



## Hepatocarcinoma. Epidemiología y diagnóstico con enfoque molecular (Hepatocarcinoma. Epidemiology and diagnosis with a molecular approach)

Gisela Romero Sanquiz<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2018-4703>

<sup>1</sup>Profesora Titular de la Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 25 de Mayo 2021

Aceptado: 10 de Junio 2021

### RESUMEN

Uno de los mayores desafíos que enfrentan los investigadores en el área de la Hepatología, es el reconocimiento de factores de riesgo y predictores del desarrollo del hepatocarcinoma, para así poder trabajar en su prevención. En la actualidad la evidencia se centra en el estudio de factores moleculares del tumor que permitan demostrar su capacidad de progresión, para utilizarlos como marcadores predictores y hasta para clasificarlos y así instaurar medidas terapéuticas en estadios precoces. El carcinoma hepatocelular (HCC) representa aproximadamente el 90% de todos los casos de Cáncer Primario del Hígado. Es la segunda causa principal de muerte relacionada con el cáncer a nivel mundial y tiene una incidencia de 850.000 nuevos casos por año. Los principales factores de riesgo para desarrollar HCC son bien conocidos e incluyen la infección por los virus de la hepatitis B y C, la Enfermedad Grasa del Hígado por Disfunción Metabólica como recientemente se denominó, la ingesta de alcohol y la ingestión del metabolito fúngico aflatoxina B1. Se han identificado mutaciones durante las investigaciones que se han realizado sobre la patogénesis molecular del HCC que aun las más prevalentes no constituyen objetivos farmacológicos. La clasificación molecular del HCC no se ha establecido aun y la Clasificación de BCLC - Barcelona Clinic Liver Cancer es el principal algoritmo para la estratificación de pacientes según pronóstico y asignación de tratamiento. Los programas de vigilancia permiten la detección de tumores en estadio temprano que son susceptibles de terapias curativas: resección, trasplante de hígado o ablación local. Para ello se investigan biomarcadores para la terapia según la estratificación, estrategias adaptadas al paciente dirigidas a mutaciones impulsoras y / o activación de cascadas de señalización.

**Palabras claves:** hepatocarcinoma, epidemiología, vigilancia, biomarcadores, estrategias diagnósticas.

### ABSTRACT

One of the greatest challenges faced by researchers in Hepatology is the recognition of risk factors and predictors of the development of Hepatocarcinoma, in order to work on its prevention. Currently, the evidence is focused on the study of molecular factors of the tumor that allow demonstrating its ability to progress, to use them as predictive markers and even to classify them and thus establish therapeutic measures in early stages. Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for approximately 90% of all Primary Liver Cancer cases. It is the second leading cause of cancer-related death worldwide and has an incidence of 850,000 new cases per year. The main risk factors for developing HCC are well known and include infection by the hepatitis B and C viruses, Fatty Liver Disease due to Metabolic Dysfunction as it was recently called, alcohol intake and ingestion of the fungal metabolite aflatoxin B1. Mutations have been identified during research on the molecular pathogenesis of HCC that even the most prevalent ones are not pharmacological targets. The molecular classification of HCC has not yet been established and the BCLC - Barcelona Clinic Liver Cancer Classification is the main algorithm for stratifying patients according to prognosis and treatment assignment. Surveillance programs allow the detection of early-stage tumors that are amenable to curative therapies: resection, liver transplantation, or local ablation. To do this, biomarkers for therapy are investigated according to stratification, patient-adapted strategies aimed at driving mutations and / or activation of signaling cascades.

**Key words:** Hepatocarcinoma, epidemiology, surveillance, biomarkers, diagnostic strategies.

**Autor de correspondencia:** Gisela Romero-Sanquiz. Facultad de Medicina. Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela, correo electrónico: [romerogisela01@gmail.com](mailto:romerogisela01@gmail.com)

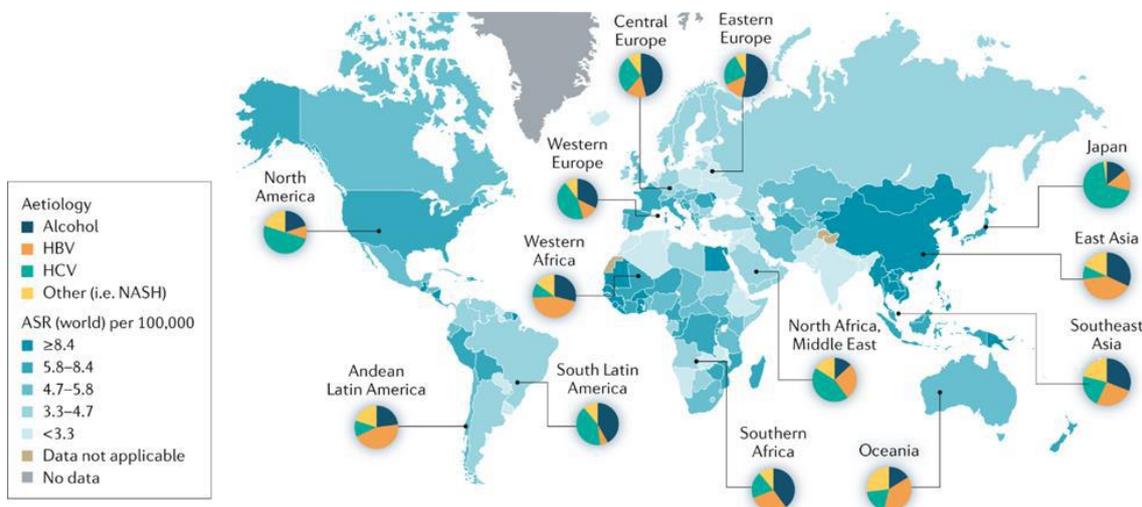


### **Epidemiología y factores de riesgo para el desarrollo del hepatocarcinoma.**

El HCC es el quinto cáncer más común del mundo y la segunda causa de mortalidad relacionada con el cáncer. Según lo estimado por la Organización Mundial de la Salud en 2012, hubo 782.000 casos en todo el mundo, de los cuales el 83% se diagnosticó en regiones menos desarrolladas. Las tasas anuales de incidencia en Asia oriental y subsahariana del África superan los 15 por 100.000 habitantes, mientras que las cifras son intermedias (entre 5 y 15 por 100.000) en la cuenca mediterránea, sur de Europa y América del Norte y muy bajo (por debajo de 5 por 100.000) en el norte de Europa. (1-3) La Vacunación contra el virus de la hepatitis B (VHB) ha dado lugar a una disminución de la incidencia del HCC en países donde este virus fue altamente prevalente. (4) La heterogeneidad se relaciona principalmente con las diferencias en la tasa de exposición a factores de riesgo y tiempo de adquisición y menos con la predisposición genética. Los estudios en poblaciones de migrantes han demostrado que la primera generación de inmigrantes presenta una alta incidencia de HCC como las de sus países de origen, pero en las generaciones posteriores la incidencia disminuye. (5) La edad a la que aparece el HCC varía según sexo, zona geográfica y factor de riesgo asociados con el desarrollo del cáncer, así tenemos que en países de alto riesgo con alta prevalencia del VHB, la edad media en el momento del diagnóstico es menor de 60 años. (6-13) En áreas intermedias o de baja incidencia, la mayoría de los casos aparecen más allá de 60 años. En los países africanos y asiáticos, el diagnóstico de HCC a edades más tempranas se atribuye a una sinergia entre el VHB y la Aflatoxina de la dieta, que induce mutaciones en el gen TP53 y otros factores tales como la mutagénesis insercional pudiesen influir en el desarrollo de HCC a edades más tempranas (13,14). En todas las áreas, los hombres tienen una mayor prevalencia que las mujeres, la proporción de sexos suele oscilar entre 2: 1 y 4: 1, y en la mayoría de las áreas, la edad al momento del diagnóstico en las mujeres es mayor que en los hombres. (1,3) La Testosterona es un regulador positivo de los reguladores del ciclo celular de los hepatocitos, que, a su vez, acelera la hepatocarcinogénesis. Por el contrario, el estradiol suprime los reguladores del ciclo celular por lo tanto suprimir el desarrollo de cáncer de hígado. (1,9) La incidencia de HCC ha aumentado rápidamente en Estados Unidos durante los últimos 20 años. (10) Según los estudios epidemiológicos del programa de vigilancia (SEER) del National Cancer Institute (NCI), Estados Unidos presento unos 39.230 casos de HCC (7) y 170 HCC muertes en 2016. Además, un reciente estudio utilizando el registro SEER proyecta que la incidencia de HCC seguirá aumentando hasta 2030, con el mayor aumento en los hispanos, seguido por los afroamericanos y luego los caucásicos, con una disminución observada entre los asiáticos americanos. (10,11,13) La cirrosis preexistente, se encuentra en más del 80% de los individuos diagnosticados con HCC, (1,3) por lo tanto, cualquier agente etiológico que conduzca a una lesión hepática crónica y, en última instancia, a la cirrosis, debe considerarse como un factor de riesgo de HCC. La asociación entre el consumo de tabaco y el HCC, incluso en presencia de VHB o VHC, ha sido inconsistente. Una causa emergente de HCC es el Síndrome Metabólico, especialmente en pacientes con Obesidad y Diabetes Mellitus tipo 2. MAFLD / NASH pueden ser, junto con la Hepatitis B Crónica, las excepciones a la regla de que el HCC siempre se asocia con enfermedades hepáticas avanzadas con fibrosis o cirrosis. Un estudio reciente sugiere que aproximadamente el 40% de los pacientes con HCC debido a MAFLD o NASH podrían no tener cirrosis hepática.

Las principales causas de cirrosis y, por tanto, de HCC, son Hepatitis B Crónica-VHB, Hepatitis C-VHC, Alcohol y Enfermedad de Hígado Graso por Disfunción Metabólica (MAFLD). Otras condiciones menos prevalentes son las Enfermedades Metabólicas Hereditarias

(Hemocromatosis y Enfermedad de Wilson), Enfermedades Colestáticas Crónicas (Colangitis Biliar Primaria/CBP y Colangitis Esclerosante Primaria/CEP), Hepatitis Autoinmune (1, 13)



**Figura 1. Incidencia del HCC de acuerdo con el área geográfica y la etiología.** La mayor incidencia de carcinoma hepatocelular (CHC) se observa en el este de Asia, y Mongolia presenta la mayor incidencia de CHC en todo el mundo. El virus de la hepatitis B (VHB) es el principal factor etiológico en la mayor parte de Asia (excepto Japón), América del Sur y África; El virus de la hepatitis C (VHC) es el factor causal predominante en Europa Occidental, América del Norte y Japón, y la ingesta de alcohol es el factor etiológico en Europa Central y Oriental. La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la principal etiología incluida en la categoría "Otros", es un factor de riesgo que aumenta rápidamente y se espera que se convierta en la causa predominante de HCC en las regiones de ingresos altos en un futuro próximo. ASR: tasa de incidencia estandarizada por edad. Observatorio Global del Cáncer, Organización Mundial de la Salud, Tasas de incidencia estimadas estandarizadas por edad (Mundo) en 2020, ambos sexos, todas las edades, Copyright (2020) (<https://gco.iarc.fr/today/mapa-de-analisis-en-linea>).

América Latina, una región con una población mayor a 600.000.000 individuos, es muy conocida por su amplia heterogeneidad geográfica, sociocultural y económica. Pocas personas tienen acceso a la asistencia sanitaria, por lo que sigue siendo la principal barrera para la detección de rutina, el diagnóstico temprano y tratamiento adecuado del carcinoma hepatocelular (HCC). Por tanto, la identificación de la población en riesgo, implementación de programas de vigilancia y acceso a tratamientos curativos no están disponibles en la región. Es así, como se han obtenido datos heterogéneos sobre la epidemiología del HCC en Latinoamérica (15,16). El VHC y el alcohol son las etiologías más frecuentes de HCC en la región, el VHB es una causa principal en algunos países, principalmente en Brasil. Más recientemente, se ha observado un cambio de tendencia epidemiológica del HCC hacia un aumento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico, convirtiéndose en una importante carga de salud pública en la región (15, 16). Se ha informado que los programas de vigilancia se aplican en menos del 50% de los pacientes en América Latina (15). Data de Venezuela aportada por Lizarzabal et al., señala que desde 1996, a los recién nacidos y durante el primer año de vida, se administra la vacuna contra la hepatitis B: 14% de la población en 1999 y 78% en 2011 fueron vacunados. A pesar de esto, la incidencia de infección por el virus de la Hepatitis B (VHB) es del 5-15,3%, siendo data obtenida por comunicación personal ya que no



se disponen de datos oficiales (17, 18, 19). La sangre que se recibe en los Bancos del Sangre del país solo es investigada para la detección del VHB, VHC y VIH en el 1% de los casos (17, 18, 19). En mismo país se ha demostrado una incidencia de Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica (EHGNA) entre 14,7 y 40% (17) sin ser datos oficiales. Domínguez M., León R, et al en el periodo 1997 - 2014, reportaron en Venezuela, 190 pacientes con HCC, 88% de los cuales tenían cirrosis, en el 20% de los casos, la etiología fue por Alcohol , en el 31% por VHC, el 22% se debió a VHB, el 75% de los casos presentaban Hipertensión Portal, 52% con varices esofágicas no sangrantes , niveles de AFP > 500 ng/mL: 41%, 100 a 499 ng/mL: 11 %. el estadio C de BCLC fue el más frecuente entre los pacientes, se realizó biopsia del tumor en el 31.9% de los casos y un 46% de los pacientes, recibieron alguna modalidad terapéutica (20).

**Tabla 1.- Vigilancia del carcinoma hepatocelular en Latinoamérica**

Study	Population	Design	Results
Fassio <i>et al</i> <sup>[9]</sup>	n = 240 HCC Brazil, Arg, Colombia, Chile, Uruguay, Venezuela	Prospective cohort (Surveillance retrospectively analyzed)	54% under surveillance; BCLC A 70% vs 39% not under surveillance; No survival analysis
Paranaguá-Vezozzo <i>et al</i> <sup>[10]</sup>	n = 884 Cirrhosis Child A-B Brazil, Sao Paulo	Retrospective cohort US ± AFP annual	HCC annual incidence 2.9%; 75% under annual surveillance; 80% within Milan, better survival
Piñero <i>et al</i> <sup>[11]</sup>	n = 643 Cirrhosis, waiting list for liver transplantation. Argentina	Retrospective cohort Surveillance Failure = incidental HCC in the explant	US accuracy: S 33% and E 99%
Campos Appel-da-Silva <i>et al</i> <sup>[11]</sup>	n = 453 Child A-C Cirrhosis Brazil, Porto Alegre	Retrospective cohort US ± AFP every 6 mo	50.7% under surveillance; More BCLC 0-A vs no screening; Better survival within Milan criteria
Debes <i>et al</i> <sup>[12]</sup>	n = 1336 HCC Brazil, Argentina, Colombia, Peru, Uruguay, Ecuador	Retrospective cohort	47% under surveillance; Better survival vs symptomatic diagnosis (adjusted for lead-time bias)

En la tabla se observan estudios de diferentes autores sobre la Vigilancia del Hepatocarcinoma en países de Latinoamérica (LA). Fassio y colaboradores, en su análisis retrospectivo (n=240) incluyo población Venezolana, del Brazil, Colombia, Argentina, Chile y Uruguay. El 54% de la población estudiada se encontraba en un programa de vigilancia del HCC.

### ¿Qué factores determinan la toma de decisión de que un paciente entre en un programa de vigilancia del HCC?

La decisión se fundamenta en la estimación de riesgo de desarrollar HCC de cada paciente. Se debe tomar en cuenta la edad del paciente, su condición de salud, el estado funcional, la voluntad y la capacidad para cumplir con los requisitos de vigilancia. Un programa de Vigilancia se considera eficaz si proporciona un aumento de la longevidad de alrededor de 100 días (es decir, alrededor de 3 meses). (21). Sarasin et al. (22) en un estudio de cohorte en el que incluyeron pacientes con cirrosis con Child Pugh A, demostraron que la vigilancia aumentaba la longevidad en alrededor de 3 meses si la incidencia de HCC fue del 1,5% / año; si la incidencia fue menor, la vigilancia no prolongó la supervivencia. Lin et al. (21, 22,23) encontraron que la vigilancia con alfa-fetoproteína (AFP) y ultrasonido en EE. UU., era rentable, independientemente de la incidencia de HCC. Por tanto, aunque hay algún desacuerdo entre los modelos publicados, se debe ofrecer vigilancia para pacientes con cirrosis de etiologías variables cuando el riesgo de HCC es del 1,5% / año o mayor e incluir pacientes con Hepatitis B sin cirrosis (1,21, 22, 23).



**La Asociación Americana para el Estudio del Hígado (AASLD), establece las siguientes Declaraciones (1):**

- Los pacientes adultos con cirrosis están en el nivel de más alto riesgo de desarrollar HCC y debe someterse a vigilancia.
  - El riesgo de HCC para pacientes con Cirrosis por VHC que desarrollan Respuesta Viroológica Sostenida (RVS) después del tratamiento con Drogas de acción Directa (DAA) ha bajado, pero no se ha eliminado, y por lo tanto los pacientes con Cirrosis y VHC tratados, deben someterse a vigilancia.
  - El riesgo de HCC es significativamente menor en aquellos con VHC o NAFLD y sin cirrosis en comparación para aquellos con cirrosis, y no se recomienda vigilancia para estos pacientes.
- 1A. La AASLD recomienda la vigilancia de adultos con cirrosis porque mejora en general la supervivencia. Calidad / certeza de la evidencia: moderada. Fuerza de recomendación: Fuerte
- 1B. La AASLD recomienda la vigilancia mediante Ecografía Abdominal, con o sin AFP, cada 6 meses. Calidad / certeza de la evidencia: baja Fuerza de recomendación: condicional.
- 1C. La AASLD recomienda no realizar vigilancia de pacientes con cirrosis a niños, a menos que estén en la lista de espera de trasplantes, dada la baja supervivencia en estos pacientes con Cirrosis infantil.

**Pautas para interpretar los resultados en la ecografía abdominal (1):**

- Se considera negativo si no hay anomalías focales o si se evidencian lesiones definitivamente benignas como quistes.
- Un examen se considera positivo si hay lesiones que miden  $\geq 10$  mm. Se utiliza un umbral de 10 mm porque las lesiones  $< 10$  mm rara vez son malignas. Incluso si son malignas, estos nódulos son difíciles de diagnosticar de manera confiable debido a su pequeño tamaño y, como el paciente está en vigilancia regular, pueden ser seguido de forma segura.

**Papel de los biomarcadores en la vigilancia y diagnóstico del HCC.**

La AFP se considera positiva si su valor es  $> 20$  ng / mL y negativa si es menor. Además de AFP, varios otros biomarcadores han sido evaluados para vigilancia. El Lens culinaris subfracción de unión a lectina de la AFP, o AFP-L3%, mide una subfracción de AFP, ha demostrado ser más específico, aunque generalmente menos sensible que el AFP (24, 25). La des gamma carboxi protrombina (DCP), también llamada deficiente proteína inducida por vitamina K / antagonista-II, una variante de protrombina que también se produce en niveles altos en una proporción de HCC. (24–28) Estos biomarcadores son aprobados por la FDA de EE. UU.

Se ha desarrollado un modelo diagnóstico que incorpora los niveles de cada uno de los tres biomarcadores, AFP, AFP-L3% y DCP, junto con el sexo y la edad del paciente, en el modelo Sexo, Edad, AFP L3%, AFP y DCP - GALAD (24-28). GALAD requiere estudios de fase IV para evaluar su desempeño en una gran cohorte de estudios. El ensayo con biomarcadores, Mutaciones de ADN, regiones metiladas diferencialmente de ADN, microARN, ARN largo no codificante, nativo y proteínas modificadas postraduccionalmente, metabolitos bioquímicos, estudios sobre la expresión diferencial de muchas biomoléculas en los exosomas, liberados de las células tumorales en comparación con los de las células normales, son varias de las investigaciones propuestas para la Vigilancia y Diagnóstico temprano del HCC (29).

A pesar de su alto rendimiento diagnóstico, la Tomografía Computarizada (TC) o Resonancia Magnética de corte transversal, multifase y con contraste, no se recomiendan para la vigilancia del HCC, debido a los pocos datos sobre su eficacia y rentabilidad.



### **Declaraciones de AASLD con relación a la vigilancia del HCC (1).**

- Se han demostrado nuevos biomarcadores, además de la AFP. Existen resultados prometedores en estudios de casos y controles, pero se requiere una mayor evaluación en fase III y IV antes de su uso rutinario.
- La TC y la RM no se recomiendan como métodos primarios.

Es posible que se requiera una biopsia en casos seleccionados, pero su uso rutinario rutina no se sugiere. La biopsia tiene el potencial de establecer un diagnóstico oportuno en los casos en que se deban tomar decisiones terapéuticas; sin embargo, la biopsia tiene el riesgo de hemorragia, siembra tumoral y la posibilidad de que resulte una biopsia negativa.

### **AASLD. Declaraciones ante una lesión hepática (1).**

- Una lesión > 1 cm por ecografía debe llevar a la realización de procedimientos para el diagnóstico de HCC. Si usa AFP, en EE. UU., una AFP > 20 ng / mL debería ser concluyente para el diagnóstico de HCC.
- Deben establecerse criterios estrictos sobre imágenes multifásicas para el diagnóstico no invasivo de HCC en pacientes de alto riesgo. Para TC y RM multifase, las características de imagen clave, incluyen tamaño  $\geq 1$  cm, hiper realce arterial y dependiendo del tamaño, una combinación de lavado, crecimiento umbral y apariencia de la cápsula. Si estos criterios no están presentes, pero se considera HCC u otra neoplasia maligna probable, entonces se debe plantear una biopsia de hígado para el diagnóstico.
- El diagnóstico de HCC no se puede realizar mediante imágenes en pacientes sin cirrosis, aunque el realce arterial y el lavado estén presentes. Se requiere una biopsia hepática en estos casos.
- Los marcadores histológicos GPC3, HSP70 y GS pueden ser evaluados para distinguir displasia de alto grado.

### **Estudios por imágenes para el diagnóstico de HCC.**

Las imágenes desempeñan un papel fundamental en el diagnóstico de HCC. A diferencia de la mayoría de los cánceres sólidos, el diagnóstico de HCC puede establecerse, y así, indicar el tratamiento adecuado, basado en imágenes no invasivas sin confirmación de biopsia. Incluso cuando se necesita una biopsia, las imágenes generalmente se requieren como guía. La AFP y otros biomarcadores séricos generalmente tienen un papel menor en el diagnóstico del HCC. Desde el año 2011, el American College of Radiology ha publicado pautas sobre cómo se deben realizar los exámenes de TC y RM de múltiples fases, interpretado e informado a través de su sistema de datos e informes de imágenes CT / MRI del hígado (CT / MRI LI-RADS). En el sistema de informes y datos de imágenes hepáticas (LI-RADS), lesiones o pseudolesiones > 10 mm visibles en exámenes multifásicos se les asignan códigos de categoría que reflejan su probabilidad de ser benigno, HCC u otra enfermedad hepática neoplasia maligna como el colangiocarcinoma (CCA) o HCC-CCA combinado. (1, 2, 21). LI-RADS 1 y LI-RADS 2 indican que se tratan de lesiones definitiva y probablemente benignas, respectivamente. LI-RADS 3 indica una baja probabilidad de HCC. Un ejemplo común es una pequeña área nodular, de hiper realce de la fase arterial, que no es está presente en otras fases. El diagnóstico diferencial incluye entidades benignas y malignas, como pseudo lesiones vasculares, generalmente atribuidas a derivaciones arterio-portales y pequeños HCC. Otro ejemplo es un nódulo sólido con las características de imagen para el diagnóstico de HCC. LI-RADS 4 indica probable HCC. Un ejemplo es una lesión encapsulada  $\geq 2$  cm con fase arterial hiper realce, pero sin "lavado". Una lesión de  $\geq 2$  cm que realza al mismo grado que el hígado en la fase arterial, pero realza



menos o presenta hipo realce en las fases post arteriales, el diagnóstico de HCC es probable, pero no definitivo, dado que el diagnóstico diferencial incluye nódulo displásico, otras entidades benignas y rara vez no es HCC. LI-RADS 5 indica definitivo para HCC. Es importante destacar que los criterios de LI-RADS 5 son compatibles con la obtención y el trasplante de órganos (1, 21).

#### **Alteraciones moleculares tempranas durante la hepatocarcinogénesis.**

El desarrollo de HCC es un proceso complejo de múltiples pasos que generalmente ocurre en el contexto de la evolución de la enfermedad hepática y cirrosis y se relaciona con la etiología. La historia natural del HCC en la cirrosis sigue una secuencia de eventos que comienzan con el desarrollo de nódulos cirróticos precancerosos con displasia de bajo grado (LGDN), seguido por nódulos displásicos de alto grado (HGDN) que pueden transformarse en HCC en etapa temprana (estadios 0 y A) y progresar a HCC más avanzado, (etapas B y C) (30,31). La transformación maligna en HCC puede originarse a partir de varios tipos de células incluyendo hepatocitos maduros y células madre o progenitoras. Como otros tumores sólidos epiteliales, el HCC es el resultado de alteraciones genómicas en genes de cáncer. Un cáncer controlador sería una alteración autónoma o no autónoma de célula que contribuye a la evolución del tumor en cualquier etapa, incluido en el inicio, progresión, metástasis y la resistencia a la terapia, mediante la promoción de una variedad de funciones que incluyen la proliferación, supervivencia, invasión o evasión inmune (21, 30, 31).

#### **Marcadores moleculares identificados para discriminar el HCC en estadio temprano del precanceroso.**

Basados en los estudios de carcinogénesis sobre los nódulos (LGDN y HGDN) se ha demostrado que la transformación maligna de hepatocitos incluye la activación de la vía Wnt /  $\beta$ -catenina, re-expresión de genes fetales, desregulación de la maquinaria de plegamiento de proteínas y la respuesta al estrés oxidativo. Además, varias líneas de evidencia han demostrado que los telómeros y el complejo de telomerasa que controla el nucleótido TTAGGG, juegan un papel importante en la iniciación y promoción del HCC en cirrosis (21,37-39). La progresión a HCC implica un segundo paso, con reactivación de la telomerasa necesaria para promover la carcinogénesis hepática y permitir proliferación de hepatocitos (el "interruptor de la telomerasa"). En humanos, TERT no se expresa en hepatocitos normales, sino durante la hepatocarcinogénesis en LGDN y particularmente HGDN (37-39).

Se han implicado varias vías y procesos en la progresión del HCC (21,34):

1. El mantenimiento de los telómeros contribuye a la evasión de la senescencia celular. La telomerasa se sobreexpresa en el 90% de los HCC y esto está relacionado con la sobreexpresión a mutaciones del promotor TERT en el 60% de los casos y en la amplificación génica en el 5% de los casos.
2. La vía Wnt /  $\beta$ -catenina se activa con frecuencia en el HCC a través de CTNNB1 mutaciones que activan la  $\beta$ -catenina (11%-37% de casos de HCC), particularmente en pacientes sin infección por VHB y en tumores bien diferenciados.
3. La inactivación de p53 y las alteraciones del ciclo celular son defectos importantes en el HCC, particularmente en casos relacionados con la infección por VHB.
4. Los complejos de remodelación de la cromatina y los reguladores epigenéticos se alteran con frecuencia en HCC. Estas alteraciones incluyen mutaciones en los factores asociados a BRG1 o HRBM (BAF) y complejo de cromatina BAF asociado a polibromatina (PBAF).

5. Las vías Ras / Raf / MAP y PI3K / AKT-mTOR se activan con frecuencia en el HCC. Estos cambios son causados por la amplificación de una región que incluye el factor 3 de crecimiento de fibroblastos (FGF3), FGF4 y FGF19 en aproximadamente el 5% de los tumores.
6. La vía del estrés oxidativo se activa constitutivamente en el HCC debido a mutaciones que activan el factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NFE2L2) o que inactivan el tipo Kelch- Proteína 1 asociada a ECH (KEAP1) en el 5-15% de los casos de HCC.

### **Influencia del microambiente sobre el desarrollo del HCC. ¿Cómo intervienen el sistema inmune y la fibrosis hepática en la carcinogénesis hepática?**

**Inflamación crónica.** Un microambiente alterado puede intervenir en la progresión maligna, desde las primeras fases de transformación, invasión y metástasis. En la histología del tumor se ha observado que algunos están densamente infiltrados por células tanto del sistema innato como del brazo adaptativo del sistema inmunológico y, por lo tanto, reflejan las condiciones inflamatorias que surgen en tejidos no neoplásicos. El HCC es un cáncer asociado a inflamación prototípica, el 90% de la carga de HCC está asociada a hepatitis prolongada debido a hepatitis viral, ingesta excesiva de alcohol o MAFLD-NASH, por lo que el microambiente inmunológico tiene un papel en la patogenia del tumor. Se ha demostrado que la presencia de infiltrados inmunes se asocia con un mejor pronóstico, probablemente debido a una inmunidad antitumoral más eficaz. Por otra parte, al encontrar activación de la señalización inflamatoria innata, la presencia de mediadores del Factor Nuclear del polipéptido ligero  $\kappa$  potenciador del gen en células B (NF- $\kappa$ B), el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) e Interleucina-6 (IL6) en el parénquima hepático, mas no en las células tumorales, se asocian con un mal pronóstico (21, 40-43).

En los modelos experimentales se ha evidenciado que la secreción de TNF por macrófagos del infiltrado hepático inflamatorio crónico, activan la Vía NF- $\kappa$ B en hepatocitos, lo que hace que estos últimos sean menos sensibles a la apoptosis y, por lo tanto, promover la carcinogénesis. Dos importantes vías de señalización inflamatoria son activadas por citocinas inflamatorias en hígados crónicamente inflamados y promueven el HCC, esas vías son: NF- $\kappa$ B y JAK-STAT. Componentes del microambiente que incluyen el TNF, linfotoxina- $\alpha$ , linfotoxina- $\beta$ . IL-6, Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) han sido implicados en la carcinogénesis hepática. La capacidad de las células inflamatorias para producir Especies Oxígeno Reactivas (ROS) potencialmente mutagénicas y las Especies Nitrógeno Reactivas (RNS) son consideradas con actividad protumorigénica (44-47).

**Fibrosis.** Las células estrelladas hepáticas se encuentran en los sinusoides hepáticas y cumplen múltiples funciones en la homeostasis del hígado: almacenamiento de retinoides, inmunomodulación, regeneración del hígado y vasorregulación. Ante una injuria hepática crónica, las células estrelladas se constituyen en las principales mediadoras de fibrosis hepática y cirrosis, ambas fuertemente asociadas con HCC, probablemente por la secreción de citocinas, promoción de la angiogénesis, por los componentes de la matriz extracelular protumorigénica, aumento de la rigidez de los tejidos y la inmunosupresión. La sobreexpresión del factor de crecimiento C derivado de plaquetas (PDGFC) en el hígado del ratón induce la activación de células estrelladas y fibrosis hepática seguida de HCC (21, 40, 43).

### **Patología.**

Se debe considerar la biopsia hepática en pacientes con masa hepática cuya apariencia no es típica de HCC en Imágenes con contraste, especialmente para observaciones categorizados



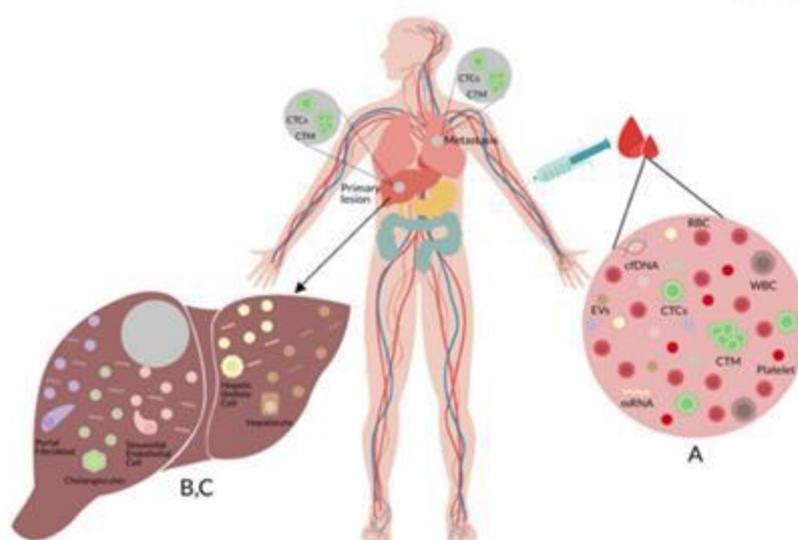
como LR-4 o LR-M. Un nódulo displásico de alto grado se caracteriza por la presencia de atipia citológica y cambios arquitectónicos, pero la atipia es insuficiente para un diagnóstico de HCC. A menudo exhiben una combinación de densidad celular aumentada, trabéculas irregulares, pequeños cambios celulares y escasas arterias, pero sin evidencia de invasión al estroma. La Inmunotinción con queratinas 7 o 19 pueden usarse en casos difíciles que permitan diferenciar la invasión del estroma frente a la reacción ductular y pseudoinvasión (21, 45, 47). Los expertos desarrollaron criterios confiables para el diagnóstico patológico del HCC. Tinción para varios biomarcadores, incluidos Glypican-3 (GPC3), proteína de choque térmico 70 (HSP70) y la Glutamina Sintetasa (GS), según la histología, se ha propuesto para ayudar a distinguir el HCC de los nódulos displásicos con displasia de alto grado. La precisión diagnóstica de un panel de estos tres marcadores fue evaluada entre una cohorte de 186 pacientes con nódulos regenerativos, nódulos displásicos de bajo grado, nódulos displásicos de alto grado, HCC muy bien diferenciado, HCC bien diferenciado y HCC poco diferenciado. (49, 50) Cuando al menos dos de los marcadores fueron positivos, la precisión general para la detección de HCC fue del 78,4%, con una especificidad del 100%. Este panel fue validado prospectivamente entre una cohorte de 60 pacientes que se sometieron a biopsia por nódulos hepáticos menor de 2 cm. (49, 50) Se necesitan más estudios para determinar el valor aditivo de estos marcadores sobre la interpretación rutinaria de hematoxilina y eosina.

Subtipos histológicos del Hepatocarcinoma: Comúnmente los subtipos aceptados son HCC Fibrolamelar (FLC), Escirro, HCC Sarcomatoide, HCC Esteatohepatítico, Linfoepitelial (LEL) y el llamado Inflamatorio. La falta de vías portales parenquimatosas normales o de vénulas hepáticas terminales es la pista inicial de la naturaleza neoplásica de este tumor hepatocelular. El pleomorfismo y pseudoacinos no serían aceptables para adenoma si esto en un hígado no cirrótico. El carcinoma Fibrolamelar (FLC) se caracteriza por grandes células tumorales poligonales con núcleos prominentes y nucléolos oscuros junto con bandas de fibrosis lamelar que lo atraviesan. Las células tumorales pueden contener inclusiones de cuerpo pálido. Tanto FLC como LEL se encuentran predominantemente en hígados no cirróticos. El HCC Scirrhou, puede notarse en hígados con focos típicos de HCC; el componente escirroso puede ser subcapsular. El HCC sarcomatoide se diagnostica como tal cuando la mayoría de las células tumorales se hilan; este fenotipo también puede ser un resultado de tratamiento. El LEL puede o no estar relacionado con Infección viral de Epstein-Barr como lo son otros carcinomas linfoepiteliales. Hay presentes cantidades variables de células mononucleares dentro de estos tumores. Muchos de los tumores tienen diferenciación colangiolar. No se comprenden los estímulos inmunogénicos. (51-56).

### **Biopsia líquida. ¿De qué se trata?**

En 1948, se publicó un documento que describía la circulación de ADN libre (cfDNA) y de ARN en la sangre de los humanos, para entonces, ya se estaba dando el primer paso hacia la "biopsia líquida" (59). El Instituto de Cáncer Nacional define la biopsia líquida como una prueba realizada en una muestra de sangre para buscar células cancerosas de un tumor que está circulando en la sangre o de fragmentos de ADN de células tumorales en sangre (59, 60, 61). Se trata de una mínima invasión, procedimiento que se puede realizar de forma rutinaria sin un entrenamiento extenso, permite un muestreo repetido que puede ofrecer monitoreo de enfermedades a lo largo del tiempo, y los análisis moleculares de ácidos nucleicos muestras para captar mejor la complejidad genética de las lesiones. Se pueden extraer diferentes biomarcadores de la biopsia líquida, se pueden detectar células epiteliales circulantes (CEC) en el caso de cánceres localizados, así como de lesiones preneoplásicas. Las CEC asociadas con

una neoplasia maligna conocida se denominan células tumorales circulantes (CTC) (59, 61, 62) (ver Fig. 2). En cuanto a cfDNA en pacientes con HCC, hay un significativo aumento de casos de progresión de metástasis y peor pronóstico. Sin embargo, se han encontrado mutaciones y alteraciones epigenéticas para HCC. El cambio cualitativo más importante está en el patrón de metilación, mostrando una asociación significativa de características de metilación de p15, genes p16 y RASSF1A con HCC, y de los loci PPAR y LINE1 con enfermedades hepáticas benignas. Los miARN son generados por la secreción activa celular o por lisis. Hasta el momento, alrededor de 70 miARN están relacionados con el HCC, que funciona como una herramienta de monitoreo de diagnóstico y tratamiento (61, 62). La figura 2, muestra la biopsia líquida en carcinoma hepatocelular.



**Figura 2.** (A) Biopsia líquida de carcinoma hepatocelular (HCC): la circulación espontánea de CTC y CTM en sangre periférica refleja la progresión del tumor y la diseminación del tumor en pacientes con HCC. (B) Ácidos nucleicos libres de células (cfNA): se sabe que los cfNA (DNA y RNA) proceden de células apoptóticas y necróticas o se liberan de eucariotas vivas. células, proporcionando así una fuente valiosa de material que puede instruir sobre los procesos naturales o biológicos y patológicos dentro de su fuente celular. (C) Extracelular vesículas (EV): las EV son pequeñas vesículas de membrana liberadas por las células en el entorno extracelular como parte de la fisiología normal o durante procesos patológicos, en que la función es la comunicación entre las células, su carga (ARNm, miARN, proteínas y lípidos) puede reflejar la célula de origen, así como el estrés específico que induce su formación y liberación. Glóbulos rojos (RBC), glóbulos blancos (WBC), células tumorales circulantes (CTC), microembolias tumorales circulantes (CTM) y ADN libre de células (cfDNA).

### Prevención.

El HCC es uno de los cánceres cuya prevención es posible. Se ha demostrado que la vacunación contra el VHB reduce la incidencia de HCC en las poblaciones con alta prevalencia de VHB. La terapia antiviral para el VHB con análogos nucleótidos y nucleósidos reduce pero no eliminan, el riesgo de HCC en cohortes de pacientes tratados (1, 21). Así mismo, la terapia antiviral con interferón podría reducir el riesgo de HCC en pacientes con infección por VHC asociada a enfermedad hepática crónica. Este efecto deberá reevaluarse con medicamentos antivirales de acción directa sin interferón. El uso de estatinas y el consumo de café se asocian con un riesgo reducido de HCC en estudios poblacionales. En el futuro, las potentes terapias antifibróticas dirigidas al hígado podrían también reducir el riesgo de desarrollar HCC (1, 21).



La prevención del HCC se enfoca más eficazmente en evitar el desarrollo de enfermedad hepática con fibrosis y el mejor ejemplo de ello es la vacunación contra la hepatitis B, vacuna universal contra la Hepatitis B que reduce la incidencia de HCC. (1, 21). La primera evidencia de la capacidad de la vacuna contra el VHB para reducir la incidencia de HCC se produjo en Taiwán después de la introducción de la vacunación neonatal universal en 1984. Este programa se asoció con una reducción en la incidencia de CHC infantil de 0,7 por ciento 100,000 individuos a 0.36 por 100,000 individuos entre 1981 y 1994 ( $P < 0.01$ ). Luego la disminución de la incidencia de HCC se trasladó a adolescentes y ahora a adultos jóvenes (1,17, 18, 21). Sin embargo, actualmente hay aproximadamente 400 millones de adultos que están infectados con Hepatitis B. No todas las personas con hepatitis B tienen el mismo riesgo de desarrollar CHC. Varios factores de riesgo son bien conocidos, entre ellos, la carga viral de la Hepatitis B, el sexo masculino, la edad avanzada y el hígado con actividad inflamatoria. El tratamiento con antivirales para la Hepatitis B (Entecavir, Tenofovir, y otros) disminuyen el riesgo de HCC pero no lo eliminan (57,58).

#### **Quimioprevención.**

Hay varios agentes quimiopreventivos que se han propuesto para reducir la incidencia del HCC en poblaciones de riesgo, incluidas estatinas y el consumo de café (21). Es conocido que existen factores de riesgo que favorecen el desarrollo de Enfermedades Hepáticas y que pueden prevenirse, entre ellos la Hepatitis B a través de la vacunación y medidas que eviten su transmisión, la Hepatitis C a través del control de drogas de uso endovenoso ilícitas, estudio de los hemoderivados, vida sexual segura, la Obesidad es una enfermedad que debe ser manejada por un grupo multiprofesional y así evitar la Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica, la Diabetes Mellitus tipo 2 debe controlarse así como la Dislipidemia. El abuso del consumo de Alcohol es un problema que repercute en el Hígado, pudiendo conducir a Cirrosis Hepática, por lo que es necesario impulsar campañas para evitar la ingesta de riesgo. Todos estos factores de riesgo pueden controlarse y son considerados como Quimioprevención Primaria de Enfermedades Hepáticas Crónicas. Una vez que el paciente presenta Enfermedad Hepática Crónica se inician estrategias de Quimioprevención Secundaria, entre las cuales se encuentran la vacunación contra Hepatitis A y B, restricción de ingesta de Alcohol, Dieta adecuada en lo posible tipo Mediterránea, Ejercicio, vigilancia del Hepatocarcinoma mediante la realización de Ultrasonido Abdominal cada 6 meses con o sin Alfa Feto Proteína. La prevención de recurrencia del Hepatocarcinoma una vez tratado, se encuentra entre las estrategias de Quimioprevención Terciaria (63-65).

Es necesario referirnos al uso de la Metformina por la información tan diversa y hasta contradictoria sobre sus beneficios en la hepatoprotección. Un metaanálisis sugirió que la Metformina disminuye el riesgo de HCC en personas con diabetes y otro estudio demostró que la Metformina puede continuarse de forma segura en personas con diabetes que también tienen cirrosis. No obstante, la evidencia de la capacidad de la metformina para reducir el riesgo de HCC no es lo suficientemente fuerte como para recomendar su uso en pacientes en riesgo, y se requieren un mayor número de estudios prospectivos que lo aprueben (70, 71).

#### **Modificación del estilo de vida.**

La abstinencia de alcohol en personas con enfermedad hepática relacionada al uso de alcohol disminuye la progresión de la enfermedad hepática pero aún no se conoce su influencia en la incidencia de HCC. De manera similar, para aquellos con MAFLD que pierden peso, pueden controlar su enfermedad e igualmente, no hay información sobre si la incidencia de HCC se



reduce (21). En resumen, la prevención del HCC depende de un adecuado manejo de la enfermedad hepática subyacente.

### **Diagnóstico**

Todo paciente con Enfermedad Hepática Crónica por cualquier etiología debe formar parte de un programa de vigilancia para la temprana identificación de una lesión sólida hepática y seguir los criterios diagnósticos recomendados por las diferentes Asociaciones Internacionales para el Estudio del Hígado. Estos pacientes generalmente son asintomáticos y tienen HCC en estadio temprano. Por el contrario, los pacientes diagnosticados fuera de la vigilancia suelen presentar en etapas avanzadas con grandes tumores sintomáticos y / o invasión de la vena porta. Los síntomas incluyen malestar, peso pérdida, anorexia, malestar abdominal o signos relacionados con disfunción hepática avanzada. El diagnóstico se puede realizar mediante estudios no invasivos radiológicos o invasivos como la biopsia hepática. El diagnóstico radiológico se logra con un alto grado de confianza si la lesión se encuentra en un paciente con cirrosis. Usando imágenes de contraste, la lesión muestra las características radiológicas de HCC, que son hipervascularidad en la fase arterial de un estudio de contraste (TC o RM) y una disminución de la señal en comparación con el resto del hígado en las fases venosa y / o retardada. Cuando se observan estas características típicas, se confirma el diagnóstico y se no es necesaria la biopsia (1, 2, 21, 52, 56). Sin embargo, la biopsia no es la prueba de oro ideal, debido a la variación introducida por el muestreo y las complicaciones. El riesgo de complicaciones, como siembra de tumores y sangrado, después de la biopsia hepática es inferior al 3% (66, 67). Aunque la sensibilidad de las biopsias hepáticas oscila entre el 70 y el 90% para todos los tamaños de tumor, lesiones pequeñas pueden pasar desapercibidas, dando un resultado falso negativo. Además, en el HCC en etapa temprana, los cambios morfológicos pueden ser mínimos en comparación con los hepatocitos displásicos, lo que hace que diagnóstico incierto (66, 67). En este contexto, el uso de tinciones especiales puede ayudar a resolver el diagnóstico, incertidumbres. Por ejemplo, las células de HCC expresan glicpican 3, glutamina sintetasa, choque térmico proteína 70 y cadena pesada de clatrina. La tinción positiva para dos de estos cuatro marcadores es muy específica para el HCC (68, 69).

### **El futuro de la medicina de precisión para el HCC.**

El HCC es uno de los pocos cánceres en los que los criterios radiológicos no invasivos son suficientes para el diagnóstico en pacientes con un factor de riesgo subyacente (cirrosis) (21). El concepto de **medicina de precisión** se basa en la administración de terapias selectivas dirigidas a alteraciones moleculares relevantes para la progresión del tumor en un individuo determinado. Para implementar la medicina de precisión en el HCC, se debe realizar biopsia del tumor, la cual es ahora de rutina y ha sido adoptada como pauta para los ensayos clínicos en la investigación del HCC., porque la información molecular que se obtiene es fundamental, sin embargo, este argumento es debatido por los oncólogos debido a la evidencia de heterogeneidad inter tumoral e intra tumoral en todas las neoplasias, incluido el HCC. De allí se desprende la necesidad de definir conceptos como tomar una solo biopsia o múltiples para explorar la heterogeneidad del tumor, también definir si las mutaciones del tronco ocurren al inicio de la enfermedad en que son más potentes o por el contrario, las mutaciones son de las ramas ya que estas se desarrollan tarde en la historia natural del tumor. Finalmente, las mutaciones pasajeras, el tipo más común de mutación, son de relevancia marginal en términos de transformación celular, progresión o diseminación, pero podría ser útil para definir la clonalidad de los tumores o su inmunogenicidad. La biopsia líquida en la recapitulación de



mutaciones conductoras del tronco del tejido y en la captura de mutaciones subclonales, constituye una herramienta promisoría para la predicción y el diagnóstico temprano del HCC.

#### **CONCLUSIONES:**

El Hepatocarcinoma es la primera neoplasia maligna del Hígado cuyos factores de riesgo son bien conocidos y muchos de los cuales son posibles prevenir. Se requiere mejorar la transmisión de información y educación médica a todo nivel, para centrarnos en la prevención del desarrollo de enfermedades hepáticas, en la identificación de la población en riesgo de HCC, implementación sistemática de programas de vigilancia, optimizar los mecanismos diagnósticos y promover el acceso para todos, de estrategias de tratamientos que han demostrado una mayor supervivencia del paciente. El enfoque actual en el estudio de biomarcadores moleculares para predecir riesgo de desarrollar HCC, para seleccionar pacientes para programas de vigilancia, para realizar el diagnóstico temprano de lesiones hepáticas premalignas o malignas, constituye una esperanza en un futuro más promisorio en el manejo del HCC.

La historia natural del HCC en la cirrosis sigue una secuencia de eventos que comienzan con el desarrollo de nódulos cirróticos precancerosos con displasia de bajo grado (LGDN), seguido por nódulos displásicos de alto grado (HGDN) que pueden transformarse en HCC.

Los telómeros y el complejo telomerasa juegan un papel importante en la iniciación y promoción del HCC en cirrosis.

Componentes del microambiente que incluyen el TNF, linfotoxina- $\alpha$ , linfotoxina- $\beta$ , IL-6, Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) han sido implicados en la carcinogénesis hepática.

Hay varios agentes quimiopreventivos que se han propuesto para reducir la incidencia del HCC en poblaciones de riesgo, incluidas estatinas, metformina y el consumo de café.

El Ecograma Abdominal sigue siendo una herramienta muy útil para la vigilancia del HCC y se debe realizar cada 6 meses en pacientes con Enfermedad Hepática Crónica.

La Tomografía y RM pueden aportar las características típicas del HCC.

La biopsia Hepática se considera cuando los hallazgos por imágenes no son típicos para el diagnóstico de HCC. Hoy día no se le considera la prueba de oro ante el advenimiento de biomarcadores moleculares y de los aportes de la biopsia líquida.

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Jorge A. Marrero, Laura M. Kulik, Claude B. Sirlin, Andrew X. Zhu, Richard S. Finn, Michael M. Abecassis, Lewis R. Roberts, and Julie K. Heimbach. VIRAL HEPATITIS Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases PRACTICE GUIDANCE | Hepatology, VOL. 68, NO. 2, 2018.
2. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. Hepatology 2017; 67:358-380.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and Mortality: sources, methods, and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015;136: E359-E386.
4. Chiang CJ, Yang YW, You SL, Lai MS, Chen CJ. Thirty-year outcomes of the national hepatitis B immunization program in Taiwan. JAMA 2013; 310:974-976.



5. McCredie M, Williams S, Coates M. Cancer mortality in East and Southeast Asian migrants to New South Wales, Australia, 1975-1995. *Br J Cancer* 1999; 79:1277-1282.
6. Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127: S5-S16.
7. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011; 53:1020-1022.
8. Chan AJ, Balderramo D, Kikuchi L, Ballerga EG, Prieto JE, Tapias M, et al. Early age hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B infection in South America. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017; 15:1631-1632.
9. Pok S, Barn VA, Wong HJ, Blackburn AC, Board P, Farell GC, Teoh NC. Testosterone regulation of cyclin E kinase: a key factor in determining gender differences in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2016; 31:1210-1219.
10. Petrick JL, Kelly SP, Altekruse SF, McGlynn KA, Rosenberg PS. Future of hepatocellular carcinoma incidence in the United States forecast through 2030. *J Clin Oncol* 2016; 34:1787-1794.
11. Petrick JL, Braunlin M, Laversanne M, Valery PC, Bray F, McGlynn KA. International trends in liver cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1978-2007. *Int J Cancer* 2016; 139:1534-1545.
12. Yang, D. et al. Impact of sex on the survival of patients with hepatocellular carcinoma: a Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis. *Cancer* 120, 3707–3716 (2014).
13. Omer, R. E. et al. Population-attributable risk of dietary aflatoxins and hepatitis B virus infection with respect to hepatocellular carcinoma. *Nutr. Cancer* 48, 15–21 (2004).
14. Mittal, S. et al. Temporal trends of nonalcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma in the veteran affairs population. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 594–601 e1 (2015).
15. Federico Piñero, Jaime Poniachik, Ezequiel Ridruejo, Marcelo Silva. Hepatocellular carcinoma in Latin America: Diagnosis and treatment challenges. *World J Gastroenterol* 2018 October 7; 24(37): 4224-4229
16. Méndez-Sánchez N, Ridruejo E, Alves de Mattos A, Chávez-Tapia NC, Zapata R, Paraná R, Mastai R, Strauss E, Guevara-Casallas LG, Daruich J, Gadano A, Parise ER, Uribe M, Aguilar-Olivos NE, Dagher L, Ferraz-Neto BH, Valdés-Sánchez M, Sánchez-Avila JF. Latin American Association for the Study of the Liver clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol* 2014;13 Suppl 1: S4–S40 [PMID 24998696]
17. Lizarzabal, Maribel et al. Manual Prevención, Vigilancia, Control y Tratamiento de Hepatitis Virales en Zulia- Venezuela. Available in [www.amawebs.com/storage/docs/h44bt47fcip.pdf](http://www.amawebs.com/storage/docs/h44bt47fcip.pdf)
18. Lizarzábal (2006) /Dirección de Epidemiología y Análisis Estratégico/ Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS)2005. Gastroenterology in the New Century in Venezuela. A first five-year Situational Diagnosis. *Inv Clinica* 2007 48(Sup2):5-127
19. Domínguez E., Lizarzabal, M., Rangel R., Romero, G., Añez, M., Serrano, A., Latuff, Z., Fernandez, J. Hepatocarcinoma: epidemiología, características clínicas, de laboratorio y de imagen. Una revisión de 5 años. *Annals of Hepatology* 7(3):303. July-Sept 2008



20. León R, Domínguez M, Guzmán A, Martínez E, Roizental M. Abordaje terapéutico del HCC en Venezuela. ALEH 2012. Personal Communication
21. Josep M. Llovet, Jessica Zucman-Rossi, Eli Pikarsky , Bruno Sangro, Myron Schwartz , Morris Herman and Gregory Gores. Hepatocellular carcinoma. Nature Reviews Disease Primers. 2021; 7, Article number: 6.
22. Sarasin FP, Giostra E, Hadengue A. Cost-effectiveness of screening for detection of small hepatocellular carcinoma in western patients with Child-Pugh class A cirrhosis. Am J Med 1996; 101:422-434.
23. Lin OS, Keeffe EB, Sanders GD, Owens DK. Costeffectiveness of screening for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C. Aliment Pharmacol Ther. 2004; 19:1159-1172.
24. White DL, Richardson P, Tayoub N, Davila JA, Kanwal F, El-Serag HB. The updated model: an adjusted serum alpha-fetoprotein-based algorithm for hepatocellular carcinoma detection with hepatitis C virus-related cirrhosis. Gastroenterology 2015; 149:1986-1987.
25. Leerapun A, Suravarapu SV, Bida JP, Clark RJ, Sanders EL, Mettler TA, et al. The utility of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population. Clin Gastroenterol Hepatol 2007; 5:394-402.
26. Wallin R PH, Prydz H. Studies on a subcellular system for vitamin K-dependent carboxylation. Thromb Haemost 1979; 41:529-536.
27. Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo KJ, Lee SD, et al. Des-γ-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 1984; 310:1427-1431.
28. Tsai SL, Huang GT, Yang PM, Sheu JC, Sung JL, Chen DS. Plasma des-gamma-carboxyprothrombin in the early stage of hepatocellular carcinoma. Hepatology 1990; 11:481-488
29. Taouli B, Hoshida Y, Kakite S, Chen X, Tan PS, Sun X, et al. Imaging-based surrogate markers of transcriptome subclasses and signatures in hepatocellular carcinoma: preliminary results. Eur Radiol 2017; 27:4472-4481
30. Nault, J.-C. et al. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. Nat. Genet. 10, 1187–93 (2015).
31. Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.-C. & Llovet, J. M. The genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 5, 2015; 1226–1239.
32. Llovet, J. M. et al. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. Gastroenterology. 2006; 131, 1758–67.
33. Wurmbach, E. et al. Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2007; 45, 938–47.
34. Totoki, Y. et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. Nat. Genet. 2014; 46, 1267–73.
35. Di Tommaso, L. et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. Hepatology. 2007; 45, 725–34.
36. Di Tommaso, L. et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. 2009; 50, 746–54.



37. Günes, C. & Rudolph, K. L. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* 152, 390–3 (2013).
38. Satyanarayana, A. et al. Mitogen stimulation cooperates with telomere shortening to activate DNA damage responses and senescence signaling. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5459–74 (2004).
39. Farazi, P. A. et al. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 63, 5021–7 (2003).
40. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144, 646–674.
41. Grivnickov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140, 883–899.
42. Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986; 315, 1650–1659
43. Hernandez-Gea, V., Toffanin, S., Friedman, S. L. & Llovet, J. M. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2013; 144, 512–527.
44. Crispe, I. N. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27, 147–163.
45. Pikarsky, E. et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 2004; 431, 461–6.
46. Bauer, J. et al. Lymphotoxin, NF-kB, and cancer: the dark side of cytokines. *Dig Dis.* 2012; 30, 453–468.
47. Taniguchi, K. & Karin, M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Semin Immunol.* 2014; 26, 54–74.
48. Campbell, J. S. et al. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; U. S. A. 102, 3389–94.
49. Chen IP, Ariizumi -S, Nakano M, Yamamoto M. Positive glypican-3 expression in early hepatocellular carcinoma predicts recurrence after hepatectomy. *JGastroenterol* 2013; 49:117-125.
50. Tremosini S, Forner A, Boix L, Vilana R, Bianchi L, Reig M, et al. Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2012; 61:1481-1487
51. Lee, Y. A., Wallace, M. C. & Friedman, S. L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut.* 2015; 64, 830–41.
52. Elizabeth M. Brunt. Histopathologic Features of Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Liver Disease.* 2012; Vol. 1, No. 6
53. Bruix J. Liver cancer: Still a long way to go. *Hepatology* 2011; 54:1-2.
54. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology* 2011; 53:1020-1022.
55. Parisi G. Should a radiological diagnosis of hepatocellular carcinoma be routinely confirmed by a biopsy? Yes. *Eur J Intern Med* 2012; 23:34-6.
56. Roncalli M, Park YN, Di Tommaso L. Histopathological classification of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010;42(suppl 3): S228-S234.
57. Wong, G. L.-H. et al. Accuracy of risk scores for patients with chronic hepatitis B receiving entecavir treatment. *Gastroenterology.* 2013; 144, 933–44.



58. Arends, P. et al. Entecavir treatment does not eliminate the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: limited role for risk scores in Caucasians. *Gut* . 2015; 64, 1289–95.
59. Hugo A. Barrera-Saldana, Luis E. Fernández-Garzaa, Silvia A. Barrera-Barrera. Liquid biopsy in chronic liver disease. *Annals of Hepatology*. 2021; 20, 100-197.
60. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pelle E, et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther Adv Med Oncol* 2018; 10:1–24, <https://doi.org/10.1177/175883591879463>.
61. Yin CQ, Yuan CH, Qu Z, Guan Q, Chen H, Wang FB. Liquid biopsy of hepatocellular carcinoma: circulating tumor-derived biomarkers. *Dis Mark* 2016; 10:1–11, <https://doi.org/10.1155/2016/1427849>.
62. Wang J, Chang S, Li G, Sun Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Front Med* 2017; 11:522–7, <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0526-7>.
63. Pinzani M. Liver Disease: Pathogenesis of Hepatic Fibrosis .American Association for the study of Liver Disease. 2006; 55 Annual Meeting. Boston. Pag.121-126.
64. García L, González F y Moreno R. 2012 “Cirrosis Hepática”. *Medicine*, 11(11):625-33.
65. Ripoll C, Bañares R. Cirrosis hepática. *Medicine*. 2008; 10(11):685-90.
66. Silva, M. A. et al. Needle track seeding following biopsy of liver lesions in the diagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut*, 2008; 57, 1592–6
67. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology*. 2009; 49, 658–64.
68. Libbrecht, L. et al. Glypican-3 expression distinguishes small hepatocellular carcinomas from cirrhosis, dysplastic nodules, and focal nodular hyperplasia-like nodules. *Am. J. Surg. Pathol*. 2006; 30, 1405–11.
69. Tremosini, S. et al. Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2012; 61, 1481–7.
70. Zhang, H., Gao, C., Fang, L., Zhao, H.-C. & Yao, S.-K. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients: a meta-analysis. *Scand. J. Gastroenterol*. 2013; 48, 78–87.
71. Zhang, X. et al. Continuation of metformin use after a diagnosis of cirrhosis significantly improves survival of patients with diabetes. *Hepatology*. 2014; 60, 2008–16.