

Detección de hepatocarcinomas con rasgos de célula madre mediante el empleo de c-kit e implicación de estos tumores en el pronóstico de vida de los pacientes

Hepatocellular carcinoma detection with
stem cell features using c-kit and
involvement of these tumors in the patients
life prognosis

Realizado por: M^a PILAR MOYA PÉREZ

Directora: Dra. M^a JOSÉ MORANDEIRA GARCÍA

Codirector: Dr. ARIEL GONZALES SEJAS

Curso 2015/2016

ÍNDICE

Resumen	3
Abstract	4
1. Introducción	5
1.1 Epidemiología	5
1.2 Factores de riesgo	6
1.3 Morfología	7
1.4 Manifestaciones clínicas	8
1.5 Diagnóstico	8
1.6 Pronóstico y tratamiento	9
1.7 C-kit: marcador de célula madre en hepatocitos	12
1.7.1 Células madre hepáticas	12
1.7.2 C-kit/CD117	13
1.7.3 Papel del receptor c-kit en el hepatocarcinoma	14
2. Hipótesis	15
3. Objetivos	15
4. Material y métodos	16
4.1 Selección de pacientes	16
4.2 Variables del estudio	17
4.3 Análisis epidemiológico y estadístico	19
5. Resultados	20
5.1 Descripción de la filiación de los pacientes a estudio	20
5.2 Descripción etiológica	22
5.3 Descripción de las características clínicas y morfológicas	22
5.4 Descripción de las características de mortalidad	25
5.5 Presencia o ausencia de positividad del marcador inmunohistoquímico c-kit ..	27
5.6 Positividad del marcador c-kit como mecanismo de detección de los CHC con rasgos de célula madre	28
5.7 Positividad o negatividad de c-kit en relación con un mejor pronóstico	28
6. Discusión	29
7. Conclusiones	32
8. Bibliografía	33

RESUMEN

Introducción: La existencia de células madre en diferentes tejidos, a parte de la médula ósea, es una realidad⁹. Las células ovales hepáticas son consideradas células madre de este órgano ya que expresan en su superficie marcadores tradicionalmente asociados a células madre hematopoyéticas como son c-kit, Thy-1 y CD34^{9,10}.

Se han encontrado células madre en muchos tumores humanos, entre ellos hepatocarcinomas^{19,20}, y se cree que están implicadas en la iniciación, progresión y pronóstico de la enfermedad^{12,13}. El tumor hepático que, según la literatura, presenta con mayor frecuencia un inmunofenotipo de célula madre es el hepatocolangiocarcinoma. Sin embargo, este tumor supone menos del 1% de los tumores primarios hepáticos, lo cual dificulta su estudio¹⁴. El hepatocarcinoma, por el contrario, es la neoplasia primaria de hígado más frecuente¹, de ahí su elección para la realización de este estudio.

Hipótesis: ¿Podrían ser detectados los hepatocarcinomas con rasgos de célula madre mediante el estudio inmunohistoquímico con c-kit en el tejido tumoral y peritumoral? ¿Podría relacionarse la detección de hepatocarcinomas con rasgos de célula madre con un mejor pronóstico en cuanto a supervivencia en este tipo de pacientes?

Conclusiones:

1. La expresión de c-kit se ha producido en el 10% de los casos y esta expresión ha sido < 10% de las células del tejido peritumoral y totalmente negativa a nivel tumoral. Se concluye una escasa prevalencia de expresión de este marcador en hepatocarcinomas.
2. En el estudio de hepatocarcinomas convencionales es poco probable encontrar los que proceden de células madre. Probablemente un estudio de hepatocolangiocarcinomas tuviese como resultado un mayor porcentaje de neoplasias con rasgos de célula madre, siendo difícil este estudio debido a la baja incidencia de este tipo de tumor.
3. Según los resultados obtenidos, la positividad del marcador c-kit supone un factor de mal pronóstico en la supervivencia de los pacientes, resultados contrarios a la literatura. Probablemente, estos resultados sean debidos a una muestra insuficiente siendo necesaria la realización de un estudio con mayor número de casos para poder disponer de datos más homogéneos y contrastables.

ABSTRACT

Introduction: The stem cells existence in different tissues, bone marrow apart, is a reality⁹. Hepatic oval cells are considered stem cells of this organ as they express markers on their surface traditionally associated with hematopoietic stem cells such as c-kit, Thy-1 and CD34^{9,10}.

Stem cells had been found in many human tumors, including hepatocellular carcinoma^{19,20}, and is thought to be involved in the initiation, progression and prognosis of the disease^{12,13}. According to literature, the liver tumor that presents a stem cell immunophenotype more often is the hepatocellular-cholangiocarcinoma, however, this tumor is less than 1% of hepatic primary tumors, which complicates their study¹⁴. Nevertheless, hepatocellular carcinoma is the most common primary malignancy in the liver¹ hence its choice in this study.

Hypothesis: Could be detected hepatocellular carcinomas with stem cell features in tumor and peritumoral tissue by immunohistochemistry with c-kit? Could be related hepatocellular carcinoma with stem cell features detection with a better survival prognosis in these patients?

Conclusions:

1. C-kit expression has occurred in 10% of cases and this expression was <10% of cells in peritumoral tissue and completely negative in tumor level. Low prevalence of expression about this marker in hepatocellular carcinoma is our deduction.
2. In a study about conventional hepatocellular carcinoma it is unlikely to find those from stem cells. Probably, a study about hepatocellular-cholangiocarcinoma would result in a higher percentage of tumors with stem cell characteristics, but this study is difficult to do because of the low incidence of this tumor.
3. According to the results, positivity marker c-kit is a poor prognostic factor in the patient's survival; the results are contrary to literature. Probably, these results are due to an insufficient sample; therefore, it is necessary to make a study with more cases to be more homogeneous and reliable data.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la neoplasia primaria de hígado más frecuente. En los últimos años se ha constatado un aumento progresivo de su incidencia en países industrializados y actualmente constituye la sexta neoplasia más frecuente, con más de medio millón de nuevos casos al año, siendo la tercera causa de muerte por cáncer y la principal causa de muerte en pacientes cirróticos¹.

La incidencia más alta se localiza en el este de Asia y Asia sudoriental con tasas de 20,9 y 12,3 por 100.000 habitantes respectivamente, y África Occidental con 12,1 por 100.000 habitantes². Por otra parte, en los países más desarrollados la tasa desciende considerablemente, encontrándose valores intermedios de incidencia en el sur de Europa (5-9,8 casos nuevos por 100.000 habitantes) y áreas de baja incidencia en América, Australia, Nueva Zelanda y norte de Europa (2,2-4,8 casos por 100.000 habitantes)¹.

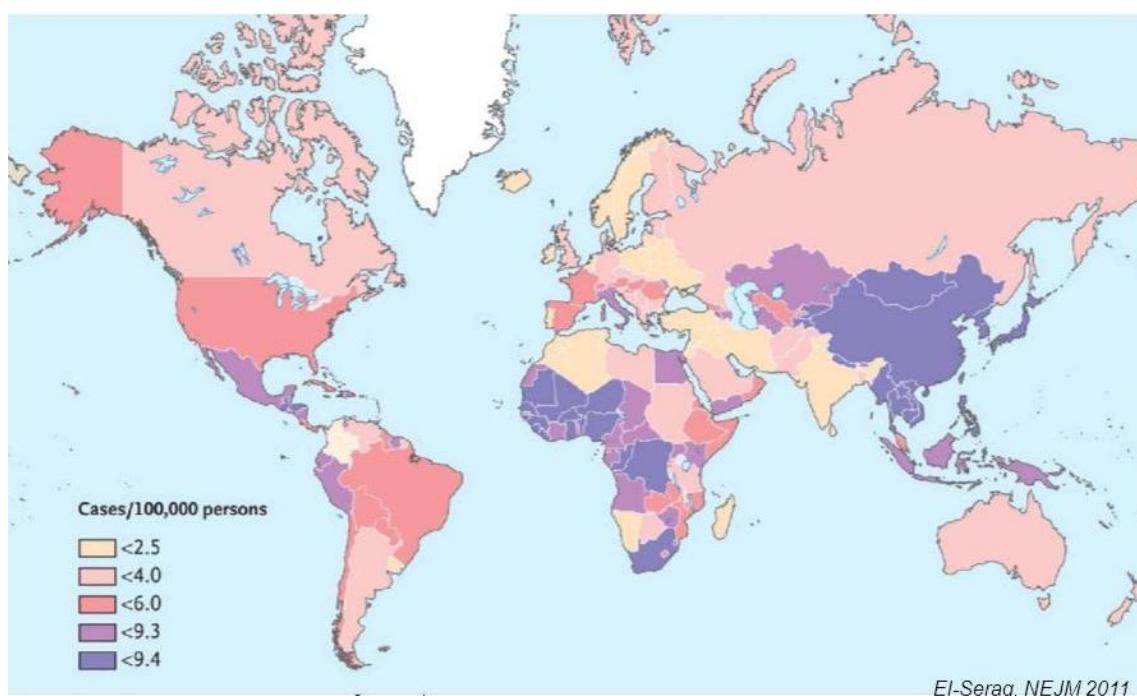


Figura 1: Incidencia CHC ajustado por 100.000 personas. Fuente: *The New England Journal of Medicine (NEJM)*.

También hay un predominio en la raza negra y en el sexo masculino, este último es más evidente en las zonas de alta incidencia, 3:1 frente a 1,5:1 de las poblaciones con baja incidencia³.

1.2 Factores de riesgo

En cuanto a la patogenia se han establecido tres asociaciones etiológicas importantes: la infección viral (VHB y VHC), el alcoholismo crónico y los contaminantes de la comida (aflatoxinas principalmente). En un menor número de casos encontramos enfermedades asociadas como la tirosinemia y la hemocromatosis hereditaria³.

En las zonas de alta prevalencia de VHB, ésta es la principal etiología, apareciendo el cáncer entre los 20 y los 40 años; mientras que en las poblaciones occidentales el hepatocarcinoma se asocia con el alcoholismo, el VHC y la hemocromatosis hereditaria y raramente se identifica antes de los 60 años³.

El desarrollo del hepatocarcinoma sobre la cirrosis está asociado a un riesgo lo suficientemente elevado como para justificar su vigilancia, pero no es un requisito imprescindible la presencia de cirrosis hepática para el progreso a CHC⁴.

El principal factor implicado en el desarrollo del tumor son los ciclos repetidos de muerte y regeneración celular presentes en cualquier hepatitis crónica. La acumulación de mutaciones durante ciclos continuos de división celular puede dañar los mecanismos de reparación de ADN y finalmente transformar los hepatocitos³.

En cuanto a la relación de las infecciones por VHB y VHC con el hepatocarcinoma, ambos virus codifican proteínas reguladoras multifuncionales que activan varias vías oncogénicas, que inducen acumulación de múltiples alteraciones genéticas en los hepatocitos infectados. Las mutaciones genéticas inducidas por la infección viral con frecuencia dañan el TP53, Wnt / b-catenina, RAS / RAF / MAPK quinasa y AKT / mTOR, que son proteínas que representan importantes acciones antitumorales².

En lo referente al alcohol como factor de riesgo, cantidades de 50-70g de alcohol al día durante un periodo superior a 10 años suponen un factor de riesgo conocido de CHC, dado que favorece la aparición de cirrosis. Además presenta un efecto sinérgico con las infecciones por VHB y VHC favoreciendo un desarrollo más rápido de la cirrosis. A pesar de ello, no está claro que el alcohol tenga un efecto carcinogénico directo¹.

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas en pequeñas concentraciones por hongos del género *Aspergillus*. Esta toxina se encuentra en granos y maní “enmohecidos”. La aflatoxina puede unirse covalentemente con el ADN celular y causar mutaciones en los protooncogenes o en los genes supresores de tumores, en especial el p53. Sin embargo, la carcinogénesis no ocurre a menos que el hígado esté mitóticamente activo como ocurre en la hepatitis viral crónica con episodios recurrentes de daño y regeneración³.

Obesidad, diabetes y esteatohepatitis no alcohólica también parecen incrementar el riesgo de CHC debido a que la esteatosis conlleva una actividad necroinflamatoria y una fibrosis más severa, pero hay pocos datos sobre la incidencia y prevalencia del carcinoma hepatocelular en estos pacientes¹.

1.3 Morfología³

Morfológicamente el carcinoma hepatocelular puede presentarse como una masa única, en forma multifocal o como un cáncer infiltrativo difuso. Estas tres presentaciones pueden causar el aumento del tamaño del hígado, siendo más evidente en las dos primeras ya que el tumor infiltrativo difuso puede mezclarse de manera imperceptible en un hígado cirrótico. (Anexo 2, imágenes 1 y 2)

Todos los patrones de CHC tienen una fuerte propensión a la invasión de los canales vasculares. Aparecen grandes metástasis intrahepáticas y, en ocasiones, grandes masas serpinginosas de tumor invaden la vena porta, con oclusión de la circulación portal, o la vena cava inferior, extendiéndose incluso hasta el lado derecho del corazón.

Estos carcinomas varían desde bien diferenciados a lesiones anaplásicas altamente indiferenciadas. En las formas bien o moderadamente diferenciadas pueden reconocerse células con rasgos de los hepatocitos que se disponen en patrón trabecular, patrones acinares o pseudoglandulares. En las formas poco diferenciadas las células pueden mostrar una apariencia pleomórfica con numerosas células gigantes anaplásicas, presentarse como una población de células pequeñas y completamente indiferenciadas o, incluso, pueden simular un sarcoma de células fusiformes. (Anexo 2, imágenes 3, 4 y 5)

Una variante peculiar es el carcinoma fibrolamellar. Este tumor se produce en hombres jóvenes y mujeres adultas (entre 20 y 40 años de edad), no tiene asociación con

los factores de riesgo arriba descritos y, a menudo, tiene mejor pronóstico. Se presenta como un nódulo único constituido por células poligonales bien diferenciadas. (Anexo 2, imagen 6)

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. Es importante saber que la cirrosis se asocia habitualmente a la presencia de adenopatías perihepáticas inespecíficas, que no deben hacer suponer necesariamente la presencia de enfermedad avanzada en el contexto de un hepatocarcinoma⁵.

1.4 Manifestaciones clínicas

El desarrollo de síntomas no suele producirse hasta que el tumor alcanza tamaños entre 4,5 y 8 cm⁵.

La clínica suele quedar enmascarada por los síntomas relacionados con la cirrosis o la hepatitis crónica subyacente: dolor mal definido en abdomen superior, malestar, fatiga, pérdida de peso o sensación de plenitud abdominal. En la mayoría de los casos es posible palpar la hepatomegalia. La ictericia, fiebre y varices gastrointestinales o esofágicas son hallazgos inconstantes³.

A veces estos pacientes desarrollan síndromes paraneoplásicos, todos ellos 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 ha puesto en relación con la secreción de péptidos⁵.

1.5 Diagnóstico

A la hora del diagnóstico, la detección precoz debe realizarse mediante ecografía semestral en la población con riesgo de padecer este tipo de tumor; fundamentalmente en pacientes con cirrosis hepática. La ecografía posee una sensibilidad del 94% para la

detección de CHC, aunque disminuye a sólo 63% para el diagnóstico de lesiones precoces. El uso de otras técnicas radiológicas o la determinación de alfafetoproteína no parecen haber demostrado incrementar su eficacia⁵. Debido a sus características vasculares, actualmente se puede realizar el diagnóstico de carcinoma hepatocelular por técnicas de imagen dinámicas (ecografía con contraste/TC/RM). En caso que el patrón de captación no sea característico en estas técnicas de imagen debe efectuarse una biopsia de la lesión⁶.

Recomendaciones⁷:

- Los nódulos menores de 1 cm detectados mediante ecografía de cribado deben seguirse mediante una ecografía cada 3 a 6 meses. Si tras 2 años no se detecta crecimiento, se debe volver al cribado habitual cada 6 meses.
- Los nódulos mayores o iguales a 1 cm detectados mediante ecografía en sujetos cirróticos pueden diagnosticarse de CHC sin necesidad de obtener una biopsia si presentan en técnicas de imagen dinámicas (ecografía con contraste, TC y RM dinámicas) captación de contraste en fase arterial seguido de lavado en fases tardías. En nódulos de entre 1 y 2 cm, este patrón vascular debe detectarse de forma coincidente en dos técnicas de imagen.
- Si el patrón vascular no es específico de CHC, se debe recomendar una biopsia.
- Si la biopsia es negativa, no se puede descartar el diagnóstico de CHC. Se debe valorar la realización de una biopsia nueva o un seguimiento estrecho de la lesión.
- En el caso de sujetos sin cirrosis establecida, la aplicación de estos criterios de imagen no es válida y es necesario la realización de una biopsia para obtener un diagnóstico concluyente.

1.6 Pronóstico y tratamiento

Una vez que se obtiene el diagnóstico, es necesario realizar el estudio de extensión de la enfermedad y una valoración pronóstica. Con esto, es posible informar al sujeto y a los familiares sobre la expectativa de vida, elegir el tratamiento más adecuado y evaluar su respuesta.

El pronóstico de los tumores sólidos depende fundamentalmente del estadio tumoral. Sin embargo, dado que el CHC aparece en la mayoría de los casos asociado a una cirrosis hepática y que el grado de alteración de la función hepática determina las opciones terapéuticas y la supervivencia (independientemente de la presencia del CHC), es imprescindible considerar conjuntamente el grado de disfunción hepática y la extensión tumoral.

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 ClinicLiverCancer)⁵.

El TNM fue revisado en el año 2010, y es el único sistema que ha sido validado en pacientes tratados tanto mediante resección hepática como por trasplante. Sin embargo este sistema 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 cirróticos⁵.

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 4 estadios que se vinculan a la posible indicación de tratamiento^{7,5}:

- El estadio inicial (estadio A) incluye a sujetos asintomáticos con función hepática conservada (Child-Pugh A y B) con un CHC solitario o con un máximo de 3 nódulos de hasta 3 cm de diámetro. Estos sujetos pueden tratarse con intención curativa mediante resección quirúrgica, ablación percutánea y trasplante hepático, con una supervivencia esperada a los 5 años de entre el 50 y el 75%.
- Un subgrupo con especial buen pronóstico son aquellos sujetos con cirrosis hepática compensada (Child-Pugh A) con CHC muy inicial (estadio 0), totalmente asintomáticos y que presentan tumores únicos menores de 2 cm, sin invasión vascular ni diseminación. Este estadio muy inicial correspondería al concepto de carcinoma *in situ*. En estos casos, la cirugía o la ablación por

radiofrecuencia ofrecen una alta probabilidad de curación, con supervivencia a los 5 años superior al 80%.

- El estadio intermedio (estadio B) consiste en sujetos con tumores multinodulares que exceden los criterios anteriormente descritos, sin invasión vascular ni extrahepática, con función hepática y estado general conservado. Si la función hepática corresponde al estadio A de Child-Pugh, los sujetos pueden beneficiarse de tratamiento mediante quimoembolización y su supervivencia mediana esperada es de 20 meses.
- Los sujetos con función hepática conservada, pero que presentan un CHC con invasión vascular, invasión extrahepática o con afectación leve del estado general se catalogan como sujetos en estadio avanzado (estadio C). En este grupo de sujetos, el único tratamiento que hasta la fecha ha mostrado beneficios en términos de supervivencia es el tratamiento con sorafenib, con una supervivencia mediana de aproximadamente 11 meses.
- Por último, los sujetos que presentan afectación grave del estado general o función hepática muy afectada (Child-Pugh C) y que no son candidatos a trasplante hepático corresponden al estadio D o terminal. En ellos, la mediana de supervivencia es menor a 3 meses y únicamente se debe indicar tratamiento sintomático.

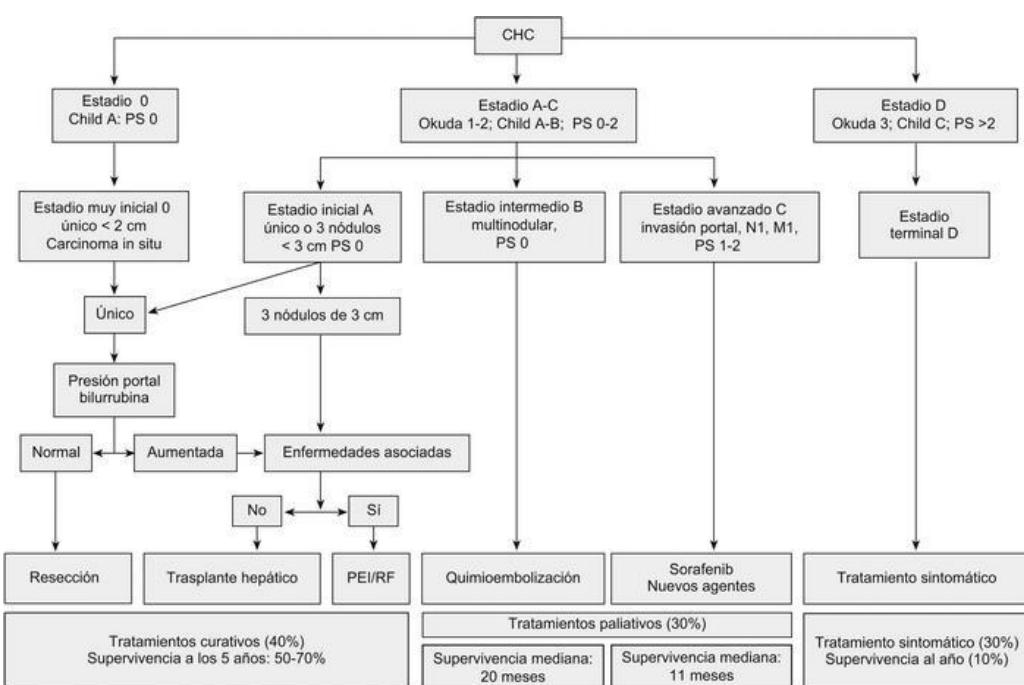


Figura 2: Sistema de estadificación del Barcelona Clinic Liver Cancer⁷

Los avances recientes en el conocimiento de las vías moleculares que determinan la aparición y la progresión del CHC han permitido definir diferentes patrones de expresión genética con posible significación pronóstica. Aunque la información disponible en la actualidad es preliminar, en un futuro se podrán incorporar datos de expresión génica a los sistemas actuales de evaluación y se podrá basar la predicción de supervivencia así como la indicación de tratamiento en el perfil molecular del sujeto⁷.

El curso natural de este cáncer consiste en el crecimiento progresivo del tumor hasta producirse fallo hepático. La muerte puede ocurrir por caquexia, sangrado de varices gastrointestinales o esofágicas, fallo hepático con coma hepático o rotura del tumor con hemorragia fatal³.

1.7 C-kit: Marcador de célula madre en hepatocitos

1.7.1 Células madre hepáticas

Las células madre son aquellas células dotadas simultáneamente de la capacidad de autorrenovación (hacer copias de sí mismas) y de originar células hijas comprometidas en determinadas rutas de desarrollo, que se convertirán por diferenciación en tipos celulares especializados. Existen dos tipos de célula madre⁸:

- Células madre embrionarias: Solo existen en las primeras fases del desarrollo embrionario y son capaces de producir cualquier tipo de célula en el cuerpo humano. Bajo las condiciones adecuadas, estas células conservan la capacidad de dividir y hacer copias de sí mismas indefinidamente.
- Células madre adultas: Son aquellas células madre no diferenciadas que tienen la capacidad de "clonarse" y crear copias de sí mismas para regenerar órganos y tejidos. Las células madre adultas más conocidas y empleadas en la medicina son las células madre hematopoyéticas, que se encuentran tanto en la médula ósea como en el cordón umbilical.

Sin embargo, actualmente la existencia de células madre en diferentes tejidos, a parte de la médula ósea, como son sistema nervioso central, hígado, corazón, piel y músculo es una realidad⁹.

Las células ovales hepáticas son consideradas células madre multipotenciales de este órgano ya que expresan en su superficie marcadores tradicionalmente asociados a células madre hematopoyéticas como son c-kit, Thy-1 y CD34^{9,10}.

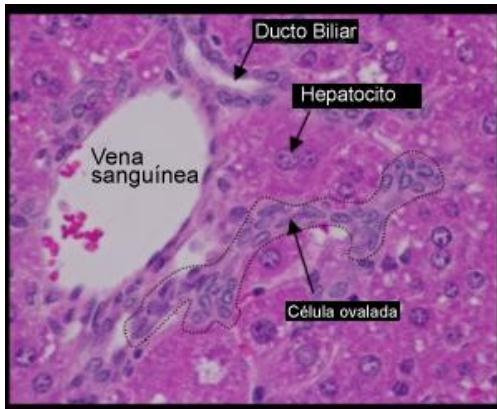


Figura 3: Célula oval hepática. Fuente: EuroStemCell

1.7.2 C-kit/CD117¹¹

El C-kit es una proteína transmembrana (glicoproteína) de 145 KDa. Funciona como un receptor con actividad tirosin quinasa. CD117 es un epítopo localizado en el dominio extracelular del receptor. C-kit es estructuralmente similar a otros receptores con actividad tirosin quinasa con posibilidades oncológicas, como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRs) o el factor estimulante de colonias (CSF1R). El receptor posee un dominio extracelular con cinco regiones de tipo Ig-like, una región única transmembrana y un dominio intracitoplasmático con actividad tirosin quinasa.

El gen c-kit se localiza en el cromosoma 4 (4q11-12), próximo al gen del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y también del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR).

El ligando para c-kit se conoce como SCF (stem cell factor-factor de célula madre). La activación del receptor se produce como consecuencia de un proceso de homodimerización. Este proceso provoca una serie de cambios estructurales en el receptor que determinan una activación del dominio con actividad quinasa de c-kit y fosforilación de numerosas proteínas. El resultado final de la activación es la génesis de

una serie de señales que actúan sobre procesos cruciales en la tumorogénesis como proliferación celular, adhesión, apoptosis y diferenciación.

1.7.3 Papel del receptor c-kit en el hepatocarcinoma

Se han encontrado células madre en muchos tumores humanos y se cree que están implicadas en la iniciación, progresión, metástasis, resistencia a la terapia, y en la recaída del tumor^{12,13}.

El hepatocolangiocarcinoma combinado es un tumor primario hepático poco frecuente. Se caracteriza por mostrar elementos inequívocos tanto de hepatocarcinoma como de colangiocarcinoma. En la actualidad los hepatocolangiocarcinomas se dividen en dos grandes grupos: los de tipo clásico que se caracterizan por presentar dos patrones morfológicos e inmunofenotípicos de hepatocarcinoma y colangiocarcinoma, y los subtipos con rasgos de célula madre, cuyas claves para el diagnóstico consisten en la presencia de células intermedias con inmunofenotipo de células madre (c-kit, N-CAM y Ep-CAM)¹⁴.

Por lo tanto, los hepatocolangiocarcinoma con rasgos de célula madre muestran, a menudo, positividad para c-kit, marcador que se expresa en células presentes en el hígado a las que se atribuyen capacidades de células progenitoras¹⁴.

Sin embargo, el hepatocolangiocarcinoma es un tumor raro, supone <1% de los tumores primarios hepáticos¹⁴ lo cual dificulta su estudio. Por otro lado, diversos estudios también señalan la presencia del marcador c-kit en las células que componen algunos hepatocarcinomas, así como, en menor medida, en la masa peritumoral siendo mayor esta cifra en el tejido peritumoral cirrótico^{12,14,15}.

Cabe destacar que hay otras patologías como la infección crónica por VHC, por VHB y en cirrosis biliar de estadios avanzados, en las cuales también se produce un incremento en la expresión del marcador c-kit^{16,17,18}.

Aunque parece haber unanimidad en la afirmación de la presencia de c-kit en algunos hepatocarcinomas, hay controversia en el porcentaje de tumores que lo expresan. Mientras que hay estudios que afirman que alrededor del 25% de los CHC expresan c-kit¹⁹, otros apuntan a una expresión de tan solo el 2,3%²⁰.

También ha sido demostrada a una mayor tasa de supervivencia por parte de los pacientes cuyos hepatocarcinomas expresan c-kit en comparación con los pacientes cuyos tumores no lo expresan¹⁹, así como una mayor respuesta al tratamiento quimioterápico con sorafenib^{21,22}. Estos resultados sugieren que la expresión de c-kit puede ser un indicador de buen pronóstico para el CHC.

2. HIPÓTESIS

¿Podrían ser detectados los hepatocarcinomas con rasgos de célula madre mediante el estudio inmunohistoquímico con c-kit en el tejido tumoral y peritumoral?

¿Podría relacionarse la detección de hepatocarcinomas con rasgos de célula madre con un mejor pronóstico en cuanto a supervivencia en este tipo de pacientes?

3. OBJETIVOS

Este estudio tiene como finalidad la detección de hepatocarcinomas con rasgos de célula madre mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas y la relación de estos tumores con el pronóstico de la enfermedad, para lo cual hemos marcado los siguientes objetivos:

- Estudiar la presencia o ausencia de positividad del marcador inmunohistoquímico C-kit en el hepatocarcinoma.
- Estudiar la presencia o ausencia de positividad del marcador inmunohistoquímico C-kit en el tejido peritumoral.
- Estudiar si con la positividad del marcador inmunohistoquímico C-kit en el tejido tumoral podemos detectar los CHC con rasgos de célula madre.
- Estudiar si la positividad o negatividad del marcador inmunohistoquímico C-kit, tanto en el tejido tumoral como el peritumoral, se relaciona con un mejor pronóstico de la enfermedad.

En el desarrollo del trabajo también se realizó un estudio descriptivo de las características de la muestra a estudio:

- Descripción de la filiación de los pacientes a estudio.
- Descripción etiológica de los hepatocarcinomas de los casos estudiados.

- Descripción de las características morfológicas de los hepatocarcinomas de los casos estudiados.
- Descripción de las características clínicas de los hepatocarcinomas de los casos estudiados.
- Descripción de las características de mortalidad en relación con los hepatocarcinomas de los pacientes a estudio.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar estos objetivos, se realizó un estudio descriptivo a partir de una muestra representativa con el ánimo de valorar las características de dicha muestra en relación con la hipótesis propuesta. Posteriormente se procedió a realizar un estudio analítico para establecer la relación de causalidad entre el factor a estudio y la patología.

4.1 Selección de pacientes

Entre diciembre de 1998 y abril de 2016 han sido realizados en el HCU Lozano Blesa 551 trasplantes hepáticos, de los cuales 136 fueron diagnosticados de hepatocarcinoma en la pieza de explante, ello supone que el 24,7% de los casos transplantados padecían hepatocarcinoma.

Para nuestro estudio se seleccionaron las 20 últimas piezas de explante que cumplían los siguientes requisitos:

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

Se excluyeron aquellos casos en los que no podía visualizarse claramente el tejido tumoral debido a la extensa necrosis presente en tejido biopsiado por causas iatrogénicas (quimioembolización). (Anexo 2, imagen 7)

En conjunto, el grupo control debía ser representativo de la población con hepatocarcinoma transplantada en el centro. (Anexo 1, tabla 1)

4.2 Variables del estudio

4.2.1 Variables sociodemográficas

Fueron recogidos de la revisión de las Historias Clínicas de los pacientes seleccionados para el estudio:

- Sexo
- Edad en el momento del trasplante
- Patología hepática de base
- Presencia de cirrosis
- Supervivencia a los 12 meses postrasplante

4.2.2 Variables anatomicopatológicas

Fueron recogidos de los informes anatomicopatológicos realizados tras el trasplante hepático:

- Grado del CHC
- N° de nódulos tumorales
- Tamaño de los nódulos tumorales
- Presencia de necrosis
- Invasión vascular
- Presencia de cápsula

4.2.3 Expresión de C-kit

Medido en el tejido hepático a nivel del hepatocarcinoma y peritumoral mediante técnicas de inmunohistoquímica.

De modo rutinario, tras el trasplante hepático, las muestras son fijadas en formaldehido al 10% durante, al menos, 48 horas y luego son incluidos en bloques de parafina, que se almacenan en el archivo de Anatomía Patológica del centro.

Todos los explantes son estudiados por un anatomicopatólogo especializado en patología hepática. Tras una evaluación inicial del hígado entero, éste es 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.

Dado que el objetivo del trabajo es estudiar la expresión del C-kit tanto en el tejido tumoral como en el tejido circundante, se procedió a la selección, de cada uno de los pacientes a estudiar, de una muestra en la que se visualizaran tejido tumoral y no tumoral.

Para la selección de la muestra de los bloques de tejido fijado e incluido en parafina se cortan en secciones de 3 μm de grosor que son teñidos con la tinción de HE.

La selección de la muestra se llevó a cabo mediante la observación en microscopio óptico. Una vez realizada la selección de los cortes se procedió a realizar la técnica de inmunohistoquímica siguiendo el protocolo del procedimiento ultraView DAB para detección de c-kit.

- a. Desparafinado.
- b. Calentamiento previo del portaobjetos a 72°C desde la temperatura del medio.
- c. Acondicionador celular: ULTRA conditioner.
 - I. Calentar el porta a 95°C e incubar 8 minutos (acondicionador celular nº1).
 - II. 36 minutos de ULTRA CC1
- d. Anticuerpo: Aplicar una gota de PATH WAY c-kit (Ac), aplicar coverslip e incubar 32 minutos.
- e. Contratinción: Aplicar una gota de hematoxylin, coverslip e incubar 8 minutos.
- f. Postcontratinción: Aplicar una gota de Bluing Reagent, coverslip e incubar 4 minutos.
- g. Al acabar la técnica, deshidratación:
 - I. Alcohol al 70% durante 2 minutos.
 - II. Alcohol al 96% durante 3 minutos.
 - III. Alcohol al 100% durante 5 minutos
 - IV. Unos pases rápidos con xiloil.
- h. Montaje con Eukitt y cubreobjetos.

4.2.4 Valoración de la inmunohistoquímica

Actualmente no existe una escala de valoración estandarizada para valorar la tinción del marcador c-kit. Por ello, tras revisar la literatura¹, se decidió emplear la escala semicuantitativa de Zhang por estimarla lo suficientemente completa y de fácil interpretación.

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 1: Escala semicuantitativa de Zhang

4.3 Análisis epidemiológico y estadístico

En primer lugar se comenzó realizando un análisis epidemiológico para la cual se llevó a cabo un estudio descriptivo, en concreto un estudio transversal o de prevalencia (análisis de las variables de la enfermedad en un momento concreto en el tiempo). En base a él se valoró la relación entre la presencia de positividad del marcador inmunohistoquímico c-kit y la supervivencia de los pacientes.

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

- Casos: aquellos pacientes trasplantados hepáticos por CHC con una supervivencia inferior a 12 meses postrasplante.
- Controles: aquellos pacientes trasplantados hepáticos por CHC con una supervivencia mayor o igual a 12 meses postrasplante.
- Factor de riesgo/protector: presencia de rasgos de célula madre en el hepatocarcinoma valorado mediante la expresión de c-kit.

La fuerza de asociación entre el factor de riesgo/protector y la supervivencia 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.

	Supervivencia < 12 meses	Supervivencia ≥ 12 meses	
Positividad c-kit	a	B	Total de expuestos
Negatividad c-kit	c	D	Total de no expuestos
	Total de 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 c-kit) a/b y la oportunidad de enfermedad del grupo no expuesto (negatividad c-kit) c/d. Fórmula de cálculo odds ratio:

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

Posibles resultados:

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

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.

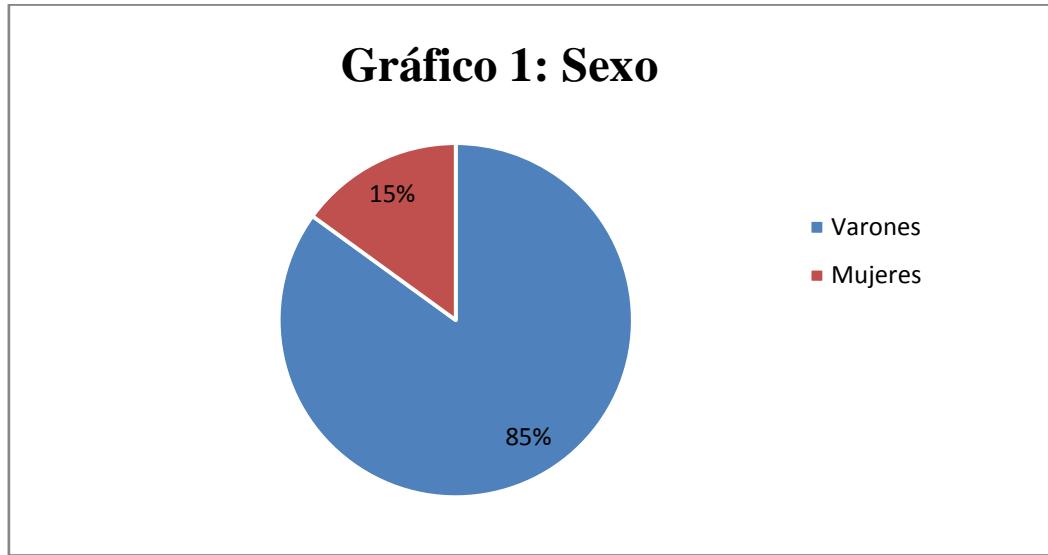
5. RESULTADOS

5.1 Descripción de la filiación de los pacientes a estudio

Se incluyeron en el estudio 20 pacientes cuya edad media era de 55,3 años, con un rango de edades situado entre 24 y 66 años. De ellos, el 85% eran varones y el 15% mujeres.

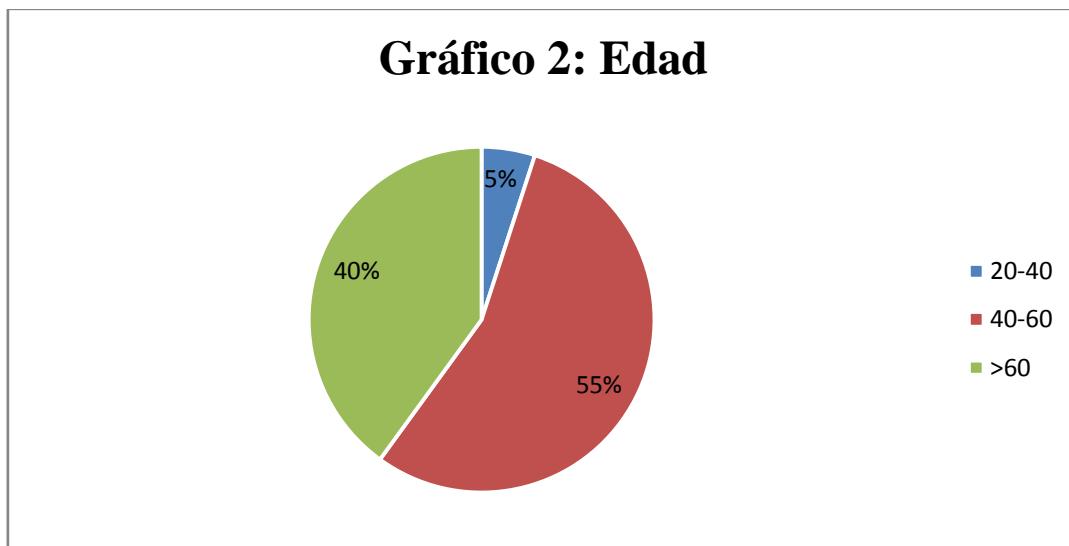
Sexo:

- Varones: 17
- Mujeres: 3



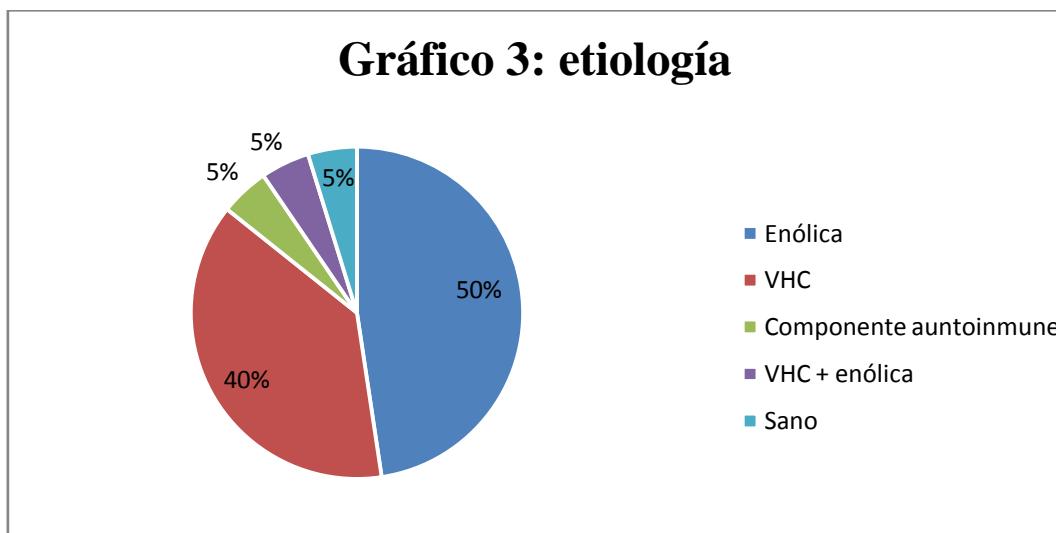
Edad:

- 20-40 años: 1 (fibrolamelar)
- 40-60 años: 11
- >60 años: 8



5.2Descripción etiológica de los hepatocarcinomas de los casos estudiados.

La etiología más frecuente fue la enólica representada por 10 pacientes (50%), seguida de el virus de la hepatitis C con 8 pacientes (40%). (Anexo 2, imagen 8). En menor medida encontramos la asociación de VHC y alcohol, componente autoinmune y asentamiento del tumor sobre hígado sano con un paciente en cada una de las etiologías (5%).

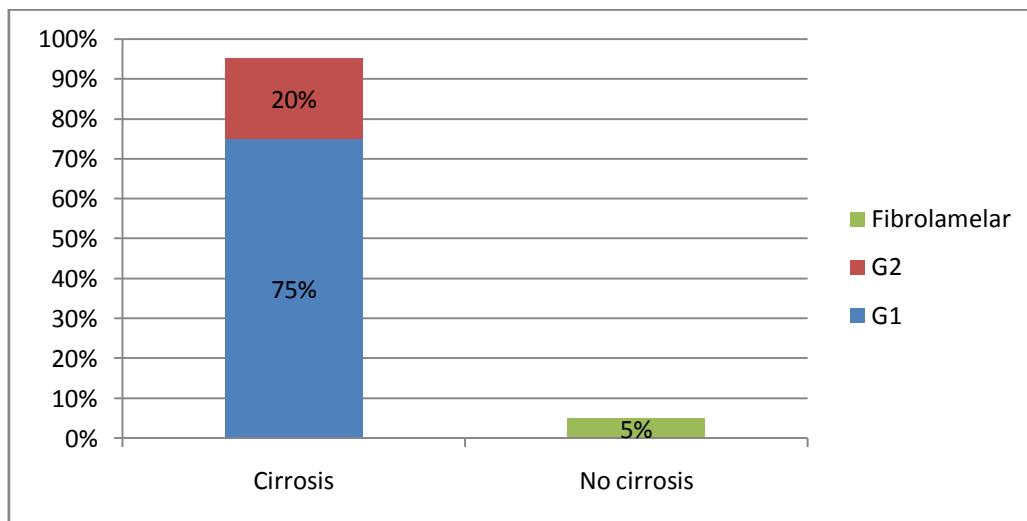


5.3Descripción de las características clínicas y morfológicas de los hepatocarcinomas de los casos estudiados.

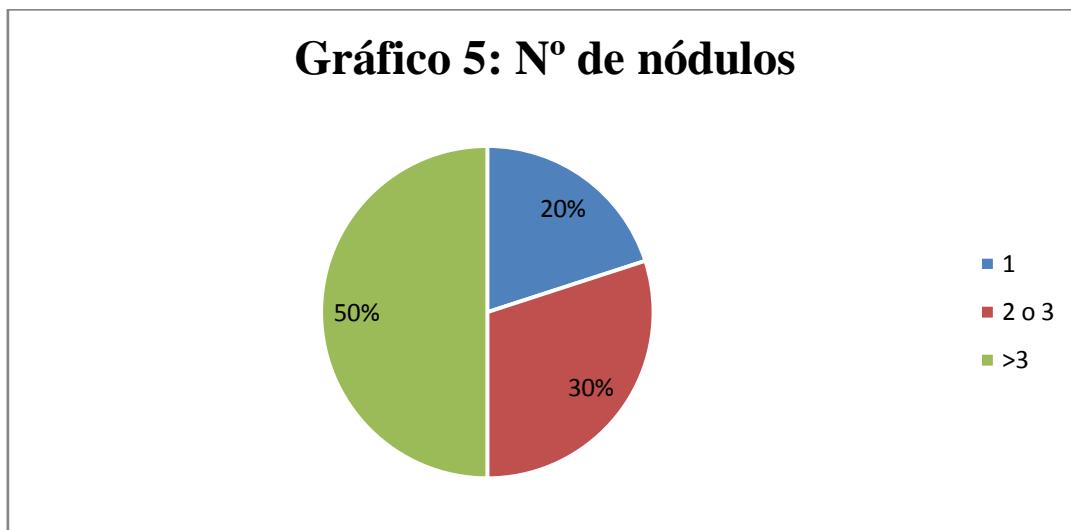
La cirrosis estaba presente en 19 de los pacientes estudiados (95% del total), únicamente uno de los pacientes no presentaba cirrosis. Cabe destacar que el paciente que no presentaba cirrosis, padecía una variante peculiar del hepatocarcinoma que es el carcinoma fibrolamellar, el cual se produce en personas más jóvenes y asienta sobre un hígado sano. (Anexo 2, imágenes 9 y 10).

En cuanto al grado de lesión del hepatocarcinoma, encontramos 15 tumores en G1 (75%), 4 en G2 (20%) y 1 fibrolamellar (5%).

Gráfico 4: Grado de lesión

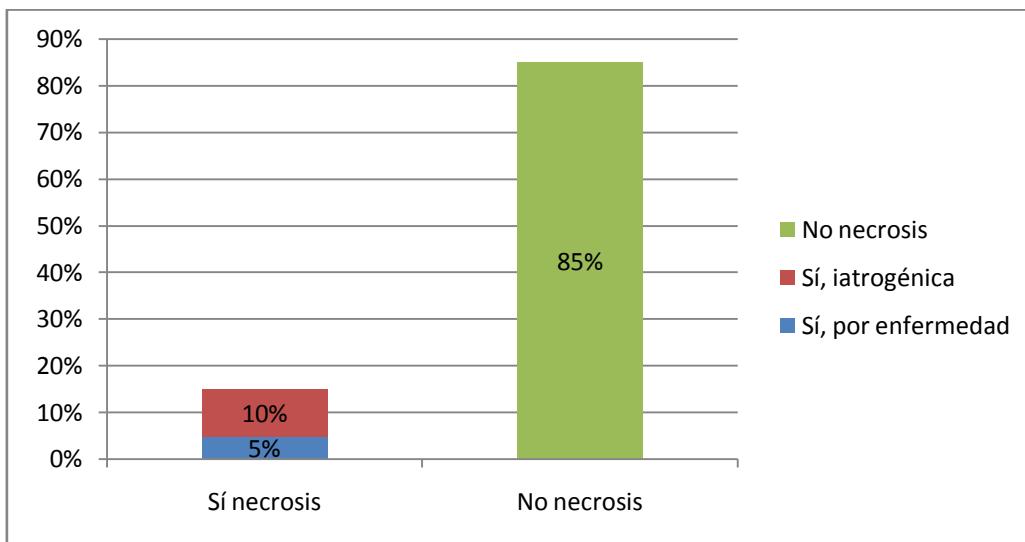


Otro aspecto a valorar en los hepatocarcinomas es el número de nódulos encontrados en el hígado. En nuestra muestra hemos hecho una clasificación en función de la presencia de un único nódulo (4 pacientes), entre 2 y 3 nódulos (6 pacientes) o más de 3 nódulos (10 pacientes). (Anexo 2, imágenes 1 y 2).



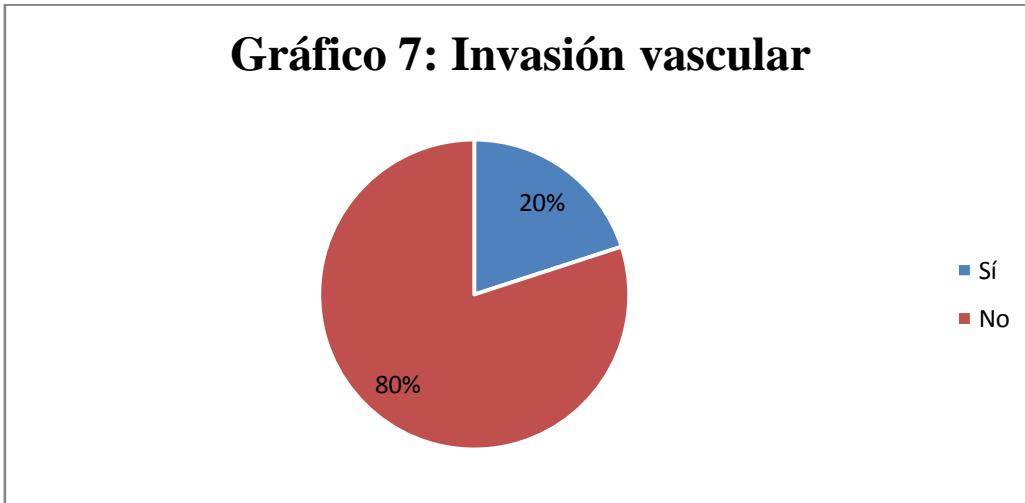
La necrosis en el hepatocarcinoma no es un hallazgo constante ya que únicamente tres de los casos estudiados la presentan (15% del total) frente a 17 casos que no cuentan con ella (85%). Esta necrosis puede ser propia de la enfermedad, como presentaba uno de los casos (5% del total), o iatrogénica a causa de la quimioembolización del tumor, lo cual se puede observar en 2 de los casos estudiados (10% del total). El resto de los pacientes no presentaban necrosis. (Anexo 2, imágenes 7 y 11).

Gráfico 6: Presencia de necrosis



Es importante para establecer la agresividad de un tumor valorar la invasión vascular ya que tiene una gran relevancia a nivel pronóstico. En nuestro caso, 4 de los pacientes estudiados presentaban invasión vascular lo cual supone el 20% de la muestra. (Anexo 2, imagen 12).

Gráfico 7: Invasión vascular



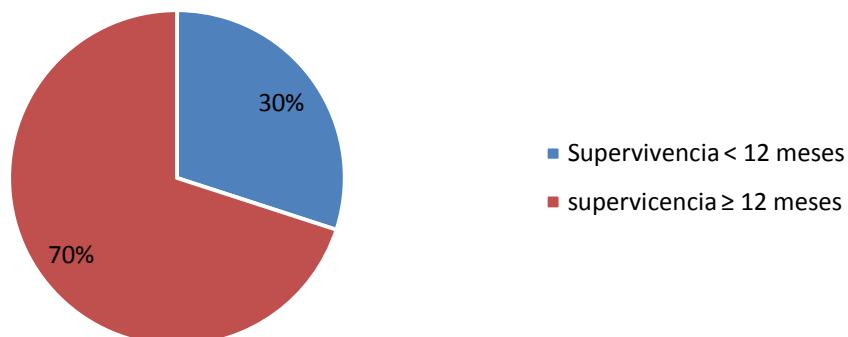
De los casos de invasión vascular cabe destacar que todos eran multifocales a excepción de uno de ellos, coincidente con el hepatocarcinoma fibrolamellar. (Anexo 2, imagen 6).

Como última característica anatomopatológica, la presencia de cápsula periférica es un criterio importante a la hora del diagnóstico y las indicaciones del tratamiento del hepatocarcinoma, sin embargo, ninguno de los casos a estudio la presentaba.

5.4 Descripción de las características de mortalidad en relación con los hepatocarcinomas de los pacientes a estudio

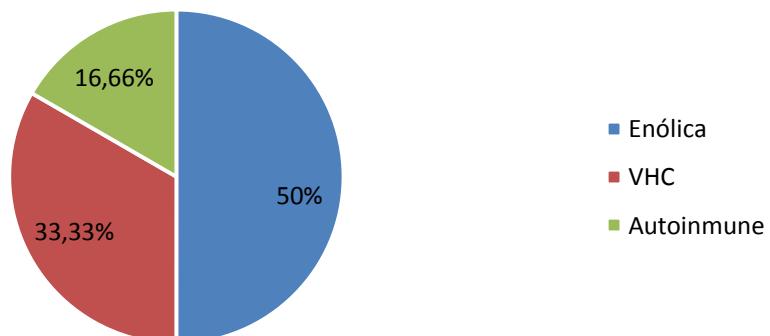
En nuestra muestra, 6 de los pacientes fallecieron en los 12 meses posteriores al trasplante, lo cual supone una mortalidad del 30% durante el primer año.

Gráfico 8: Supervivencia postrasplante



En cuanto a la mortalidad en según la etiología, de los 6 fallecidos en los primeros 12 meses postrasplante, encontramos 3 casos de causa enólica (50%), dos casos por infección crónica por virus de la hepatitis C (33,3%) y un caso de hepatitis autoinmune (16,6%), todos ellos con cirrosis.

Gráfico 9: Mortalidad según etiología



En relación a la agresividad del tumor:

- 5 de los fallecidos presentaban un grado histológico 1 y el caso restante presentaba un grado 2. En cifras totales, el 33,33% de los G1 y el 25% de los G2 de los pacientes incluidos en la muestra han fallecido en el primer año postrasplante.
- Según el número de nódulos: 4 de los casos presentaban un hepatocarcinoma multinodular, mientras que dos de ellos únicamente presentaban un nódulo. En cifras totales, el 25% de los casos multinodulares y el 50% de los casos con un único nódulo han fallecido en el primer año postrasplante.
- Solamente uno de los casos presentaba invasión vascular. En cifras totales, el 50% de los casos con invasión vascular han fallecido en el primer año.

El 100% de los pacientes fallecidos eran mayores de 50 años y varones a excepción de un caso que era una mujer la cual asociaba componente autoinmune.

En resumen, las características de los pacientes con una supervivencia inferior a 12 meses son las siguientes:

- Tres varones mayores de 50 años con CHC de etiología enólica, los tres casos multinodulares y sin invasión vascular:
 - Dos de ellos grado 1 (33,33%)
 - Uno de ellos grado 2 (16,66%),
- Dos varones mayores de 50 años con CHC de etiología VHC y grado histológico 1 (33,33%).
 - Un caso multinodular e invasión vascular.
 - Un caso con nódulo único, sin invasión.
- Una mujer mayor de 50 años con CHC de etiología autoinmune, grado histológico 1, nódulo único y sin invasión vascular. (16,66%).

Gráfico 10: Características de mortalidad (1)

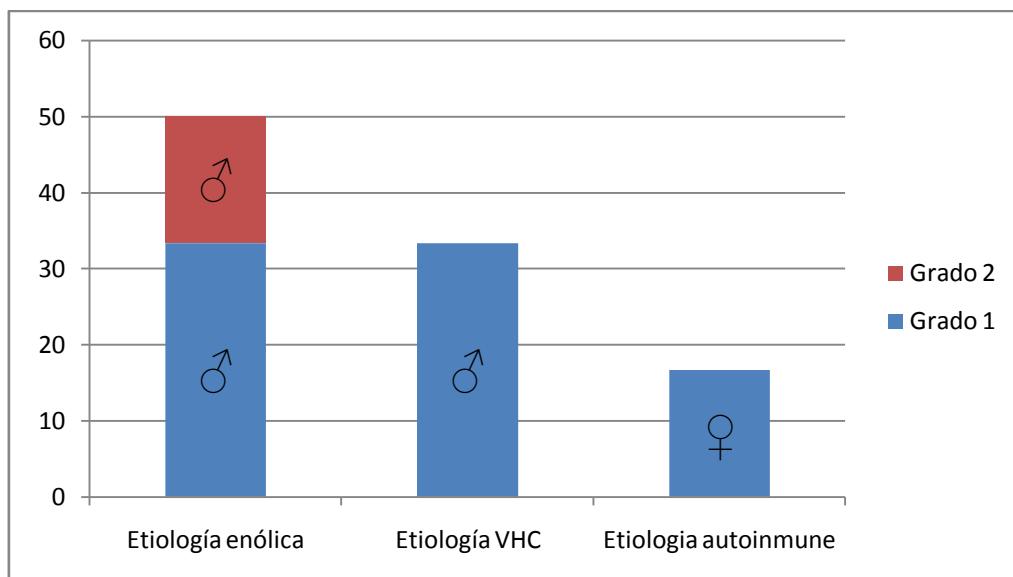
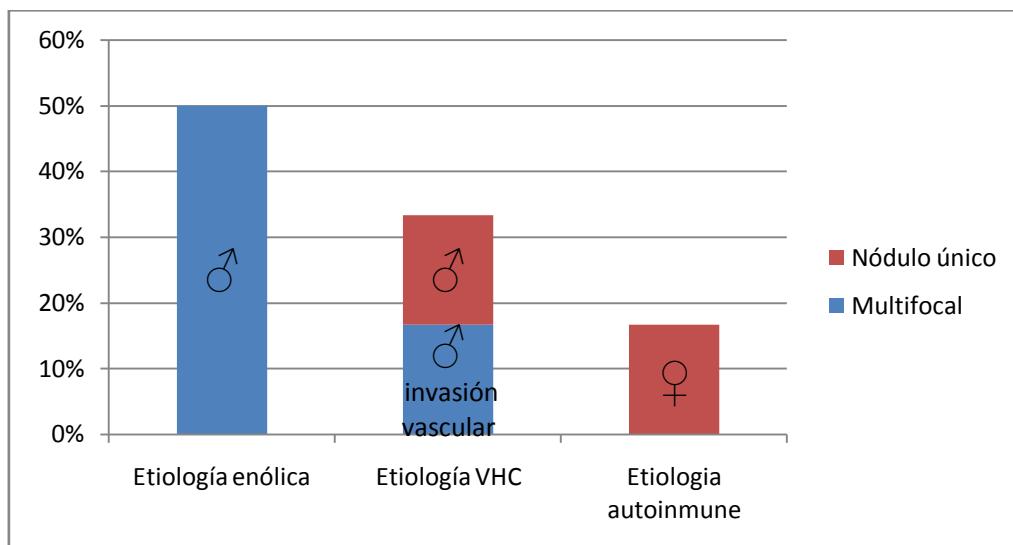


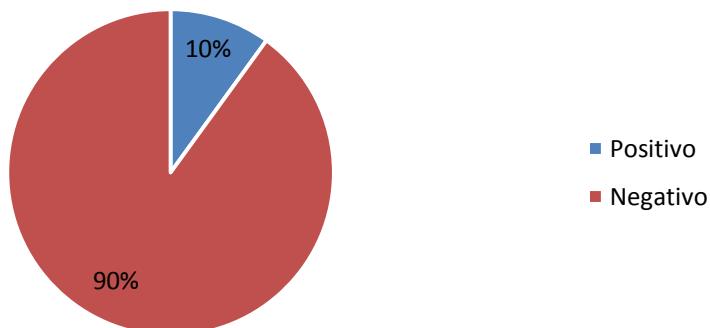
Gráfico 11: Características de mortalidad (2)



5.5 Presencia o ausencia de positividad del marcador inmunohistoquímico C-kit tanto en el hepatocarcinoma como en el tejido peritumoral.

Tras haber analizado las muestras con el microscopio óptico se obtuvieron como resultado a nivel tumoral todas las muestras negativas, mientras que a nivel peritumoral se encontraron 2 casos positivos. Ambos casos con una puntuación de 1 según la escala semicuantitativa de Zhang (0 – 10% de las células teñidas). (Anexo 2, imagen 13).

Gráfico 12: C-kit tejido peritumoral



5.6 Positividad del marcador inmunohistoquímico C-kit en el tejido tumoral como mecanismo de detección los CHC con rasgos de célula madre.

Los negatividad de expresión del marcador c-kit a nivel tumoral, no ha permitido detectar rasgos de célula madre a este nivel.

5.7 Positividad o negatividad del marcador inmunohistoquímico C-kit, tanto en el tejido tumoral como el peritumoral, en relación con un mejor pronóstico de la enfermedad.

Establecemos como marcador de mejor pronóstico una mayor supervivencia y ponemos como punto de corte la supervivencia a los 12 meses tras el trasplante hepático.

Realizamos el análisis epidemiológico en función de expresión c-kit en el tejido peritumoral ya que no se obtuvieron resultados positivos del marcador a nivel tumoral.

Los resultados positivos de c-kit correspondían a un paciente con una supervivencia inferior a 12 meses y a otro paciente con una supervivencia superior a esa cifra. Ambos con un hepatocarcinoma grado 1 y cirrosis. Ninguno presentaba invasión vascular. Las diferencias entre ellos son las siguientes:

- El paciente fallecido era una mujer de 66 años, presentaba un único nódulo tumoral y su patología presenta una etiología autoinmune.
- El paciente superviviente es un varón de 65 años, presentaba 3 nódulos tumorales y su patología se debía a etiología enólica.

6. DISCUSIÓN

Una vez expuestos los resultados de nuestro estudio, se procede al análisis de los mismos y a su comparativa con estudios previos.

Hemos podido observar una mayor prevalencia carcinoma hepatocelular en varones así como un aumento de la incidencia a partir de los 40 años, quedando por debajo de esta edad el carcinoma fibrolamellar. Este último es una variante peculiar del hepatocarcinoma que suele producirse en hombres y mujeres jóvenes, (20-40 años), sin asociación con los factores de riesgo habituales de la cirrosis³. (Anexo 2, imagen 6)

Al hacer una revisión bibliográfica hemos encontrado resultados similares a los observados en el presente estudio, indicando un claro predominio del hepatocarcinoma en varones a nivel mundial³, así como una mayor prevalencia entre los 45 y los 60 años²³.

La presencia de cirrosis parece ser un factor de gran relevancia en el desarrollo del hepatocarcinoma, la bibliografía apunta a que más del 80% de los sujetos afectados de CHC presentan una cirrosis hepática subyacente⁷. En nuestro estudio, el 95% de los casos la presentaba y el 5% restante estaba compuesto por el caso de carcinoma fibrolamellar. Sin embargo, a pesar de que los datos obtenidos en el presente estudio concuerdan con la revisión bibliográfica realizada, estos datos están sesgados. Debemos recordar que la muestra a estudio ha sido seleccionada de la lista de trasplantes hepáticos realizados en el HCU Lozano Blesa entre diciembre de 1998 y abril de 2016. El trasplante de hígado es necesario cuando las funciones de éste están dañadas más allá de la capacidad del cuerpo para regenerarse, por tanto, la mayor parte de los trasplantes que se realizan son de hígados cirróticos²⁴. (Anexo 2, imágenes 9 y 10)

En relación a la etiología, se ha observado un predominio de la etiología enólica seguida muy de cerca de la hepatitis C, siendo menos frecuentes las patologías de tipo autoinmune o el asentamiento del tumor sobre un hígado sano. La bibliografía revisada apunta a que, en los países desarrollados, los factores de riesgo más frecuentemente

asociados con el desarrollo de CHC son la infección crónica por virus de la hepatitis C y el alcoholismo^{6,25}. (Anexo 2, imagen 8)

En cuanto a la etiología autoinmune, en comparación con otras causas, la incidencia de carcinoma hepatocelular es significativamente menor. En los estudios revisados, el hepatocarcinoma se desarrolla sobre la hepatitis autoinmune crónica cirrosis hepática-dependiente²⁶ ya que, 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 alcohólica²⁷. Estos datos son acordes a los resultados observados ya que únicamente un 5% de la muestra cuenta con etiología autoinmune y en ella se ha observado cirrosis hepática. En la bibliografía se hace referencia a una mayor incidencia de cirrosis secundaria a hepatitis autoinmune en el sexo femenino²⁸, lo cual también coincide con los datos de nuestro estudio.

Una de las características a destacar de la muestra estudiada, es la ausencia de cápsula en todos los casos. La presencia o ausencia de cápsula influye en el tratamiento quirúrgico del hepatocarcinoma ya que la presencia de un tumor localizado y encapsulado apoya a la resección de la lesión, mientras que un tumor multifocal e infiltrante apoya al trasplante hepático²⁹. 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.

En lo referente a la mortalidad por carcinoma hepatocelular, se ha observado una mortalidad del 30% en el primer año tras trasplante y las principales causas asociadas a ésta son alcoholismo e infección crónica por virus de la hepatitis C. Estas etiologías corresponden con las causas más prevalentes de hepatocarcinoma observadas tanto el estudio como en la bibliografía, dato ya señalado anteriormente.

Nuestro estudio apunta a una mayor mortalidad asociada a los hepatocarcinomas grado uno y con un único nódulo frente a los tumores menos diferenciados histológicamente y con multifocalidad. Sin embargo, tras la revisión bibliográfica, estos datos pueden explicarse debido a que características como la diferenciación histológica, el tamaño de la lesión y la multifocalidad, aunque no son excluyentes, sí son aspectos determinantes a la hora de rechazar el tratamiento

quirúrgico del CHC e instaurar únicamente tratamiento sistémico³⁰. Por ello, podemos apuntar, que todos los casos a estudio pertenecen a pacientes con patología hepática en estadios iniciales e intermedios de carcinoma hepatocelular que incluyan el trasplante hepático como método terapéutico, quedando excluidos estadios avanzados de la enfermedad con una presumible mayor mortalidad, que únicamente reciben tratamiento paliativo.

La expresión del marcador inmunohistoquímico c-kit solo se ha producido en dos de los casos estudiados y esta expresión ha sido a nivel peritumoral. (Anexo 2, imagen 13). La ausencia de tinción a nivel tumoral, según los datos encontrados, se debe a la escasa prevalencia de la sobreexpresión de este marcador en los hepatocarcinomas ya que hay estudios que apuntan a una frecuencia de tan solo el 2,3%²⁰.

En nuestro estudio se ha realizado la técnica inmunohistoquímica con c-kit en 20 hepatocarcinomas convencionales. De acuerdo con la literatura, un subtipo de hepatocolangiocarcinomas tiene rasgos de célula madre, sin embargo los hepatocolangiocarcinomas suponen menos del 1% de los tumores primarios hepáticos¹⁴. Probablemente, si en vez de haber realizado el estudio en hepatocarcinomas convencionales lo hubiésemos realizado en hepatocolangiocarcinomas hubiésemos encontrado un mayor porcentaje de neoplasias con rasgos de célula madre.

La relación entre la positividad del marcador C-kit en el tejido tumoral y los CHC con rasgos de célula madre no ha podido ser demostrada en nuestro estudio debido a la baja frecuencia de expresión de dicho marcador. A pesar de ello, diversos estudios han comprobado que c-kit es un marcador de célula madre^{9,10}, y este marcador es expresado en algunos tipos de hepatocarcinoma influyendo en el desarrollo y pronóstico de la enfermedad^{19,21,22}.

Basándonos únicamente en los dos datos positivos obtenidos, el estudio analítico señalaría la positividad del marcador c-kit como factor de mal pronóstico en cuanto a supervivencia en el CHC. Estos resultados son contrarios a los obtenidos en la revisión bibliográfica que habla de una mayor supervivencia por parte de los pacientes cuyos hepatocarcinomas expresan c-kit en comparación con los pacientes cuyos tumores no lo expresan¹⁹.

Finalmente, el estudio de contraste de hipótesis determinó que no hay suficiente significación estadística para afirmar que los resultados obtenidos en nuestro estudio en lo referente a la expresión de c-kit sean valorables. Es decir, estos datos no proporcionan la suficiente evidencia como para determinar que la positividad del marcador inmunohistoquímico c-kit es un marcador de mal pronóstico.

7. CONCLUSIONES

1. La expresión del marcador inmunohistoquímico c-kit solo se ha producido en dos de los veinte casos estudiados (10%) y esta expresión ha sido inferior al 10% de las células del tejido peritumoral, siendo totalmente negativa su expresión a nivel tumoral. Con estos resultados podemos valorar una escasa prevalencia de sobreexpresión de este marcador en hepatocarcinomas.
2. En el estudio de hepatocarcinomas convencionales es poco probable encontrar aquellos que proceden de células madre. Probablemente un estudio de hepatocolangiocarcinomas tuviese como resultado un mayor porcentaje de neoplasias con rasgos de célula madre, siendo difícil este estudio debido a la baja incidencia de este tipo de tumor.
3. En cuanto al pronóstico, teniendo como única base los datos obtenidos en el presente estudio, se señala la positividad del marcador c-kit como factor de mal pronóstico en relación a la supervivencia de los pacientes con CHC, resultados que son contrarios a los datos bibliográficos revisados. Los resultados de nuestro estudio no cuentan con la suficiente significación estadística para respaldar su veracidad. Probablemente estos resultados sean debidos a que la muestra estudiada es insuficiente siendo necesaria la realización de un estudio con mayor número de casos para poder disponer de datos más homogéneos y contrastables.
4. El hepatocarcinoma es un tumor de elevada incidencia en determinados grupos de riesgo como son alcohólicos y pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C.
5. La presencia de este tumor es más frecuente en el sexo masculino y en edades medias de la vida.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. 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
2. Tornesello ML, Buonaguro L, Izzo F, Buonaguro FM. Molecular alterations in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C infections. *Oncotarget*. 2016 Mar; 7 (18) : 25087-102.
3. Kumar V, Abbas BK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, versión en español. 7^a ed. Madrid: Elsevier; 2005.
4. El-Serag HB, Kanwal F, Richardson P, Kramer J. Risk of Hepatocellular Carcinoma after Sustained Virologic Response in Veterans with HCV-infection. *Hepatology*. 2016 Mar; 1527-3350
5. Pin N, Guerrero A, Delgado A. Hepatocarcinoma: estado actual. *Galicia Clin* 2014; 75 (4): 171-181
6. Vilana R, Forner A, García Á, Ayuso C, Bru C. Carcinoma hepatocelular: diagnóstico, estadificación y estrategia terapéutica. *Revista Española de Radiología*. 2010;52(5):385–398.
7. 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
8. Tian L, Deshmukh A, Ye Z, Jang YY. Efficient and Controlled Generation of 2D and 3D Bile Duct Tissue from Human Pluripotent Stem Cell-Derived Spheroids. *Stem Cell Rev*. 2016 Apr 30.
9. Prósper F., Verfaillie C.M. Células madre adultas. *Anales Sis San Navarra*. 2003; 26(3): 345-356.
10. Facciorusso A, Antonino M, Del Prete V, Neve V, Scavo MP, Barone M. Are hematopoietic stem cells involved in hepatocarcinogenesis? *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3(4):199-206.
11. Fresno M. F. Determinación inmunohistoquímica de CD117/c-kit en el GIST (tumor estromal gastrointestinal). *Oncología (Barc.)*. 2004 Abr; 27(4): 114-117

12. Xu RH1, Zheng LY, He DL, Meng J, Xia LP, Hao XB, Zhang ZZ. Profiling of differentially expressed microRNAs (miRNAs) during differentiation of rat hepatic oval cells (HOCs) into hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Clin Transl Oncol.* 2015 Mar;17(3):230-7
13. Tume LF. La inmunoterapia en la búsqueda de antígenos contra las células madre del cáncer. *Inmunología.* 2014;33(3):96–109
14. Gómez-Mateo MC , Bucio-Jaime R, Cabezas-Macián M, Sabater-Ortí L, Ferrández-Izquierdo A. Hepatocolangiocarcinoma combinado. Claves para su diagnóstico anatomo-patológico. *Rev Esp Patol.* 2013;46(2):73-78
15. Mansuroglu T, Baumhoer D, Dudas J, Haller F, Cameron S, Lorf T, Füzesi L, Ramadori G. Expression of stem cell factor receptor c-kit in human nontumoral and tumoral hepatic cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Oct;21(10):1206-11.
16. Kwon YC, Bose SK, Steele R, Meyer K, Di Bisceglie AM, Ray RB, Ray R. Promotion of Cancer Stem-Like Cell Properties in Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes. *J Virol.* 2015 Nov;89(22):11549-56
17. Kara B, Doran F, Kara IO, Akkiz H, Sandikci M. Expression of c-kit protooncogen in hepatitis B virus-induced chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: has it a diagnostic role? *Int J Clin Pract.* 2008 Aug;62(8):1206-11.
18. Chatzipantelis P, Lazaris AC, Kafiri G, Papadimitriou K, Papathomas TG, Nonni A, Patsouris ES. Cytokeratin-7, cytokeratin-19, and c-Kit: Immunoreaction during the evolution stages of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res.* 2006 Nov;36(3):182-7
19. Chung CY, Yeh KT, Hsu NC, Chang JH, Lin JT, Horng HC, Chang CS. Expression of c-kit protooncogene in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2005 Jan 20;217(2):231-6.
20. Becker G, Schmitt-Graeff A, Ertelt V, Blum HE, Allgaier HP. CD117 (c-kit) expression in human hepatocellular carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2007 Apr;19(3):204-8.
21. Llovet JM. Pathological and molecular changes in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2290.

22. Stotz M, Gerger A, Haybaeck J, Kiesslich T, Bullock MD, Pichler M. Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma: Past, Present and Future. *Anticancer Res.* 2015 Nov;35(11):5737-44.
23. Myers RP, Krajden M, Bilodeau M, Kaita K, Marotta P, Peltekian K, Ramji A, Estes C, Razavi H, Sherman M. Burden of disease and cost of chronic hepatitis C infection in Canada. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2014 May;28(5):243-50.
24. Lladó L, Bustamante J. IV Consensus Meeting of the Spanish Society of Liver Transplantation 2012. Exceptions to Model for End-stage Liver Disease in prioritizing liver transplantation. *Gastroenterol Hepatol.* 2014;37: 83-91.
25. 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 Jul 28; 20(28): 9270–9280.
26. Teufel A1, Weinmann A, Centner C, Piendl A, Lohse AW, Galle PR, Kanzler S. Hepatocellular carcinoma in patients with autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2009 Feb 7;15(5):578-82.
27. Wong RJ, Gish R, Frederick T, Bzowej N, Frenette C. Development of hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis patients: a case series. 2011 Feb;56(2):578-85.
28. 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 Apr; 15(4): e26459.
29. 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 Feb;95(5):e2722.
30. Pin N, Guerrero A, Delgado M. Hepatocarcinoma: estado actual. *Galicia Clin* 2014; 75 (4): 171-181.

ANEXO 1

Tabla 1: muestra seleccionada

Sexo	Edad	Virus/patología	Cirrosis	Grado CHC	Nº nódulos	Necrosis	Cápsula	Inv. vascular	Fecha TOD	Éxitus
V	47	VHC	SÍ	G1	22	NO	NO	SÍ	16/09/2010	
V	64	ENÓLICA	SÍ	G1	2	NO	NO	NO	04/10/2010	
V	52	ENÓLICA	SÍ	G1	MULTIFOCAL	NO	NO	NO	13/10/2010	
M	24	HÍGADO SANO	NO	FIBROLAMELAR	1	NO	NO	SÍ	11/01/2011	06/09/2013
M	58	VHC	SÍ	G1	MULTIFOCAL	NO	NO	NO	21/01/2011	
V	50	VHC	SÍ	G1	MULTIFOCAL	SÍ	NO	SÍ	22/01/2011	21/11/2011
V	61	VHC	SÍ	G1	2	NO	NO	NO	13/05/2011	
V	63	ENÓLICA	SÍ	G2	4	NO	NO	NO	06/06/2011	
V	62	VHC	SÍ	G2	6	NO	NO	SÍ	03/09/2011	
V	50	VHC	SÍ	G1	3	NO	NO	NO	23/12/2011	
V	55	ENÓLICA	SÍ	G2	MULTIFOCAL	NO	NO	NO	24/12/2011	
M	66	COMP. AUTOINMUNE	SÍ	G1	1	SÍ, IATROGÉNICA	NO	NO	06/04/2012	23/07/2012
V	65	ENÓLICA	SÍ	G1	3	NO	NO	NO	24/05/2012	
V	51	VHC	SÍ	G1	1	NO	NO	NO	30/09/2012	
V	65	ENÓLICA	SÍ	G2	7	NO	NO	NO	14/09/2012	16/06/2013
V	50	ENÓLICA	SÍ	G1	3	NO	NO	NO	31/01/2013	23/07/2013
V	56	ENÓLICA	SÍ	G1	MULTIFOCAL	NO	NO	NO	16/02/2013	
V	64	ENÓLICA	SÍ	G1	MULTIFOCAL	NO	NO	NO	26/03/2013	14/06/2013
V	54	VHC	SÍ	G1	1	NO	NO	NO	02/04/2013	23/08/2013
V	44	VHC+ ENÓLICA	SÍ	G1	2	SÍ, IATROGÉNICA	NO	NO	26/06/2016	

ANEXO 2

Imagen 1: hepatocarcinoma nódulo único sobre hígado cirrótico



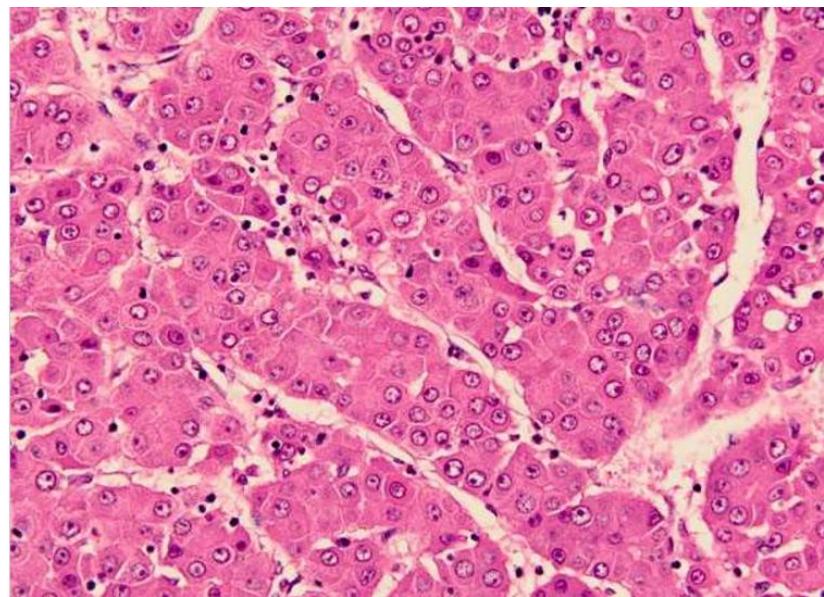
Fuente: Servicio de AP HCULB

Imagen 2: hepatocarcinoma multifocal sobre hígado cirrótico



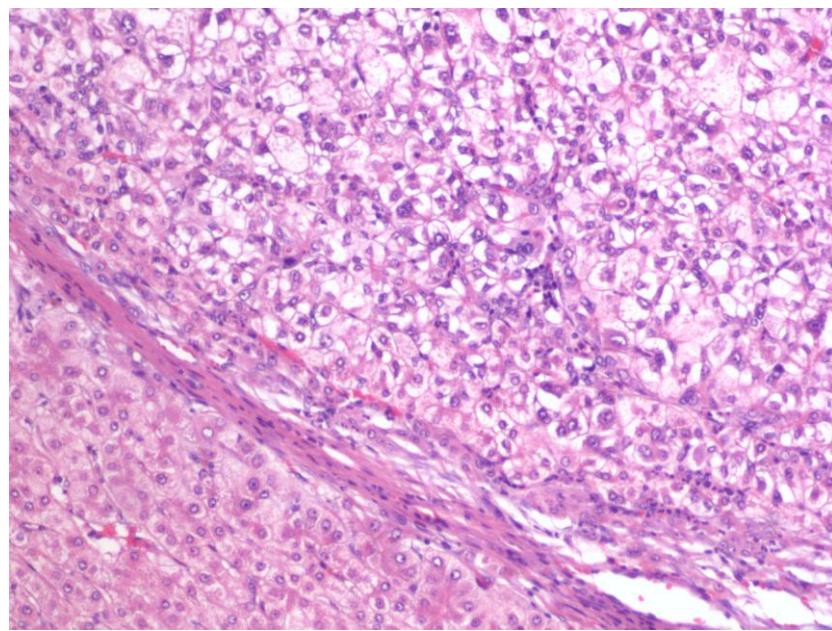
Fuente: Servicio AP HCULB

Imagen 3: hepatocarcinoma bien diferenciado, patrón trabecular



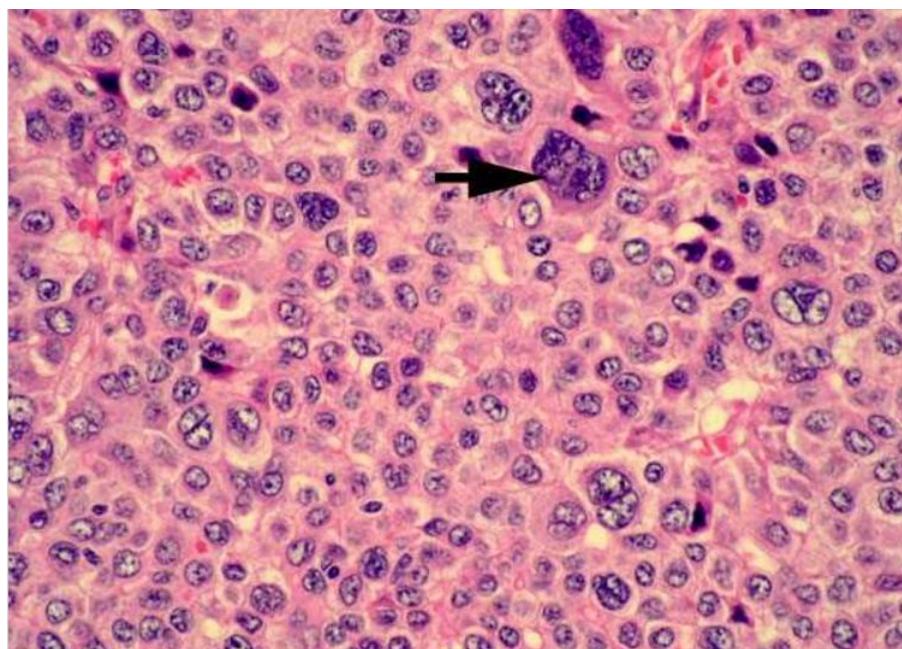
Fuente: Servicio de AP HCULB

Imagen 4: hepatocarcinoma moderadamente diferenciado, variante de células claras



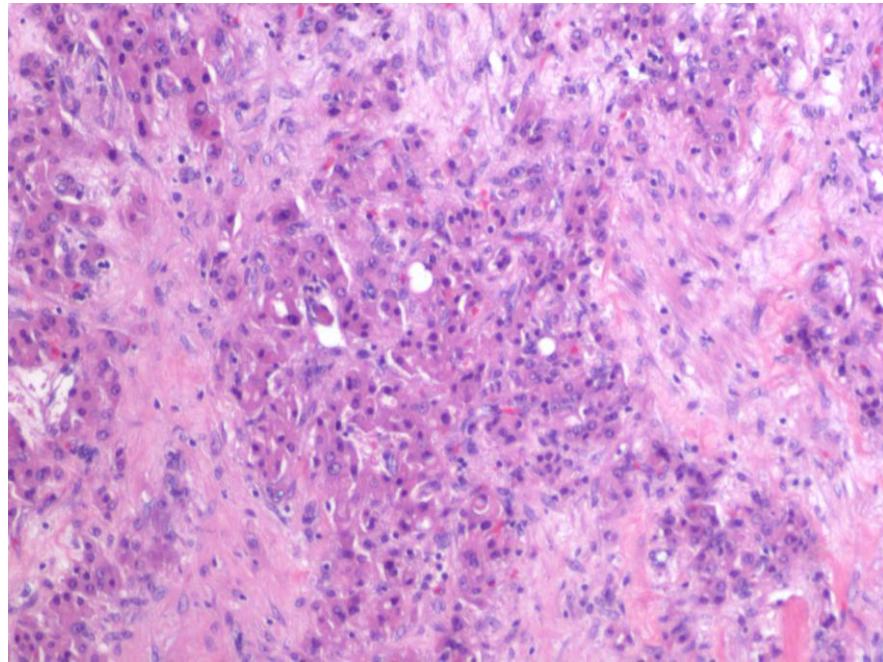
Fuente: Servicio de AP HCULB

Imagen 5: hepatocarcinoma anaplásico de células gigantes (flecha)



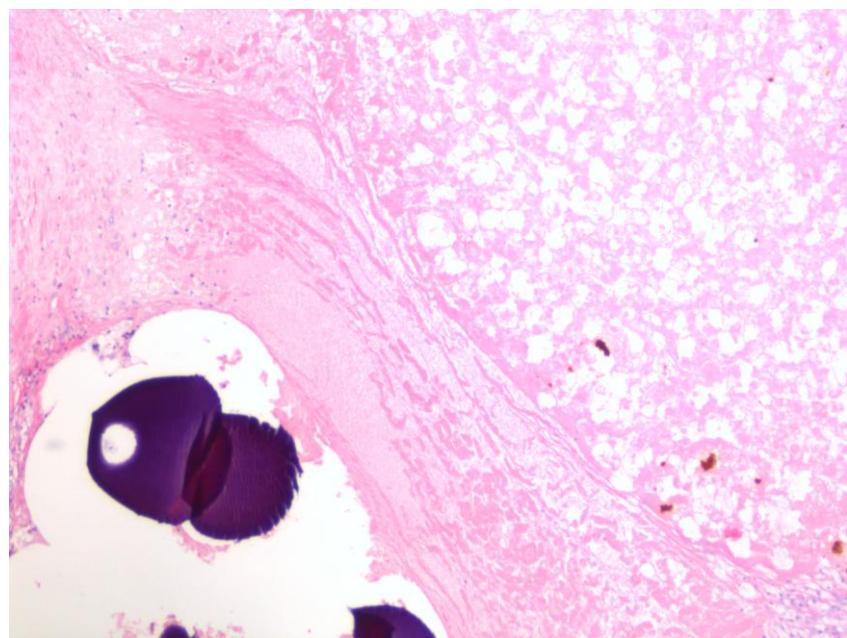
Fuente: Pathpedia

Imagen 6: hepatocarcinoma fibrolamelar



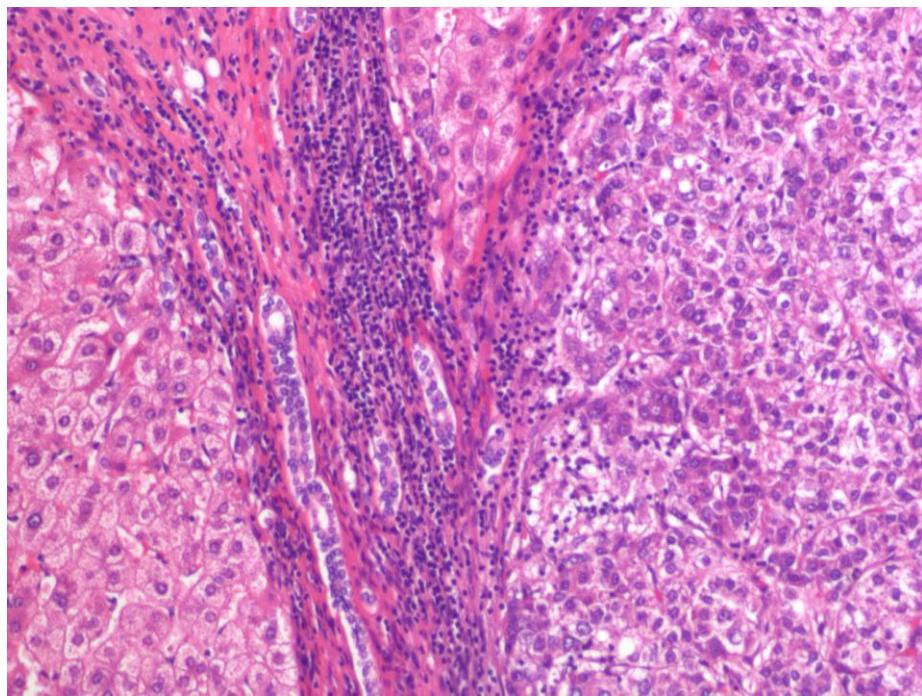
Fuente: Servicio AP HCULB

Imagen 7: hepatocarcinoma con necrosis por quimioembolización



Fuente: Servicio AP HCULB

Imagen 8: hepatocarcinoma sobre hígado con cirrosis por VHC



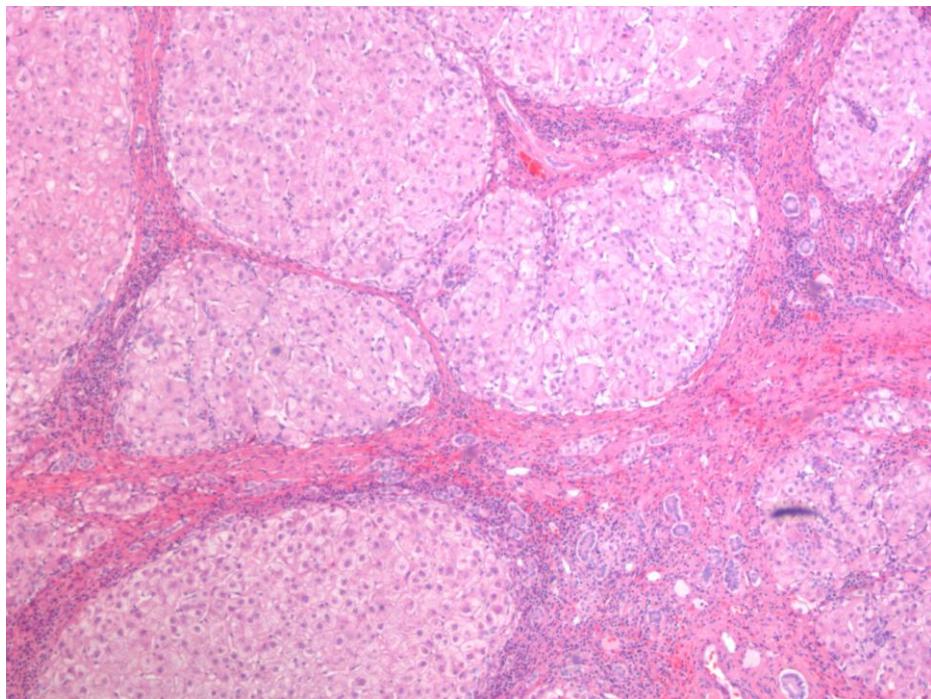
Fuente: Servicio AP HCULB

Imagen 9: hígado cirrótico, imagen macroscópica



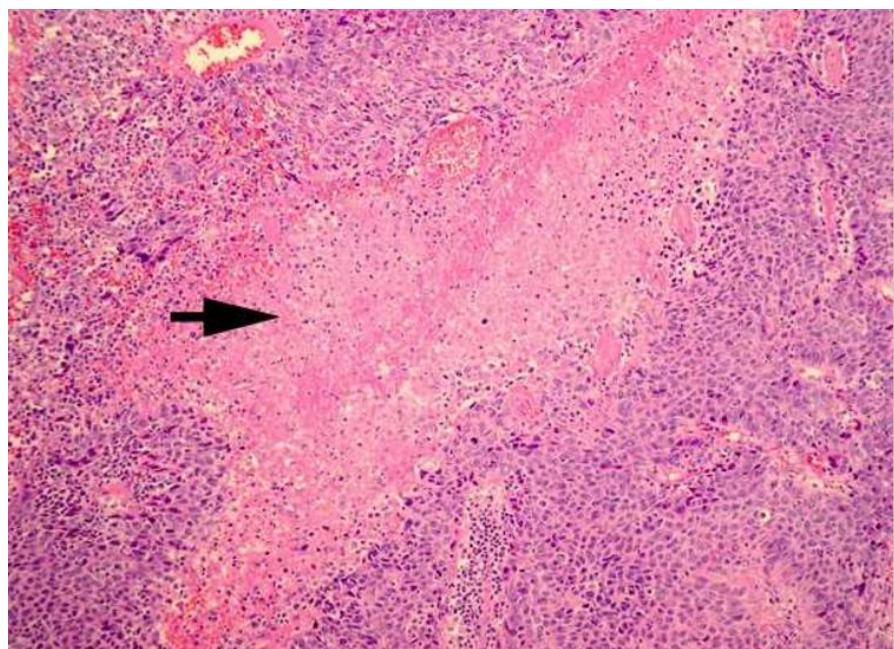
Fuente: Servicio AP HCULB

Imagen 10: nódulos de cirrosis



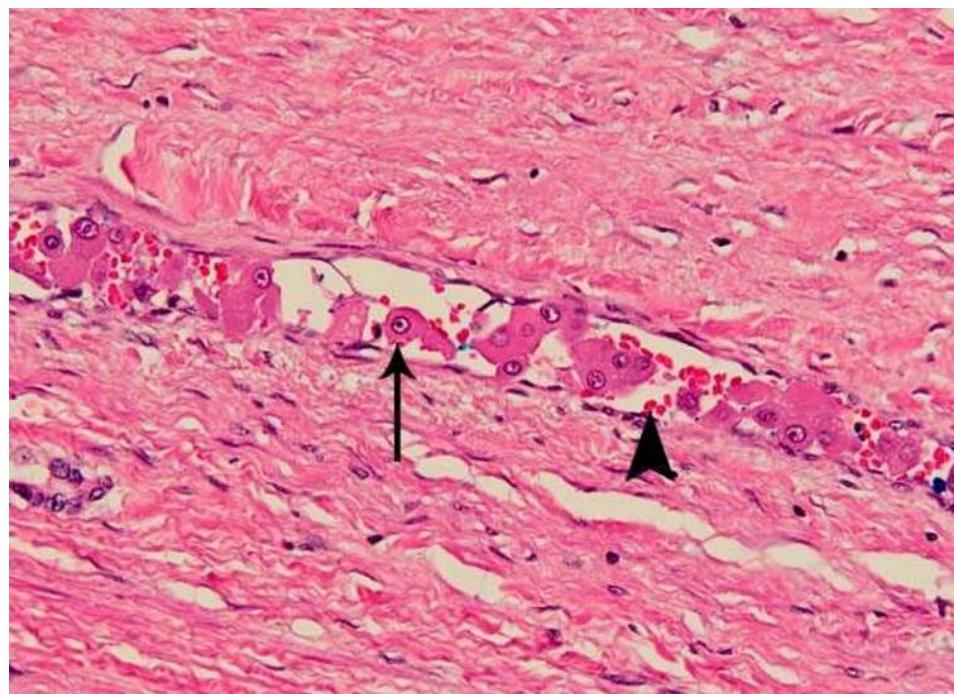
Fuente: Servicio AP HCULB

Imagen 11: hepatocarcinoma con necrosis a causa del tumor (flecha)



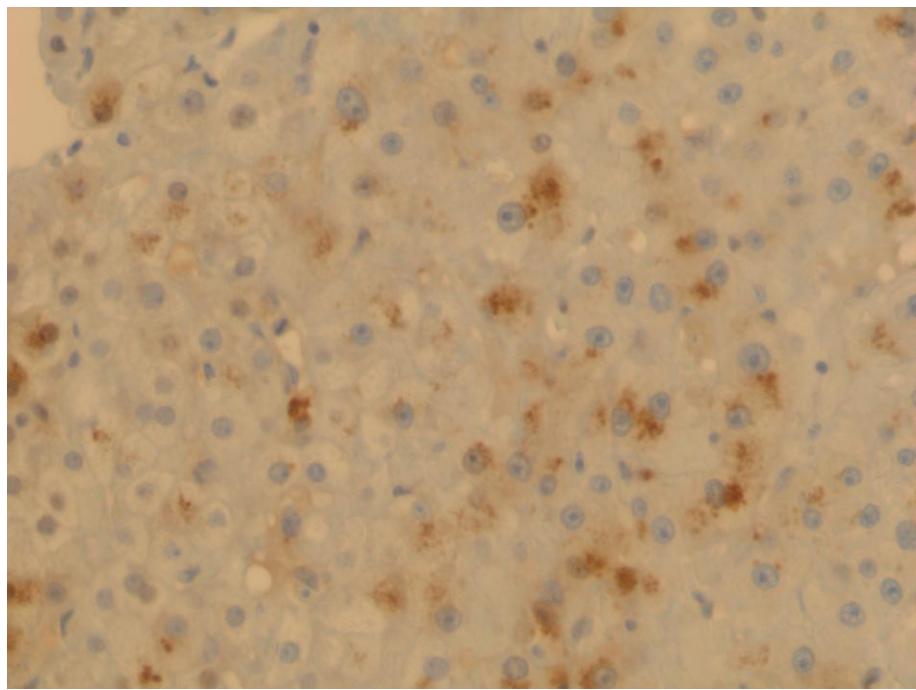
Fuente: Pathpedia

Imagen 12: hepatocarcinoma con invasión vascular, células tumorales (flecha larga) y hematíes (flecha corta) dentro de un vaso sanguíneo.



Fuente: Pathpedia

Imagen 13: C-kit positivo en tejido peritumoral



Fuente: Servicio AP HCULB