos tumorales (figura 8).

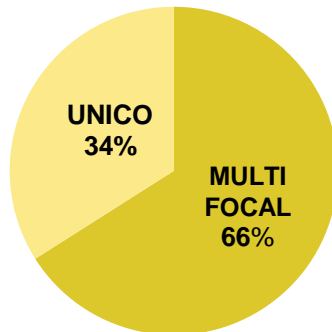


Figura 8: Presencia de nódulos tumorales

Delimitación de los nódulos:

En el 30% de los casos de CHC los bordes nodulares eran de tipo infiltrativo. De los pacientes actualmente vivos, la mayoría no presentaban bordes infiltrantes (80%), mientras que el 100% de los pacientes que presentaron una supervivencia tras el trasplante inferior de un año, mostraban nódulos con bordes infiltrantes.

Pacientes sometidos a retrasplante:

Cuatro pacientes del total de la muestra, necesitaron ser retrasplantados representando un 8% del total. Los cuatro pacientes presentaban un tumor bien diferenciado (G1). Tres pacientes fueron retrasplantados debido a una recidiva del virus de la Hepatitis C y en el último caso por un rechazo cónico del órgano. En ninguno de los cuatro se encontró recidiva tumoral.

Marcador CD34:

En cuanto a la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos, la expresión de CD34 en el tejido tumoral fue moderadamente positiva (grado 2 en la escala de Zhang) en el 20% (10 pacientes) y elevadamente positiva (grado 3 en la escala se Zhang) en el 80% (40 pacientes) de las muestras. La expresión del marcador CD34 peritumoral fue negativa en el 4% (2 pacientes) de las muestras, levemente positiva (grado 1 escala Zhang) en el 50% (25 pacientes) de las muestras y moderadamente positiva (grado 2 en la escala se Zhang) en el 46% (23 pacientes) de las muestras.

Marcador Ki67:

Respecto al marcador Ki67 en el tejido tumoral, el 8% (4 pacientes) de las muestras presentaron ausencia de tinción, el 82% presentaron una tinción leve (grado 1 escala Zhang) y un 10% presentaron una tinción moderada (grado 2 de la escala de Zhang).

Análisis de supervivencia:

Con respecto a la supervivencia tras el trasplante, murieron 9 pacientes antes del primer año (1 antes del primer mes, 4 antes de los 6 meses y 4 pacientes entre los 6 meses y el año).

Fallecieron 5 pacientes antes de los 3 años tras el trasplante, 5 pacientes antes de los 5 años, 15 pacientes antes de los 10 años y 16 pacientes siguen todavía vivos con un periodo libre de enfermedad mayor a 10 años. (Figura 9)

La supervivencia media de la muestra fue de 3085 días que corresponde a 8,45 años. En la figura 9 y en la tabla 9 que se adjunta en el anexo 1 se muestra la mortalidad tras el trasplante de los pacientes estudiados.

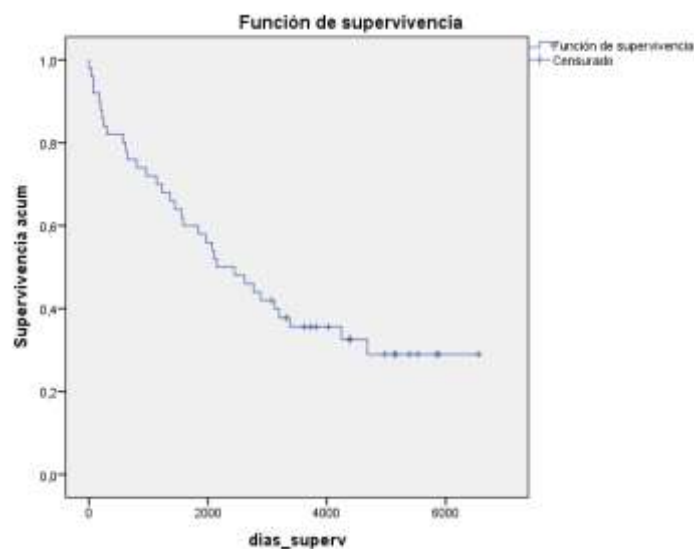


Figura 9: Curva de supervivencia

5.1 RELACIÓN CD34 TUMORAL Y EL GRADO HISTOLÓGICO:

En la tabla 4 podemos observar como en nuestra muestra de 50 pacientes, el 20% de los CHC presentan una positividad de 2 en la escala de Zhang y el 80% de los CHC presenta un valor de 3. Analizando la variable CD34 valor 2, se observa que el 60% de ese grupo se corresponde con un grado histológico bien diferenciado (G1) y el 40% corresponde a un grado histológico moderadamente diferenciado (G2). Estudiando la variable CD34 valor 3, se observa que el 87,5% de ese grupo presenta un grado histológico bien diferenciado (G1) y el 12,5% presenta un grado histológico moderadamente diferenciado (G2).

En nuestro trabajo se observa como las zonas con mayor positividad para el marcador CD34 corresponden con mayor frecuencia a tumores bien diferenciados (G1) que a tumores moderadamente diferenciados (G2).

Utilizando el análisis estadístico de Fisher, se obtiene una p de 0,65 que no es significativa, por lo que no podemos afirmar que la positividad del CD34 se asocie a una mayor diferenciación histológica.

	G1	G2	TOTAL
CD34 tumoral 2	6 (60%)	4 (40%)	10 (20%)
CD34 tumoral 3	35 (87,5 %)	5 (12,5%)	40 (80%)
TOTAL	41 (82%)	9 (18%)	50 (100%)

Tabla 4: Relación expresión CD34 tumoral y grado histológico.

5.2 RELACIÓN VALOR CD34 PERITUMORAL Y EL GRADO HISTOLÓGICO:

	G1	G2	TOTAL
CD34 peritumoral 0	2 (100%)	0 (0%)	2 (4%)
CD34 peritumoral 1	20 (80%)	5 (20%)	25 (50%)
CD34 peritumoral 2	19 (82,6%)	4 (17,4%)	26 (46%)
TOTAL	41 (82%)	9 (18%)	50 (100%)

Tabla 5: Relación expresión CD34 peritumoral y grado histológico.

Se observa en la tabla 5 como de las 50 biopsias de CHC de nuestro estudio, el 4% presentó un valor igual a 0 en la expresión de CD34 en el tejido peritumoral, correspondiendo ambos dos pacientes a un CHC bien diferenciado (G1).

El 50% de los CHC mostraron una expresividad de 1 en el tejido peritumoral, de los cuales el 80% fueron tumores bien diferenciados (G1) y el 20% tumores moderadamente diferenciados (G2).

El 46% de total de biopsias, presentaron un valor de 2 en la expresión de CD34 peritumoral, correspondiendo en su mayoría a tumores bien diferenciados (82,6%) y siendo moderadamente diferenciados en un 17,4%.

Podemos ver una mayor positividad del CD34 peritumoral en aquellos tumores bien diferenciados.

5.3 RELACIÓN ENTRE LA SUPERVIVENCIA Y EL GRADO HISTOLÓGICO:

De nuestra muestra de 50 pacientes, el 32% de los CHC siguen vivos (16 pacientes) actualmente tras el trasplante mientras que el 68% fallecieron (34 pacientes). De los pacientes vivos, el 87,5% corresponde con un grado histológico bien diferenciado (G1) y el 12,5% corresponde con un tumor moderadamente diferenciado (G2).

Analizando los pacientes fallecidos, el 79,4% se corresponden con un tumor G1 y el 20,6% corresponde a G2.

Utilizando el análisis estadístico de Fisher, se obtiene una p de 0,699 que no es significativa, por lo que no podemos afirmar que exista asociación entre la mortalidad y el grado histológico.

5.4 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN CD34 PERITUMORAL Y LA SUPERVIVENCIA:

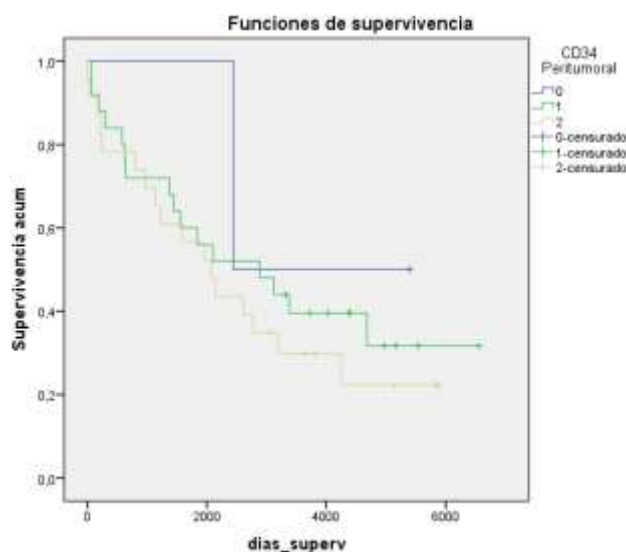


Figura 10: Distribución de supervivencia en función del valor de CD34 peritumoral

En relación a la figura 10, se muestra la relación existente entre la supervivencia tras el trasplante hepático y la expresividad del marcador CD34 en el tejido peritumoral. En ella se demuestra que la supervivencia no se ve influenciada por los valores de expresividad del marcador CD34.

Se observa en la siguiente tabla (Tabla 6), como hay una supervivencia del 50% en los pacientes con un valor 0 de CD34 peritumoral, una supervivencia del 36% en los pacientes con valor 1 y de 26,1% en los pacientes con un valor de 2 en la expresión de CD34 peritumoral.

CD34 PERITUMORAL- EXITUS				
CD34 Peritumoral	Nº total	Nº de Exitus	Pacientes Vivos	
			Nº	Porcentaje
0	2	1	1	50,0%
1	25	16	9	36,0%
2	23	17	6	26,1%
Global	50	34	16	32,0%

Tabla 6: Relación de los pacientes fallecidos en función de la variable CD34 peritumoral

Se realiza es test de Breslow (Wilcoxon generalizado), obteniéndose una p de 0,574 que no es estadísticamente significativa. Por lo tanto, aunque vemos en nuestros datos una leve

tendencia a que una mayor positividad del CD34 peritumoral se asocia a una peor supervivencia, no podemos afirmar que exista relación entre la expresión del de CD34 en el tejido peritumoral y la mortalidad.

En la tabla 10 que se adjunta en el anexo 1 se muestra la mortalidad tras el trasplante de los pacientes estudiados en relación con la expresividad del marcador CD34 peritumoral.

5.5 RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN CD34 TUMORAL Y LA SUPERVIVENCIA:

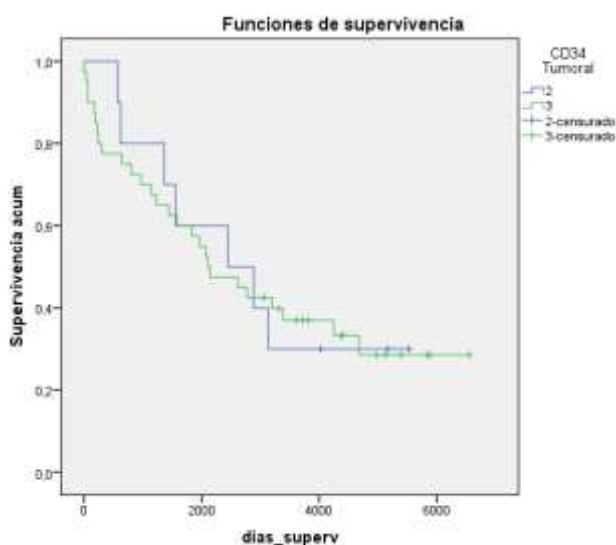


Figura 11: Distribución de la supervivencia en función del valor de CD34 tumoral

En relación a la figura 11, se muestra la relación existente entre la supervivencia tras el trasplante hepático y la expresividad del marcador CD34 en el tejido tumoral. En ella se demuestra que la supervivencia no se ve influenciada por los valores de expresividad del marcador CD34. En la tabla 11 que se adjunta en el anexo 1 se muestra la mortalidad tras el trasplante de los pacientes estudiados en relación con la expresividad del marcador CD34 tumoral.

La media de supervivencia total es igual a 8,45 años, mientras que la media de supervivencia en aquellos pacientes con un CHC con expresión igual a 2 fue de 8 años y los pacientes con un CHC de expresión 3 en la escala de Zhang tienen una media de supervivencia de 8,3 años. Se realiza el test de Breslow (Wilcoxon generalizado), obteniéndose una p de 0,737 que no es estadísticamente significativa. Por lo tanto no podemos afirmar que exista relación entre una mayor expresividad del marcador CD34 en el tejido tumoral y una mayor mortalidad.

5.6 RELACIÓN ENTRE EL VALOR DE KI67 Y EL GRADO HISTOLÓGICO:

	G1	G2	TOTAL
Ki67 Tumoral 0	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6 (12%)
Ki67 Tumoral 1	33 (84,6%)	6 (15,4%)	39 (78%)
Ki67 Tumoral 2	3 (60%)	2 (40%)	5 (10%)
TOTAL	41 (82%)	9 (18%)	50 (100%)

Tabla 7: Relación entre el ki67 y el grado tumoral

La tabla 7 nos muestra como del total de 50 CHC, el 12% presentan en tejido tumoral una ausencia de tinción (valor 0 según escala de Zhang), el 78% de los CHC presentaron un valor igual a 1 y el 10% un valor igual a 2.

Analizando la variable Ki67 valor 0, se observa que el 83,3% son tumores bien diferenciados (G1) y el 16,7% se corresponden con tumores moderadamente diferenciados (G2).

De los 39 CHC que presentan una expresividad igual a 1 en la escala se Zhang, el 84,6% corresponden a tumores bien diferenciados (G1) y el 15,4% corresponde a tumores moderadamente diferenciados (G2).

Finalmente, de los 5 pacientes que presentan una expresividad del Ki67 igual a 2, el 60% son tumores bien diferenciados (G1) y el 40% son tumores moderadamente diferenciados (G2).

5.7 RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE KI67 TUMORAL Y LA SUPERVIVENCIA :

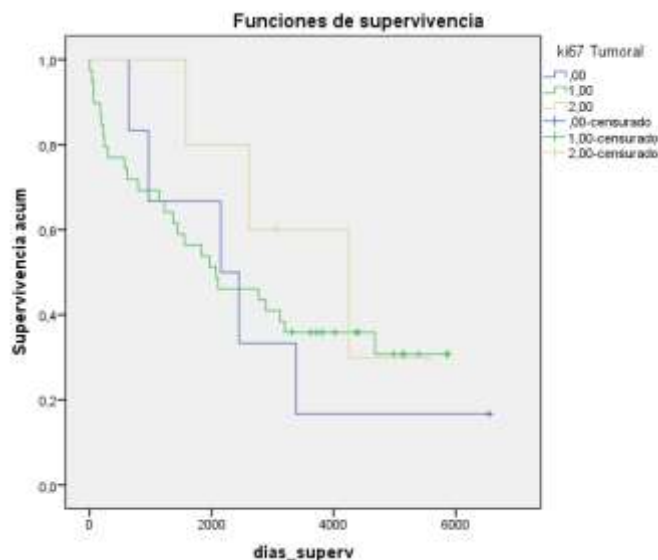


Figura 12: Curva de supervivencia en función de la expresión de Ki67

En la figura 12 y en la tabla 8 podemos observar la relación entre la mortalidad y el valor otorgado de expresividad de Ki67 en el tejido tumoral. En la tabla 12 que se adjunta en el anexo 1 se muestra la mortalidad tras el trasplante de los pacientes estudiados en relación con la expresividad del marcador Ki67 tumoral.

La media de supervivencia global de la muestra es de 8,45 años. En los pacientes con un valor 0 en la expresión de ki67 la supervivencia fue de 7,4 años mientras que los pacientes con valor 1 tuvieron una supervivencia media de 7,7 años y los pacientes con valor 2 la supervivencia fue de 10,3 años. En la tabla 5 se observa el porcentaje de pacientes vivos según los valores de tinción de la escala de Zhang.

Se utilizó el test de Breslow (Wilcoxon generalizado) y se obtuvo una p igual a 0.516. Al no ser la p significativa, no podemos afirmar que exista una relación entre la expresividad del marcador Ki67 y la supervivencia aunque en nuestra muestra exista aparentemente una menor mortalidad en aquellos pacientes con mayor positividad para el marcador.

Ki67 Tumoral	Nº total	Nº de Exitus	Pacientes vivos	
			Nº	Porcentaje
0	6	5	1	16,7%
1	39	26	13	33,3%
2	5	3	2	40,0%
Global	50	34	16	32,0%

Tabla 8: Relación de los pacientes fallecidos en función de la variable Ki67 tumoral

6. DISCUSIÓN

En los países desarrollados, el CHC es más frecuente en varones y los factores de riesgo más importantes son el virus de la Hepatitis C (VHC) y el alcoholismo. Concretamente, el VHC es el factor de riesgo más relevante. La adquisición de dicha infección suele darse en la edad adulta, por lo que el CHC aparece sobre los 60-70 años⁵. Además en el 75-90% de los casos se encuentra cirrosis como lesión previa.¹ Estos datos se corresponden a los datos obtenidos de nuestra muestra, donde existe un predominio de varones (90%), la etiología más frecuente es el VHC (52%) seguida de la causa enólica (28%) y el 98% de los pacientes presentaban cirrosis, existiendo pecirrosis en un 2%.

Relación entre la expresión CD34 y la mortalidad:

En nuestro trabajo, encontramos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la expresividad del marcador CD34 y la supervivencia tras el trasplante por lo que no podamos afirmar que exista una mayor mortalidad en aquellos pacientes con una mayor expresión del marcador.

Wenjiao Zeng²⁵ concluye que no se encuentran diferencias en pacientes trasplantados, pero sí que existe un mejor pronóstico en pacientes con una mayor densidad de microvasos (mayor expresividad de CD34) tras la resección hepática parcial en comparación con los pacientes con una MVD baja (menor expresividad de CD34). Una posible explicación es que, las metástasis intrahepáticas son con frecuencia el primer lugar de diseminación, que son reseçadas durante el trasplante hepático. En cambio tras la resección hepática parcial, el hígado remanente puede albergar metástasis no detectables clínicamente que dan lugar a recurrencias en el debido tiempo.

Relación entre la expresión de CD34 y el grado histológico:

Aunque no es estadísticamente significativo se observa en nuestro trabajo como una mayor expresión del marcador CD34 en el tejido tumoral y peritumoral se asocia a una mejor diferenciación histológica.

Relación entre la expresión del Ki67 y el grado histológico:

En cuanto al marcador Ki67, no se pudo estudiar la asociación del marcador respecto al grado tumoral por no cumplir los requisitos del estadístico Chi-cuadrado.

D'Errico et al²⁶ mostraron en su artículo como una alta expresión de Ki67 en tejido tumoral de CHC, se asociaba a tumores de alto grado histológico. En cambio en el artículo realizado por Cao et al¹⁹, concluyen que el ki67 está relacionado con un mayor TNM pero que no encuentran asociación entre el Ki67 y el grado histológico.

Relación entre la expresión del Ki67 y la mortalidad:

En nuestro estudio se sugiere una mayor supervivencia en los CHC con una mayor expresión de Ki67, aunque no podemos afirmar que exista relación puesto que no es estadísticamente significativo. En contraposición a nuestros datos encontrados, en el estudio realizado por Schmilovitz-Weiss²⁸ se observa como una elevada expresión del marcador se correlaciona con una mayor mortalidad, y en el estudio realizado por Nakanishi et al²⁷ afirman como alta expresión de Ki67 se asocia con una mayor y más temprana recurrencia tumoral.

Luo Y et al. realizaron un metaanálisis en el cual concluye que la alta expresión de Ki67 puede ser un factor pronóstico desfavorable para aquellos pacientes con CHC puesto que está asociado a un grado tumoral más alto, a una recurrencia más temprana de la enfermedad y una mayor mortalidad. En cambio identificó que no existían evidencias estadísticamente significativas entre los pacientes tratados con trasplante y la supervivencia o el tiempo libre de enfermedad.²³ Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro estudio donde no hemos encontrado evidencias significativas entre una alta expresión de Ki67 y un mayor grado histológico o una mayor mortalidad. Este hallazgo podría significar que la expresión del marcador inmunohistoquímico Ki67 puede relacionarse con una mayor agresividad tumoral en CHC pero no sea significativo en aquellos tumores tratados con trasplante hepático. Su conclusión final es que el Ki67 es un marcador de mal pronóstico en el CHC y que su valoración podría ayudar para determinar en el tratamiento y pronóstico de tumor pero que para validar estos resultados se requieren más estudios en pacientes trasplantados.²³

Nuestros datos no han sido concluyentes puesto que no existe evidencias de una mayor expresión de los marcadores inmunohistoquímicos CD34 y Ki67 se asocien a una mayor agresividad tumoral o a una menor supervivencia posiblemente por las limitaciones de nuestro estudio, ya que se ha analizado una muestra pequeña y muy homogénea. Considero que sería necesario el realizar más estudios sobre este tema con un mayor tamaño muestral y utilizando recuento del grado de tinción informático que sea más preciso y objetivo para su valoración.

7. CONCLUSIONES

- 1- En nuestro estudio, hemos encontrado en concordancia con la bibliografía consultada, como el CD34 es de mayor positividad en la zona tumoral que en la peritumoral. Siendo pues más profusa la vascularización y capilarización sinusoidal en el tumor que en el hígado peritumoral.
- 2- Aunque no existan diferencias estadísticamente significativas, se observa una tendencia a una mayor expresión del marcador CD34 en los tumores bien diferenciados (G1) que en los moderadamente diferenciados (G2).
- 3- En nuestro estudio, la causa del fracaso del trasplante hepático y posterior retrasplante, no tuvo relación con la recidiva tumoral.
- 4- En nuestro estudio, la supervivencia no ha mostrado una relación estadísticamente significativa con una mayor expresividad de los marcadores CD34 y Ki67. Pensamos que puede deberse a la heterogeneidad de la muestra y al número limitado de casos de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Crawford JM, Liu C. Hígado y vías biliares. En: Kumar V, Abbas AK, Fausto N et al, editores. Robbins y Cotran patología estructural y funcional. 8a ed. Barcelona: Elsevier Saunders; 2010. p. 833–890.
2. Klatt, E. Robbins y Cotran atlas de anatomía patológica. 3a ed. Barcelona: Elsevier; 2016.
3. Wanless IR. Anatomía, histología, embriología y anomalías del desarrollo del hígado. En: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, editores. Sleisenger y Fordtran enfermedades gastrointestinales y hepáticas. 7a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2004. p. 1265-1271.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Chem List*. 2013;107(11):843–7.
5. Kew MC. Tumores y quistes hepáticos. En: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. Sleisenger y Fordtran enfermedades gastrointestinales y hepáticas. 7a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2004. p. 1677-1704.
6. Forner A, Reig M, Varela M, Burrel M, Feliu J, Briceño J, et al. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. *Med Clin (Barc)*. 2016; 146(11): 511.e1-511.e22.
7. Lamps L. Liver: Tumors and Tumorlike Conditions. En: Goldblum JR, Lamps LW, McKenney JK, Myers JL. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 11th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017. 803-843
8. Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(10 suppl 2):132-135.
9. Zabalza Goya A. Valoración del c-kit en los carcinomas hepáticos primitivos. [Trabajo de fin de grado]. Zaragoza: Departamento de Patología Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza; 2018.
10. López Panqueva RP. Neoplasias hepáticas malignas: 1a parte. Hepatocarcinoma: papel de la biopsia hepática, estudios de inmunohistoquímica y otros aspectos importantes. *Rev Colomb Gastroenterol*. 2015;2:232–42.

11. Young RH, Gersell DJ, Clement PB, Scully RE. Hepatocellular carcinoma metastatic to the ovary: a report of three cases discovered during life with discussion of the differential diagnosis of hepatoid tumors of the ovary. *Hum Pathol.* 1992;23(5):574-580.
12. Asociación Catalana de Enfermos de Hepatitis. Tratamiento del HCC [Internet]. Asscat-hepatitis.org. 2019 [cited 21 January 2019]. Available from: [https://asscat-hepatitis.org/consecuencias hepaticas/hepatocarcinoma/tratamiento-del-hcc/](https://asscat-hepatitis.org/consecuencias-hepaticas/hepatocarcinoma/tratamiento-del-hcc/)
13. Javier J, Gallego S, Santos P. Caracterización inmunohistoquímica de los tumores hepáticos. Un diagnóstico del hepatocarcinoma.2010;9.
14. Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: An update. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2001;15(1):1–13.
15. Tsuji N, Ishiguro S, Sasaki Y, Kudo M. CD34 expression in noncancerous liver tissue predicts multicentric recurrence of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis.* 2013;31(5–6):467–71.
16. Enan ET, El-Hawary AK, El-Tantawy DAEA, Abu-Hashim MM, Helal NM. Diagnostic role of glypican 3 and CD34 for differentiating hepatocellular carcinoma from nonmalignant hepatocellular lesions. *Ann Diagn Pathol.* 2013;17(6):490–3.
17. Amoueian S, Attaranzadeh A, PourAlborzi F, Tarhini M, Montazer M. Evaluation of Microvessel Density of Hepatocellular Carcinoma and Comparison with Benign Lesions of Liver : An Immunohistochemical Study. 2012;14(2):121–2.
18. Xiong W, Cheeney G, Kim S, Kolesnikova V, Henninger B, Alexander J, et al. Radiologically Undetected Hepatocellular Carcinoma in Patients Undergoing Liver Transplantation An Immunohistochemical Correlation With LI-RADS Score. 2017:1–7.
19. Cao Y, Ke R, Wang S, Zhu X, Chen J, Huang C, et al. DNA topoisomerase II and Ki67 are prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;13(6):4109–16.
20. Schmilovitz-Weiss H, Tobar A, Halpern M, Levy I, Shabtai E, Ben-Ari Z. Tissue expression of squamous cellular carcinoma antigen and Ki67 in hepatocellular carcinoma-correlation with prognosis: A historical prospective study. *Diagn Pathol [Internet].* 2011;6(1):121.

21. Guarín Corredor MJ. Evaluación del índice de proliferación Ki67 como predictor de recidiva en meningiomas cerebrales grado I de la OMS. Comparación con la escala de resección quirúrgica de Simpson. [Tesis doctoral].Valencia: Departamento de Patología Facultad de Medicina, Universidad de Valencia; 2016.
22. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322.
23. Luo Y, Ren F, Liu Y, Shi Z, Tan Z, Xiong H, et al. Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labeling index in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis. 2015;8(7):10235–47.
24. Serrano Piñol T. Tumores neuroendocrinos bien diferenciados/ carcinomas neuroendocrinos poco diferenciados. Grado histológico. En: Piris Pinilla MÁ, González Flores E. Manual de ayuda en el diagnóstico anatomopatológico de TNE gastroenteropancreáticos. Barcelona: Novartis; 2016. p16-21.
25. Zeng W, Gouw ASH, Heuvel MC Van Den, Molema G. Hepatocellular Carcinomas in Cirrhotic and Noncirrhotic Human Livers Share Angiogenic Characteristics. 2010;1564–71.
26. D'Errico A, Grigioni WF, Fiorentino M, Baccarini P, Grazi GL, Mancini AM. Overexpression of p53 protein and Ki67 proliferative index in hepatocellular carcinoma: an immuno-histochemical study on 109 Italian patients. *Pathol Int.*1994;44:682-687
27. Nakanishi K, Sakamoto M, Yamasaki S, Todo S, Hirohashi S. Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2005; 103:307-312.
28. Schmilovitz-Weiss H, Tobar A, Halpern M, Levy I, Shabtai E, Ben-Ari Z. Tissue expression of squamous cellular carcinoma antigen and Ki67 in hepatocellular carcinoma-correlation with prognosis: A historical prospective study. *Diagnostic Pathology.* 2011; 6 -121.

