



FACULTAD DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Tesis doctoral

El antígeno de células neoplásicas escamosas (SCCA) solo o formando el complejo SCCA-IgM es un biomarcador precoz de carcinoma hepatocelular

Serpin squamous cell carcinoma antigen (SCCA) alone or complexed with IgM (SCCA-IgM) as biomarkers in Hepatocellular carcinoma: from prevention to diagnosis.

Presentada por:

Chang-Hai Liu

Dirigida por:

Prof. Manuel Romero Gómez

Prof. Javier Ampuero Herrojo

Sevilla 2018



**D. MANUEL ROMERO GÓMEZ, CATEDRÁTICO DE MEDICINA DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: **“El antígeno de células neoplásicas escamosas (SCCA) solo o formando el complejo SCCA-IgM es un biomarcador precoz de carcinoma hepatocelular”**, presentada por D. Chang-Hai Liu para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Revisado el texto, doy mi conformidad para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Dr. Manuel Romero Gómez

Director y Tutor de la Tesis

7 de mayo de 2018



**D. JAVIER AMPUERO HERROJO, PROFESOR ASOCIADO DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: **“El antígeno de células neoplásicas escamosas (SCCA) solo o formando el complejo SCCA-IgM es un biomarcador precoz de carcinoma hepatocelular”**, presentada por D. Chang-Hai Liu para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Revisado el texto, doy mi conformidad para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Dr. Javier Ampuero Herrojo

Co-Director de la Tesis

7 de mayo de 2018

Abstract

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) represents more than 90% of primary liver cancers and is a major health problem. Every year more than 6.7 million deaths and 10.9 million new cancer cases were diagnosed. Early detection of HCC still is difficult due to the lack of adequate biomarkers that show high sensitivity and specificity. Currently, alpha-fetoprotein (AFP) is the most commonly used biomarker, but only 50-70% of patients affected by HCC have high levels of AFP, which is also difficult to distinguish HCC early stage of other diseases. The SerpinB3, the squamous cell carcinoma antigen (SCCA) is overexpressed in liver cancer and circulating SCCA-IgM complexes have been described in patients with HCC. Current screening programs for all cirrhotics are controversial and a personalized screening is an unmet need in the precision medicine era.

Aim: To know long-term predictive accuracy of SCCA and SCCA-IgM alone or together with AFP in early diagnosis of HCC. To determine the role of SCCA-IgM predicting long-term appearance of HCC.

Methods: After a systematic review of the relevant studies, the sensitivity, specificity, positive and negative likelihood ratios, diagnostic odds ratio (DOR) and area under curve (AUC) for the diagnosis of HCC were pooled using bivariate meta-analysis. Hierarchic summary receiver operating characteristic curves were used to summarize the overall test performance. Bivariate boxplots were used to confirm whether the threshold effect existed. A Fagan nomogram was used to assess the clinical utility. Heterogeneity was explored by sensitivity analysis, univariable meta-regression and subgroup analysis.

Patients: Two-hundred and three cirrhotic patients (Child A 74.9%, B 21.2%, C 3.9%) were followed-up prospectively every six months to screen HCC by ultrasound

and AFP according to EASL guidelines. The estimation cohort was obtained from Italy (30.5%; 62/203) and validation cohort from Spain (69.5%; 141/203). Patients underwent to evaluate SCCA-IgM by ELISA (Hepa-IC, Xeptagen, Venice, Italy). Patients were followed-up for 60 months, being censored at the time of the appearance of HCC.

Results: Eleven studies that had HCC diagnosis as their purpose were ultimately included in the quantitative analysis. The summary estimates were as follows: SCCA [AUC: 0.80 (95% CI: 0.76 - 0.83)] and SCCA-IgM [AUC: 0.77 (95% CI: 0.74 - 0.83)] demonstrated similar diagnostic performance, while a combination of AFP and SCCA-IgM had an AUC of 0.90 (95% CI: 0.87 - 0.92) and a DOR of 22.87 (95% CI: 8.38 – 62.40). Meta-regression showed that patient selection, cut-off values, reference standards and tumor biopsy as the diagnostic method significantly influenced the heterogeneity of the included studies. There were 10.8% and 23.1% of two- and five-year follow up of HCC development. Patients with HCC showed higher levels of SCCA-IgM than those without it (425.72 ± 568.33 AU/ml vs. 195.93 ± 188.40 AU/ml, $p = 0.009$) during the five-year follow-up. In multivariate analysis, after adjusting by age, sex and AST, the following factors were independently associated with HCC: SCCA-IgM (HR 1.001 95% CI 1.000 - 1.002; $p = 0.003$), AFP (HR 1.028 95% CI 1.009 - 1.046; $p = 0.003$) and creatinine (HR 1.564 95% CI 1.151 - 2.124; $p = 0.004$). The log-rank test of the combination resulted in a 7.488 ($p = 0.024$) in the estimation cohort and 11.061 ($p = 0.004$) in the validation cohort, and 100% of correctly classified rate in both cohorts to identify low-risk group patients in two-year of follow-up.

Conclusion: Both SCCA and SCCA-IgM showed a moderate diagnostic

accuracy for HCC screening; the combination of SCCA-IgM and AFP is the best diagnostic option. We have constructed a predictive model based on the combination of SCCA-IgM and AFP that enhanced the predictive value for detecting HCC followed by tailored HCC surveillance for individual patients, especially to identify patients with low-risk.

Resumen

Antecedentes: El carcinoma hepatocelular (CHC) representa más del 90% de los cánceres primarios de hígado y constituye un problema de salud mundial. La detección temprana de CHC todavía es difícil debido a la falta de biomarcadores adecuados que muestren una alta sensibilidad y especificidad. En la actualidad, la alfa-fetoproteína (AFP) es el biomarcador más utilizado, pero solo el 50-70% de los pacientes afectados por CHC presentan niveles elevados de AFP. El antígeno de carcinoma de células escamosas (SCCA) se sobre-expresa en el cáncer de hígado e inmuno-complejos circulantes SCCA-IgM se han descrito en pacientes con CHC. El actual programa de vigilancia de CHC recomendado por la guía de práctica clínica "*one-size fits all*" para la detección temprana de tumores es controvertido en la era de la medicina de precisión.

Objetivos: 1) Realizamos un meta-análisis para evaluar el rendimiento diagnóstico de SCCA y SCCA-IgM y de ambos combinados con alfa-fetoproteína. 2) Validamos el papel de la SCCA-IgM en la predicción del riesgo de hepatocarcinoma a largo plazo en pacientes con cirrosis hepática.

Métodos: Después de una revisión sistemática de los estudios pertinentes, se combinaron la sensibilidad, la especificidad, las razones de verosimilitud positiva y negativa, la odds ratio de diagnóstico (DOR) y el área debajo de la curva (AUC) para el diagnóstico de CHC mediante el meta-análisis bivariado. Las curvas características operativas del receptor resumido jerárquico se usaron para resumir el rendimiento general de la prueba. Los diagramas de caja bivariados se usaron para confirmar si el efecto umbral existía. Se utilizó un nomograma de Fagan para evaluar la utilidad clínica. La heterogeneidad se exploró mediante análisis de sensibilidad, meta-regresión univariante y análisis de subgrupos.

Pacientes: Se incluyeron 203 pacientes cirróticos (Child A 74,9%, B 21,2%, C 3,9%) seguidos prospectivamente cada seis meses para detectar el CHC por ultrasonido de acuerdo con las guías EASL. La cohorte de estimación se obtuvo de Italia (30,5%; 62/203) y la cohorte de validación de España (69,5%; 141/203). Los pacientes fueron sometidos a evaluación de SCCA-IgM por ELISA (Hepa-IC, Xeptagen, Venecia, Italia). Los pacientes fueron seguidos durante 60 meses, siendo censurados en el momento de la aparición del CHC.

Resultados: Once estudios que tenían el diagnóstico de CHC como objetivo principal se incluyeron finalmente en el análisis cuantitativo. Las estimaciones resumidas fueron las siguientes: SCCA [AUC: 0,80 (IC 95%: 0,76-0,83)] y SCCA-IgM [AUC: 0,77 (IC 95%: 0,74-0,83)] mostraron un rendimiento diagnóstico similar, mientras que una combinación de AFP y SCCA-IgM tuvieron un AUC de 0,90 (IC del 95%: 0,87-0,92) y un DOR de 22,87 (IC del 95%: 8,38 - 62,40). La meta regresión mostró que la selección del paciente, los valores de corte, los estándares de referencia y la biopsia tumoral como método de diagnóstico influyeron significativamente en la heterogeneidad de los estudios incluidos. Hubo un 10,8% y 23,1% de desarrollo de CHC a dos y cinco años de seguimiento. Los pacientes con CHC mostraron niveles más altos de SCCA-IgM que los que no ($425,72 \pm 568,33$ AU / ml frente a $195,93 \pm 188,40$ AU / ml, $p = 0,009$) durante el seguimiento de cinco años. En el análisis multivariado, después de ajustar por edad, sexo y AST, los siguientes factores se asociaron independientemente con CHC: SCCA-IgM (HR 1,001 IC 95% 1,000 - 1,002; $p = 0,003$), AFP (HR 1,028 IC 95% 1,009 - 1,046; $p = 0,003$) y creatina (HR 1,564 IC 95% 1,151 - 2,124; $p = 0,004$). La prueba de log-rank de la combinación mostró un valor de 7,488 ($p = 0,024$) en la cohorte de estimación y 11,061 ($p = 0,004$)

en la cohorte de validación y una tasa del 100% de pacientes correctamente clasificados al identificar el grupo de bajo riesgo a dos años de seguimiento.

Conclusión: Tanto los niveles de SCCA como de SCCA-IgM mostraron una precisión diagnóstica moderada para el cribado de CHC; la combinación de SCCA-IgM y AFP es la mejor opción de diagnóstico. SCCA-IgM podría representar un nuevo biomarcador para CHC a largo plazo. Hemos construido un modelo predictivo de la combinación de SCCA-IgM y AFP que mejoró el valor predictivo para detectar CHC seguido de una vigilancia de CHC adaptada para pacientes individuales, especialmente para identificar pacientes con bajo riesgo.

Abreviaturas

AASLD: asociación americana para el estudio de las enfermedades hepáticas.

AFP: alfa-fetoproteína.

AFU: Alfa-fucosidasa.

ALT: alanina transaminasa.

APASL: asociación asiática del pacífico para el estudio del hígado.

AST: aspartato aminotransferasa.

AUC: área debajo de la curva.

BCLC: sistema de estadificación Barcelona Clinical Liver Cancer.

CHC: carcinoma hepatocelular.

CLIP: Programa Italiano de Cáncer del Hígado.

DOR: odds ratio de diagnóstico.

DM: diabetes mellitus.

DPR: tasa positiva diferencial.

EASL: asociación europea para el estudio del hígado.

ECO: ecografía.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

FN: falsos negativos.

FP: falsos positivos.

GGT: γ -glutamyl transferasa.

GP73: Golgi protein 73.

GPC3: Glypican-3.

HBeAg: antígeno positivo de la hepatitis B.

HBsAg: antígeno de superficie de la hepatitis B.

HCR2: gen de la carbonil reductasa 2 humana.

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos.

HSP: Proteína de choque térmico.

HSROC: curvas de características operativa del receptor jerárquico resumen.

IC: intervalo de confianza.

IMC: índice de masa corporal.

JIS: sistema de estadificación Integrada de Japón.

LCA: Lectina de *Lens culinaris*.

LR+: razón de probabilidad positiva.

LSM: medición de la rigidez hepática.

miARN: microARN.

NAFLD: enfermedad por hígado graso no alcohólico.

PIVKA: proteína inducida por la ausencia de vitamina K.

PLR y NLR: ratios de probabilidad positivos y negativos calculados.

QUADAS-2: evaluación de calidad para estudios de precisión diagnóstica.

RM: resonancia magnética.

ROC: curva característica de funcionamiento del receptor.

RSL: bucle de sitio reactivo.

SCCA (SERPINB): antígeno del carcinoma de células escamosas.

SCCA-IgM: Inmunocomplejo SCCA.

sROC: curva característica operativa del receptor de resumen tradicional.

TACE: quimioembolización arterial transcatéter.

TAG-72: glucoproteína asociada a tumor 72.

TC: tomografía computerizada.

TMB: 3,3',5,5' tetrametilbenzidina.

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa.

VHC: virus de la hepatitis C.

VHB: virus de la hepatitis B.

VN: verdaderos negativos.

VP: verdaderos positivos.

Índice

Abstract	I
Resumen	IV
Abreviaturas	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Cirrosis.....	2
1.1.1 Cirrosis	2
1.1.2 Etiología.....	2
1.1.3 Definición de cirrosis	4
1.1.4 Clasificación	4
1.1.5 Índices pronósticos usados en la práctica clínica en cirrosis	5
1.2 Hepatocarcinoma	7
1.2.1 Epidemiología.....	7
1.2.2 Vigilancia	8
1.2.3 Diagnóstico.....	11
1.2.4 Tratamiento	13
1.2.5 Métodos predictivos (no biomarcadores).....	17
1.2.5.1 Factores de riesgo	17
1.2.5.1.1 Virus de la Hepatitis C.	19
1.2.5.1.2 Virus de la Hepatitis B.	19
1.2.5.1.3 Alcohol.....	20
1.2.5.1.4 NAFLD.....	21
1.2.5.1.5 Síndrome metabólico.....	21
1.2.5.2 Predicción.....	22
1.2.5.2.1 Hepatitis B.....	22

1.2.5.2.2 Hepatitis C y otras enfermedades	26
1.2.5.2.3 Nivel de transaminasas	26
1.2.5.2.4 Según diferentes etiología	26
1.2.5.2.5 Sugerencias sobre la dirección de la investigación futura	27
1.3 Biomarcadores	29
1.3.1 Biomarcadores para diagnosticar CHC.....	29
1.3.1.1 Biomarcadores	29
1.3.1.2 Fases del desarrollo de biomarcadores para la detección temprana de CHC	31
1.3.1.3 Alfa-fetoproteína.....	33
1.3.1.4 Utilidad clínica de la heterogeneidad de la alfa-fetoproteína	36
1.3.1.5 Des- γ -carboxyprotrombina	38
1.3.1.6 La osteopontina.....	39
1.3.1.7 Glypican-3	41
1.3.1.8 Golgi protein 73.....	42
1.3.1.9 Alfa-fucosidasa	43
1.3.1.10 Neopterina.....	44
1.3.1.11 γ -glutamilttransferasa.....	45
1.3.1.12 El factor de crecimiento transformado β 1	45
1.3.1.13 El factor de crecimiento endotelial vascular.....	46
1.3.1.14 MicroARNs	47
1.3.1.15 AFP mARN	48
1.3.1.16 carbonil reductasa 2 humana	48
1.3.1.17 El factor de crecimiento de hepatocitos	49
1.3.1.18 Tumor asociado glucoproteína 72.....	49

1.3.1.19 Proteína de choque térmico	49
1.3.1.20 El factor de crecimiento nervioso	50
1.3.2 SCCA.....	50
1.3.2.1 Serpinas	50
1.3.2.2 SCCA1 and SCCA2	53
1.3.2.3 Estudio SCCA	55
1.3.2.4 Estudio SCCA-IgM.....	56
1.3.2.4.1 SCCA-IgM en diagnóstico de CHC	57
1.3.2.4.2 SCCA-IgM en pronóstico de CHC.....	58
1.3.2.4.3 SCCA-IgM en la monitorización de la enfermedad hepática crónica	59
1.3.2.4.4 SCCA-IgM y tratamiento antiviral	60
1.3.2.5 Estudio meta-análisis.....	61
2. HIPÓTESIS.....	62
3. OBJETIVOS	64
3.1.1 Meta-análisis	65
3.1.2 SCCA-IgM en la predicción de CHC	65
4. METODOLOGÍA	66
4.1 Meta-análisis de SCCA y SCCA-IgM.....	67
4.1.1 Estudio de identificación y selección	67
4.1.2 Extracción de datos y evaluación de calidad	68
4.1.3 Definición y cálculo de las variables experimentales.....	68
4.1.4 Síntesis de datos.....	71
4.2 SCCA-IgM en la predicción del hepatocarcinoma	73
4.2.1 Seguimiento clínico de pacientes	73

4.2.2	Criterios diagn3sticos de hepatocarcinoma	76
4.2.3	Procesamiento de muestras	76
4.2.4	Evaluaci3n SCCA.....	77
4.2.4.1	Principio del test.....	78
4.2.4.2	Reactivos y materiales	78
4.2.4.3	Preparaci3n los reactivos	79
4.2.4.4	Ejecuci3n del test	79
4.2.4.5	An3lisis estad3stico.....	81
5.	RESULTADOS	83
5.1	Meta-an3lisis de SCCA y SCCA-IgM.....	84
5.1.1	Resultados de la investigaci3n	84
5.1.2	Caracter3sticas elegibles del estudio y evaluaci3n de calidad	86
5.1.3	An3lisis de datos	90
5.1.4	Nomogramas Fagan	92
5.1.5	Metarregresi3n univariable y an3lisis de subgrupos.....	94
5.1.6	El sesgo de publicaci3n	95
5.2	SCCA-IgM en la predicc3n de hepatocarcinoma	97
5.2.1	Descripci3n de la cohorte	97
5.2.2	Factor de riesgo de desarrollar CHC.....	99
5.2.3	Estimaci3n interna de la combinaci3n de SCCA-IgM y AFP	101
5.2.4	Validaci3n externa.....	104
6.	DISCUSI3N.....	107
6.1	¿Que hemos encontrado?	108
6.2	¿Qu3 existe en la literatura?.....	110
6.3	Implicaciones en la pr3ctica cl3nica	113

6.4	Limitaciones del estudio.....	119
7.	CONCLUSIONES.....	121
8.	ANEXO	123
8.1	Leyenda de las figuras.....	124
8.2	Leyenda de las tablas	127
9.	REFERENCIAS.....	129

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cirrosis

1.1.1 Cirrosis

La cirrosis es el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresivas. Es un proceso difuso caracterizado por la pérdida de parénquima hepático, formación de septos fibrosos y de nódulos de regeneración que causan la distorsión de la arquitectura hepática normal y una alteración de la anatomía de la vascularización hepática y de la microcirculación.¹ La cirrosis hepática es una causa mayor de morbilidad y mortalidad en Europa y Estados Unidos. Es la cuarta causa más común de muerte en adultos en todo el mundo y la principal razón de más de 5.500 trasplantes de hígado en Europa cada año.²

1.1.2 Etiología

Las causas principales de la cirrosis en los países occidentales son la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), el abuso del alcohol y, cada vez más, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés).³ En el África subsahariana y en la mayor parte de Asia, la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) representa la causa más común de cirrosis. Aproximadamente, el 40-60% de los casos en Europa y Norteamérica son debidos al abuso de alcohol y al hígado graso no alcohólico, mientras que el 25-30% es el resultado de la hepatitis crónica vírica.¹ En el mundo se calcula que alrededor de 170 millones de personas tienen hepatitis crónica por el VHC, y cerca del 20-30% de los pacientes presentará cirrosis en 20-30 años de evolución.³ Aproximadamente un tercio de la población en el mundo tiene evidencia serológica de infección por el VHB pasada o presente, y alrededor de 350 millones están infectados crónicamente, especialmente en países

subdesarrollados.⁴ La prevalencia de esta enfermedad hepática avanzada es difícil de evaluar y probablemente mayor que la reportada, porque las etapas iniciales son asintomáticas hasta que se produce una descompensación clínica de la cirrosis, por lo que el trastorno a menudo no se diagnostica.⁵

Metabólica-tóxica <ul style="list-style-type: none"> Alcohol Cirrosis infantil de la India Enfermedad de hígado graso no alcohólico 	Infecciosa <ul style="list-style-type: none"> Virus de las hepatitis VHB, VHC y VHD Eschistosomiasis 	Autoinmune <ul style="list-style-type: none"> Hepatitis autoinmune Cirrosis biliar primaria Colangitis autoinmune 	Inducido por fármacos <ul style="list-style-type: none"> Arsénico, metotrexato, isoniazida, amiodarona, α-metildopa, CCl4
Enfermedades biliares <ul style="list-style-type: none"> Cirrosis biliar secundaria (obstrucción biliar por estenosis, litiasis de larga evolución...) Colangitis esclerosante primaria Colangitis asociada IgG4 Colangiopatía isquémica Ductopenia Atresia de vías biliares Síndrome de Alagille 	Vascular <ul style="list-style-type: none"> Insuficiencia cardíaca crónica derecha ("cirrosis cardíaca") Pericarditis constrictiva crónica Síndrome de Budd-Chiari Síndrome de obstrucción sinusoidal (enfermedad venooclusiva) Telangiectasia hemorrágica hereditaria (enfermedad Rendu-Osler-Weber) 	Genético-hereditaria <ul style="list-style-type: none"> Hemocromatosis hereditaria Enfermedad de Wilson Déficit de α1-antitripsina Porfiria cutánea tarda 	Enfermedades por depósito de glucógeno <ul style="list-style-type: none"> Galactosemia Tirosinemia Abetalipoproteinemia Fibrosis quística

Figura 1. Etiología de la cirrosis hepática.

La fibrosis es una respuesta común del hígado a la lesión crónica producida por una variedad de agresiones como enfermedades metabólicas, infecciones virales, abuso en la ingesta de alcohol, drogas y ataque autoinmune a los hepatocitos, conductos biliares, o anomalías congénitas. En el hígado fibrótico, los componentes de la matriz extracelular son similares a los presentes en el hígado normal solo que incrementados cuantitativamente, por el desarrollo de la fibrosis.⁶ Los siguientes mecanismos fisiopatológicos son importantes en el desarrollo de cirrosis hepática de cualquier etiología: a) necrosis o lisis de hepatocitos con pérdida del parénquima hepático e inflamación; b) fibrogénesis (depósito de matriz extracelular);

c) cambios en el crecimiento celular (hiperplasia, regeneración) y d) alteraciones vasculares y circulatorias.¹

1.1.3 Definición de cirrosis

La cirrosis hepática se define mediante los siguientes parámetros combinados: (1) puntuación superior a 2 según la relación aspartato aminotransferasa (AST) a plaquetas (APRI) mediante la fórmula: $[\text{AST} / \text{límite superior normal}] / \text{recuento plaquetario} (109 / \text{L}) / 100$,⁷ (2) evidencia ultrasonográfica de hígado de tamaño pequeño con y sin esplenomegalia / ascitis y (3) nivel de albúmina menor de 35 g / L sin otras causas identificables de hipoalbuminemia como pérdida renal o pérdida gastrointestinal.

1.1.4 Clasificación

La cirrosis hepática se caracteriza por una fase asintomática, denominada cirrosis compensada, de duración variable. En esta fase los pacientes pueden llegar a tener hipertensión portal y varices esofágicas. Los factores pronósticos de mortalidad que se identifican con una mayor frecuencia en esta fase compensada están relacionados con la presencia de hipertensión portal (recuento de plaquetas, tamaño del bazo o presencia de varices).^{8,9} El pronóstico con respecto a la supervivencia marcadamente empeora con una supervivencia al año y a los dos años del 61 y el 50%, respectivamente, y una supervivencia a los 10 años del 7%.⁹

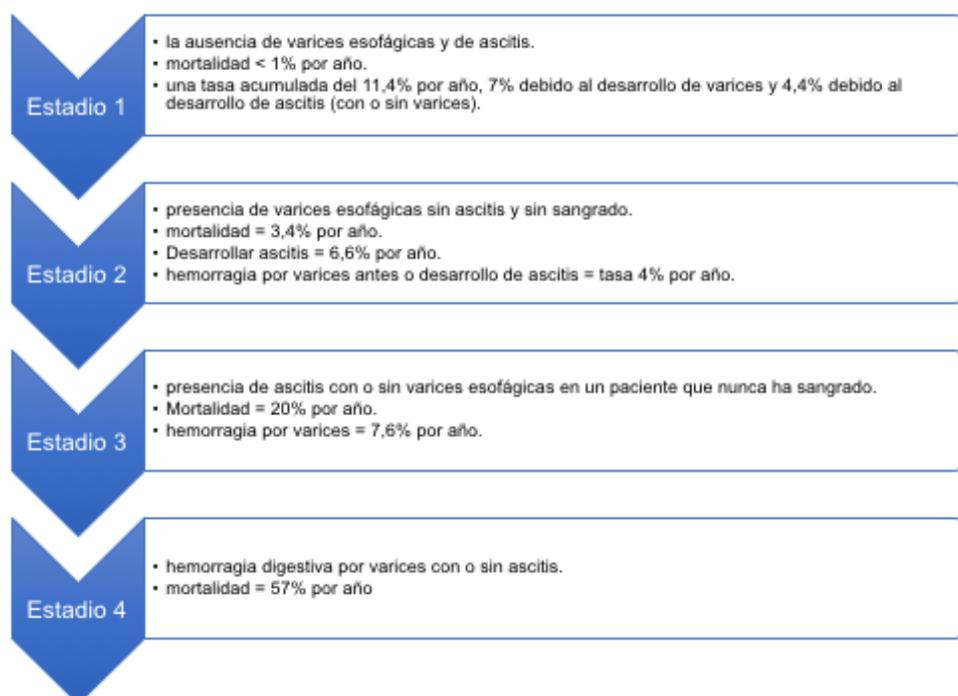


Figura 2. Estadios clínicos de cirrosis con diferente pronóstico.

1.1.5 Índices pronósticos usados en la práctica clínica en cirrosis

En los últimos cincuenta años se han desarrollado diversas herramientas clínicas con este propósito. Una de las más conocidas y utilizadas es la escala de Child-Pugh, diseñada en 1964 por Child y Turcotte y posteriormente modificada por Pugh. Un estadio A de Child-Pugh refleja la función hepática bien preservada, un estadio B indica disfunción hepática moderada con una expectativa de vida mediana de aproximadamente 3 años y una puntuación C refleja una disfunción hepática grave con una esperanza de vida de aproximadamente 1 año.⁹ Hace una década, investigadores de la Clínica Mayo en Estados Unidos desarrollaron el sistema de puntuación de MELD.

	1 punto	2 puntos	3 puntos
Bilirrubina (mg/dl)	<2	2-3	>3

Albúmina (g/dl)	>3,5	2,8-3,5	<2,8
INR	<1,7	1,7-2,3	>2,3
Ascitis	Ausente	Responde diuréticos	Ascitis refractaria
Encefalopatía	Ausente	Grado 1-2	Grado 3-4

Tabla 1. La puntuación de Child-Pugh (5-15 puntos) es el resultado de la suma de la puntuación de cada una de las 5 variables. De esa forma se determina: Child A: 5-6 puntos; mortalidad 0% a 1 año y 15% a los 2 años; Child B: 7-9 puntos; mortalidad 20% a 1 año y 40% a los 2 años; Child C: 10-15 puntos; mortalidad 55% a 1 año y 65% a los 2 años).

Índice de M	Mortalidad a los 3 meses
<9	1,9%
10-19	6%
20-29	19%
30-39	52,3%
>40	71,3%

Tabla 2. Indices del MELD = 9,57 Ln (creat, mg/dl) + 3,78 Ln (Bil, mg/dl) + 11,2 Ln (INR) + 6,43. Datos tomados de Wiesmar R.

Las características del índice MELD y su amplio uso en la asignación de órganos para trasplante hepático han determinado que sea hoy considerada la mejor herramienta para estimar el pronóstico a corto plazo de los pacientes con cirrosis.^{10,11} El índice MELD ha sido validado en diversas publicaciones de pacientes cirróticos de diversas etiologías y con diferente grado de gravedad, todos los estudios han demostrado que el índice MELD puede predecir de manera precisa la mortalidad de los pacientes cirróticos.¹ Si los pacientes tienen una puntuación de 15 o mayor, deben ser referidos a un centro de trasplantes. Los pacientes con una puntuación de menos de 15, pero con complicaciones de la cirrosis también deben ser referidos para evaluación de trasplante de hígado. Es esencial que los médicos de familia persistan en recomendar a los pacientes con cirrosis abstenerse del alcohol. Sin abstinencia de alcohol, el trasplante es improbable que se realice.^{12,13}

1.2 Hepatocarcinoma

1.2.1 Epidemiología

Los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia son los de pulmón, mama y colorrectal, mientras que las causas de muerte por cáncer más frecuentes son las de pulmón, estómago e hígado.¹⁴ El CHC representa más del 90% de los cánceres primarios de hígado.¹⁵ Con casi 800.000 nuevos casos anuales y 600.000 muertes anuales, constituye un problema de salud mundial.¹⁶ EL CHC actualmente se considera que es la sexta neoplasia más frecuente en el mundo y la tercera causa más frecuente de muerte relacionada con el cáncer.¹⁶ La mayoría de los casos (85%) ocurre en países en vías de desarrollo, mientras en países desarrollados, la incidencia en general es baja.¹⁶ Esto se debe principalmente al hecho de que la mayoría de los CHC se diagnostican en etapas avanzadas cuando los pacientes no son elegibles para terapias curativas.¹⁷ Hay una incidencia creciente del CHC a nivel mundial. Globalmente, las tasas de incidencia y de mortalidad fueron de 65.000 y 60.240 casos en Europa y de 21.000 y 18.400 casos en los Estados Unidos, respectivamente, en 2008.¹⁴ Se ha informado que su incidencia mundial está en aumento y se prevé que excederá un millón de casos por año para 2025.¹⁸ España, los Estados Unidos y Austria se encuentran entre los países de tasa de riesgo intermedio con TEE de 5 a 10 por 100.000 años-persona. El sur de Europa presenta una incidencia intermedia: 5-10 por 100.000 habitantes por año. Para España, según datos de la GLOBOCAN 2008 la tasa de incidencia para este tumor es de 9,6 casos nuevos por 100.000 habitantes/año para los hombres y 2,5 casos nuevos por 100.000 habitantes/año para las mujeres.¹⁵ África oriental, Europa central y oriental, Europa septentrional y Asia

central y meridional tienen un índice de probabilidad de accidentes cerebrovasculares de CHC inferior a <5,0 por 100.000 personas-año.¹⁸

La supervivencia global de los pacientes con CHC es pésima con una supervivencia a cinco años de menos del 15%. Los pacientes con CHC precoz alcanzan tasas de supervivencia a 5 años del 70% con resección o trasplante, mientras que aquellos con CHC avanzado tienen una mediana de supervivencia de menos de 1 año.¹⁹ Debido a la falta de instrucciones efectivas para diagnosticar el CHC en etapa temprana, el pronóstico para CHC es muy pobre con una relación general de mortalidad a incidencia de 0,95, lo que indica que la tasa de letalidad del CHC es muy alta y el número de pacientes que muere por CHC es casi similar al de nuevos casos de CHC durante el mismo período de tiempo.¹⁸

1.2.2 Vigilancia

La Organización Mundial de la Salud define el cribado como la identificación presuntiva de una enfermedad o defectos no reconocidos mediante pruebas, exámenes y/o procedimientos que pueden aplicarse rápidamente. La vigilancia ha sido ampliamente practicada por gastroenterólogos y hepatólogos de todo el mundo y se ha convertido en una práctica estándar, a pesar de que las evidencias sobre sus beneficios no se han establecido claramente.^{20,21}

El CHC es un trastorno que se presta a la vigilancia, puesto que los individuos en riesgo pueden ser identificados fácilmente debido a la presencia de la hepatitis vírica u otras hepatopatías subyacentes. De hecho, en los países occidentales, el CHC aparece sobre una base cirrótica en hasta un 90% de los casos.²² Cuando el CHC causa síntomas la enfermedad suele estar en una etapa avanzada, por lo tanto, que no es susceptible de tratamiento potencialmente curativo, y generalmente la

muerte se produce en unos pocos meses. De esta manera, el CHC tiene un curso subclínico prolongado que brinda la oportunidad de una detección temprana. Las lesiones de CHC en etapa temprana son pequeñas y frecuentemente curables por métodos mínimamente invasivos.²³ Es decir, el pronóstico de los pacientes cuyo CHC se detectó en el cribado es mucho mejor que la supervivencia de aquellos en los que se diagnosticó CHC después de la aparición de los síntomas.²⁴ La utilidad de un programa de vigilancia para el diagnóstico en etapa temprana del CHC, en la práctica clínica se ha demostrado en varios estudios.²⁵⁻²⁸ Esto suele conseguirse a través de un diagnóstico temprano (migración de estadio) que, a su vez, potencia la aplicabilidad y la relación coste efectividad de los tratamientos curativos.²⁹

Una reducción de la mortalidad global constituye una variable de valoración más apropiada para evaluar la eficacia de la vigilancia.¹⁵ Actualmente la vigilancia se basa en la situación económica de 1992, y se define como rentable si logra una mejora de 3 meses en la supervivencia a un costo inferior a los US \$ 50.000 por año salvado. La rentabilidad de un programa de vigilancia depende de manera crítica^{30,31}: a) la tasa de CHC detectada incidentalmente; b) incidencia anual de CHC; c) la adopción del trasplante como estrategia de tratamiento; y d) la edad de la población diana. El tiempo de duplicación del tumor y los hallazgos de los estudios de cohortes indican que el mejor intervalo de detección es de 6 meses.³² La mayoría de los estudios se realizaron antes de que el trasplante de hígado se considerara un tratamiento efectivo para el CHC temprano. La supervivencia a largo plazo mejora en pacientes que se someten a un trasplante hepático para CHC, ya que, el trasplante hepático no solo se trata el CHC sino también la cirrosis subyacente.³³ Además, es importante que el aumento del riesgo no sea suficiente para que la vigilancia valga la pena; la decisión de ofrecer vigilancia también debe considerar la probabilidad del paciente de recibir

tratamiento si se descubre que tiene CHC. Si la gravedad de la enfermedad hepática y/o comorbilidades indica que el tratamiento efectivo es imposible, no hay beneficio de la vigilancia.³⁴ La asociación americana para el estudio de las enfermedades hepáticas (AASLD), la asociación asiática del pacífico para el estudio del hígado (APASL) y la asociación europea para el estudio del hígado (EASL) han publicado guía práctica sobre el manejo del CHC.^{15,35,36} Las guías de la AASLD establecen que la vigilancia del CHC es rentable cuando la incidencia anual es del 1,5% o superior en pacientes con cirrosis.³⁶

AASLD	APASL	EASL-EORTC
Hombres asiáticos mayores de 40 años	Cirrosis con solo etiología viral	Cirrosis de cualquier etiología
Mujeres asiáticas mayores de 50 años		Portadores de VHB no cirróticos con hepatitis activa
Antecedentes familiares de CHC		Antecedentes familiares de CHC
África / América edad mayor de 20 años		
Cirrosis de cualquier etiología		

Tabla 3. Vigilancia del CHC.

Las tres guías recomiendan dos estudios ultrasonográficos al año para la vigilancia de CHC en todos los pacientes con cirrosis.^{15,36} APASL recomienda el uso de ultrasonografía abdominal y AFP para la vigilancia.³⁵ En contraste, AASLD y EASL recomiendan la ecografía abdominal sólo debido a la limitada sensibilidad y especificidad de los biomarcadores CHC séricos.^{15,36} Esto se basa en el conocimiento de que casi el 80% de los CHC pequeños no muestran niveles aumentados de AFP y la sensibilidad disminuye al 25% en tumores menores de 3 cm.³⁷ Interesantemente,

la sociedad japonesa recomienda aplicar los tres biomarcadores AFP/PIVKA-II/AFP-L3.³⁸

1.2.3 Diagnóstico

El CHC es el único cáncer que no requiere confirmación histológica para realizar un diagnóstico.³⁹ Dos de las principales preocupaciones a la hora de realizar la biopsia son la hemorragia, o la propagación de las células cancerosas, que pueden darse en un 0,1-0,01% o un 2,7%, respectivamente⁴⁰. El CHC se diagnostica actualmente mediante métodos de imagen en la mayoría de casos sin necesidad de biopsia, ya que presenta un comportamiento radiológico específico. Aun así, la biopsia sigue siendo un estándar de oro ideal para el diagnóstico.¹⁵

Un sistema de estadificación universal es importante para cualquier tipo de cáncer, no solo para el pronóstico, sino también para orientar las decisiones de manejo, facilitar la comunicación efectiva entre los médicos tratantes e informar el diseño de los ensayos clínicos.³⁹ Durante las últimas décadas se han propuesto varios sistemas de estadificación diferentes:

- el sistema de estradificación Okuda
- el Programa Italiano de Cáncer del Hígado (CLIP)
- el sistema de estadificación BC Clinical Liver Cancer (BCLC)
- el estadificación Integrada de Japón (JIS)
- el AJCC
- el sistema quirúrgico de estadificación TNM
- el sistema de estadificación de Hong Kong.

Generalmente los pacientes que se detectan durante la vigilancia son asintomáticos y tienen CHC en etapa inicial. Por el contrario, los pacientes

diagnosticados fuera de la vigilancia generalmente se presentan en etapas avanzadas con tumores sintomáticos grandes y/o invasión de la vena porta. Los síntomas incluyen malestar general, pérdida de peso, anorexia, disconfort abdominal o signos relacionados con la disfunción hepática avanzada.²³ La estandarización del diagnóstico del CHC mediante técnicas no invasivas ha facilitado la aplicación de programas de cribado para la detección precoz en pacientes con cirrosis hepática. Para nódulos mayores de 2 cm se acepta el diagnóstico con un solo método de imagen dinámico o una AFP mayor de 200 ng/ml.¹⁵ El diagnóstico no invasivo se ha establecido con una sola técnica de imagen en los nódulos de más de 2 cm que presentaban la característica radiológica distintiva del CHC y con dos técnicas de imagen coincidentes para los nódulos de 1-2 cm de diámetro (tomografía [TC], resonancia magnética [RM] y ecografía [ECO] con contraste). Las guías de la AASLD recientemente actualizadas han propuesto que una sola exploración de imagen (TC o RM) que muestre la característica radiológica distintiva del CHC basta para diagnosticar los tumores de 1-2 cm de diámetro.¹⁵ La tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) en general tienen una alta sensibilidad combinada (55-80%) y especificidad (70-91%) en el diagnóstico de CHC,⁴¹ pero funciona mal en las lesiones inferiores a 2 cm.⁴² La ECO es otra modalidad de imagen utilizada en el diagnóstico de CHC.⁴³ Si tras 2 años no se detecta crecimiento se debe volver al cribado habitual cada 6 meses.

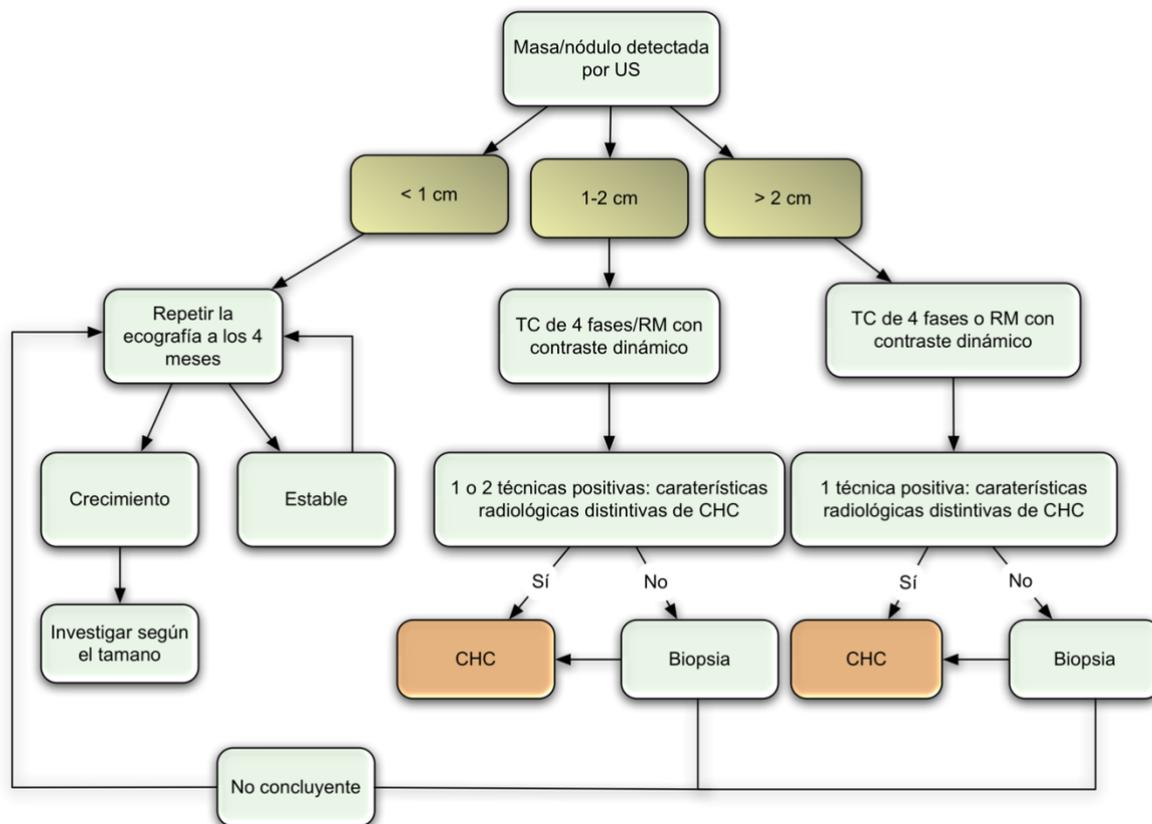


Figura 3. Diagnóstico del CHC.

En los pacientes con cirrosis hepática, los nódulos regeneradores pueden ser difíciles de distinguir del CHC en la ecografía, y la sensibilidad de la ecografía para detectar el CHC temprano se encuentra en un rango del 32% al 65%.^{44,45} Además, aunque la sensibilidad de las biopsias hepáticas varía entre 70 y 90% para todos los tamaños de tumor, las lesiones pequeñas pueden pasarse por alto, dando un resultado falso negativo. En los países en desarrollo, donde la disponibilidad de la vigilancia por ultrasonido es bastante baja, los marcadores serológicos para la vigilancia son de especial interés.⁴⁶

1.2.4 Tratamiento

El CHC basado en la clasificación de BCLC está respaldada por las guías de práctica clínica europeas y estadounidenses.^{15,36} Este sistema de estadificación define cinco subclases de pronóstico y asigna tratamientos específicos para cada

etapa. Cinco tratamientos pueden extender la esperanza de vida de los pacientes con CHC; las terapias radicales incluyen resección quirúrgica, trasplante de hígado o ablación percutánea, mientras que las terapias paliativas incluyen quimioembolización y sorafenib.¹⁵

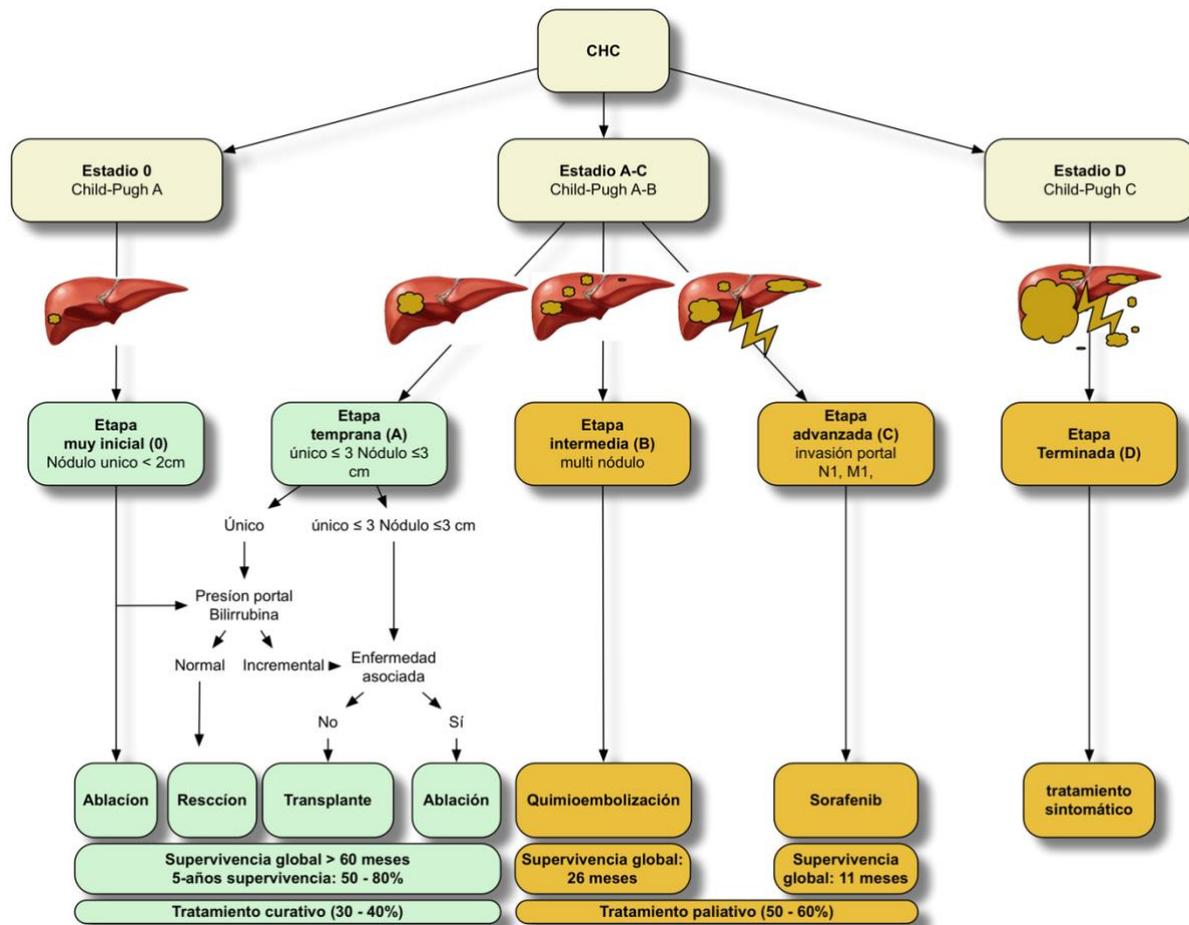


Figura 4. Tratamiento del CHC.

Enfermedad en etapa temprana

Aproximadamente el 30 - 40% de los pacientes (etapas iniciales 0 y A) son elegibles para terapias potencialmente curativas: resección, trasplante o ablación local. Dichos tratamientos pueden proporcionar tasas medias de supervivencia de 50-80% a 5 años.²³ En pacientes con función hepática preservada, sin evidencia de

hipertensión portal y tumores asintomáticos únicos de menos de 5 cm de diámetro, la resección quirúrgica ha proporcionado tasas de supervivencia a los 5 años del 70%, ha minimizado las complicaciones y reducido la recurrencia,^{15,36,47,48} tal y como se confirmó en un reciente meta-análisis.⁴⁹ Con la mejora de la tecnología y la experiencia, la resección laparoscópica se utiliza cada vez más con mejores resultados iniciales.⁵⁰

Del mismo modo, el trasplante de hígado para los tumores que cumplen los criterios de Milán (definidos como un único tumor de tamaño ≤ 5 cm o hasta tres nódulos de tamaño ≤ 3 cm sin invasión vascular) tienen una supervivencia a 5 años de casi el 74%.^{47,51} Otro estudio reciente publicó que las tasas de supervivencia global se aproximan al 75% a los 4 años y la recurrencia tiene lugar en 8-15% de todos los receptores de injerto que cumplen los criterios de Milán.^{52,53}

En pacientes con CHC en etapa inicial o intermedia (BCLC 0-B) que no son candidatos para cirugía, la ablación con radiofrecuencia ha demostrado una tasa de supervivencia a 5 años del 50 al 70%.¹⁵ El tamaño del tumor (3-4 cm), el número (≤ 3 tumores) y la ubicación (accesible con guía ecográfica) limitan la aplicabilidad de la ablación tumoral percutánea.⁵⁴ Por la limitación de la ablación percutánea, la radiofrecuencia es la terapia ablativa estándar en las primeras etapas de la enfermedad, ya que proporciona mejores resultados que el etanol.^{15,55} Tasas de supervivencia a cinco años después del promedio de ablación por radiofrecuencia al 60%.⁵⁶ Sin embargo, todos los estudios informan una tasa más alta de recidiva local para la RFA que para la resección.⁵⁷

Enfermedad en etapa intermedia

Se recomienda a los pacientes con CHC de etapa intermedia (BCLC B) (enfermedad multinodular, función hepática conservada y la ausencia de síntomas relacionados con el tumor, invasión vascular y diseminación extrahepática) la quimioembolización en forma de quimioembolización arterial transcatéter (TACE). La estadificación de BCLC propone la TACE como la base del tratamiento en este grupo, pero los estudios han demostrado que los pacientes con CHC de etapa intermedia con tumores grandes localizados aún pueden ser elegibles para la resección^{58,59} y trasplante hepático⁶⁰. La TACE implica la inyección secuencial, en una o más ramas de la arteria hepática, de fármacos quimioterapéuticos (doxorubicina, mitomicina C, cisplatino o sus combinaciones) cargados en partículas o emulsionados en Lipiodol (un agente de contraste oleoso que se retiene selectivamente en los nódulos CHC) y embolización de partículas que interrumpen el flujo sanguíneo.^{61,62} La terapia con TACE ha llevado a tiempos de supervivencia medios actuales entre 26 y 40 meses en centros derivados.^{63,64}

Enfermedad en etapa avanzada

El sorafenib, un inhibidor de tirosina kinasa múltiple, fue capaz de aumentar sustancialmente la supervivencia en pacientes con CHC en etapa avanzada (BCLC C) de 7,9 meses a 10,7 meses.⁶⁵ El tratamiento con quimioterapia sistémica y terapias antiestrógenas ha demostrado ser ineficaz en el CHC. Llovet, 2003 #10593} El sorafenib ha demostrado lograr un aumento absoluto en la supervivencia media de 3 meses.^{65,66}

Desde hace décadas, el CHC se diagnostica comúnmente en las etapas avanzadas de la enfermedad cuando el sujeto presenta síntomas o ha experimentado deterioro en la función hepática. El tratamiento en esta etapa no es viable y en la

mayoría de los casos, el diagnóstico de CHC en el contexto de la cirrosis del hígado se consideró terminal. En los últimos años, a causa de la utilización de programas de detección temprana, el CHC se diagnostica en las primeras etapas cuando todavía es posible aplicar tratamientos eficaces.⁶⁷

1.2.5 Métodos predictivos (no biomarcadores)

1.2.5.1 Factores de riesgo

Se ha demostrado que factores clínicos como la infección crónica con virus de la hepatitis, el abuso del alcohol, la cirrosis, el sexo masculino, el envejecimiento, la obesidad y la diabetes mellitus son factores de riesgo para el desarrollo de CHC. De hecho, aproximadamente el 90% de los CHC se asocian a un factor de riesgo subyacente conocido.¹⁵ Los factores se pueden clasificar como factor de riesgo del paciente y factor viral (tabla).

Factor riesgo del paciente	Mayor edad
	Sexo hombre
	Historia familia de CHC
	Factor genético
	Cirrosis
	Fumar
	Consumo de alcohol
	Diabetes Mellitus
	Obesidad
	Aflatoxina
Factor viral	Alto nivel del VHB ADN
	hepatitis B e positivo antígeno
	VHB genotipo
	VHB mutation
	Nivel de antígeno de superficie de la hepatitis B

	Co-infección con el virus de la hepatitis C, el virus de la hepatitis D o el VIH
--	--

Tabla 4. Factores del riesgo del CHC.

Fundamentalmente afecta a varones más que las mujeres (relación varón / mujer = 2.4).¹⁶ La incidencia de CHC aumenta con la edad, alcanzando su mayor prevalencia entre los mayores de 65 años.^{68,69} Esto puede deberse a que los hombres son más propensos a fumar, beber alcohol y tener hepatitis más activa y mayores reservas de hierro. Además, tanto el estrógeno y los receptores de andrógenos han sido implicados en la hepatocarcinogénesis a través del incremento de la interleucina-6 y la kinasa relacionada con el ciclo celular.^{70,71} En promedio, los familiares de primer grado de los pacientes con CHC tienen un aumento de 2 veces en la incidencia de CHC.⁷² Aunque la observación puede explicarse en parte por la infección por el VHB y estilos de vidas similares entre los miembros de las familias, estudios genómicos recientes han comenzado a desentrañar los cambios genéticos y epigenéticos que conducen al desarrollo del CHC.^{73,74} Por otro lado, los pacientes con hepatitis B crónica con obesidad y diabetes también tienen mayor riesgo de CHC.⁷⁵ Esto se explica en parte por el aumento de la progresión de la fibrosis en pacientes con síndrome metabólico.⁷⁶ Se ha demostrado que la diabetes mellitus, la obesidad, la dislipemia y el tabaco se asocian a un incremento de muerte relacionada con el CHC.⁷⁷⁻⁷⁹ Pero hay evidencias recientes que respaldan que el tabaquismo constituye un cofactor claro.⁸⁰ Además, las enfermedades que pueden inducir cirrosis hepática tales como hemocromatosis hereditaria, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, o síndrome metabólico deben considerarse un factor de riesgo para CHC.

En África y Asia Oriental, la parte más importante de casos son debidos a la hepatitis B (60%), mientras que en los países occidentales desarrollados, solamente un 20% de los casos pueden atribuirse a la infección por el VHB, y la hepatitis crónica C es en cambio el principal factor de riesgo.¹⁴ De manera global, el 54% de los casos pueden atribuirse a la infección por VHB (que afecta a 400 millones de personas en todo el mundo) mientras que un 31% pueden atribuirse a la infección por VHC (que afecta a 170 millones de personas), con lo que quedan aproximadamente un 15% asociados a otras causas. Las infecciones por VHB y VHC incrementan el riesgo de CHC aproximadamente 20 veces.⁸¹ Los estudios han demostrado de que cada año aproximadamente un 1%–8% de los pacientes con cirrosis desarrolla CHC, un 3%–8% de los pacientes cirróticos con infección por VHC y el 2% de los pacientes cirróticos con infección por VHB.⁸²

1.2.5.1.1 Virus de la Hepatitis C.

Los pacientes con cirrosis por VHC tienen una incidencia amplia y creciente a 5 años del aproximadamente 17% en occidente, mientras que en Japón la incidencia es del 30%.⁸³ No obstante, el VHC es más importante para el desarrollo de CHC en Europa Occidental y Norteamérica. La intensidad de la inflamación hepática está relacionada tanto con la carga vírica como con el genotipo y es la causante de un proceso crónico de necrosis y regeneración hepatocelular que puede evolucionar a cirrosis finalmente a CHC.⁸⁴ De igual modo, en un reciente meta-análisis, se ha confirmado que el VHC genotipo 1b aumenta el riesgo de desarrollo de CHC.⁸⁵

1.2.5.1.2 Virus de la Hepatitis B.

El VHB afecta a 400 millones de personas en todo el mundo.¹⁵ En África y Asia Oriental, la principal causa de cirrosis es la hepatitis B (60%)⁸⁶. La terapia antiviral

puede reducir drásticamente el riesgo de CHC en pacientes cirróticos.⁸⁷⁻⁸⁹ En Asia, la proporción de casos de CHC HBsAg positivo es > 50% en China, Taiwán, Corea, Tailandia, Vietnam y Turquía.⁹⁰ Los pacientes con antígeno e positivo (HBeAg) y altos niveles de ADN del VHB tienen un mayor riesgo de CHC. En un estudio poblacional de 11.893 hombres en Taiwán, el riesgo relativo de CHC fue de 60,2 para aquellos con hepatitis B HBeAg positivo.⁹¹

Se han descrito diferentes genotipos (A - H) del virus B, basados en una diferencia de secuencia de nucleótidos de P8% en el genoma viral. Los genotipos A y D son predominantes en Europa, mientras que los genotipos B y C son más prevalentes en Asia.⁹² Debido a una fase de eliminación inmunológica más prolongada y una lesión hepática prolongada, los pacientes con infección por el genotipo C del VHB son más propensos a desarrollar cirrosis.⁹³ y tienen un aumento de 2 a 5 veces en el riesgo de CHC.⁹⁴⁻⁹⁶

La vacuna contra el VHB se recomienda para todos los recién nacidos y niños. Los niños nacidos de madres con VHB positivo también deben recibir inmunoglobulina HB. Los adultos con alto riesgo de contraer la infección por el VHB también deben vacunarse.³⁶ En España gracias a las campañas de vacunación masiva, tiene una baja prevalencia.

1.2.5.1.3 Alcohol.

En cuanto al alcohol, si consideramos un consumo de más de 80 g/día por un período superior a 10 años, podría multiplicar por 7 el riesgo de padecer CHC, lo que se considera responsable del 32% de todos los hepatocarcinomas.⁹⁷ El abuso crónico de alcohol (> 40g/d) multiplica entre 10 a 20 la producción de citocromo oxidasa P450

que activa la formación de radicales libres como las nitrosaminas, que tienen acción carcinogénica.⁹⁸

1.2.5.1.4 NAFLD

Un gran estudio europeo encontró NAFLD en el 94% de los pacientes obesos [índice de masa corporal (IMC) > 30 kg/m²], incluyendo el 25% con NASH, y una prevalencia general de NAFLD en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que oscila desde el 40% al 70%.⁹⁹ El NAFLD actualmente representa la enfermedad hepática más común en los países occidentales.¹⁰⁰ El tema más preocupante resaltado por una literatura de rápido crecimiento es la aparición de CHC en pacientes con NASH que aún no tienen cirrosis. Por lo tanto, la cantidad de personas con NAFLD potencialmente en riesgo de desarrollar CHC puede ser mucho mayor de lo que se pensaba. Esto revela una necesidad urgente de comprender mejor los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de CHC en hígados no cirróticos y actualizar los programas de detección.¹⁰¹

1.2.5.1.5 Síndrome metabólico.

El síndrome metabólico, especialmente la resistencia a la insulina, la obesidad y la diabetes se asocian a una mayor progresión hacia la fibrosis hepática. La inflamación crónica de bajo grado es característica de la resistencia insulina, particularmente en el contexto de la obesidad, y favorece el reclutamiento de macrófagos y la liberación masiva de varias citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la interleucina -6.¹⁰² Recientes estudios han demostrado que la DM es un factor de riesgo independiente para desarrollo del CHC¹⁰³⁻¹⁰⁵. Aunque se requiere una evaluación más profunda para extraer conclusiones definitivas, se estima que la DM2 puede aumentar el riesgo de CHC en

aproximadamente dos o tres veces, y el desarrollo de CHC es la complicación hepática más preocupante en pacientes diabéticos.¹⁰¹

El sobrepeso y la obesidad también son cofactores conocidos para el desarrollo de CHC en pacientes con enfermedad hepática crónica viral o relacionada con el alcohol, aunque a menudo se subestima su importancia. En una cohorte de 900,000 adultos estadounidenses, el riesgo de morir de cáncer de hígado fue 4.5 veces mayor en hombres con un IMC de 35 kg/m² o superior en comparación con el grupo con un IMC normal (18.5-25 kg / m²).⁷⁸ El tratamiento con metformina puede reducir el riesgo de CHC en este grupo, como lo demuestran varios estudios de cohorte retrospectivos y también prospectivos.^{106,107}

Aflatoxinas:

La exposición alimentaria a la aflatoxina B1, derivada de los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, son ubicuos en la naturaleza y contaminan diversos alimentos básicos en las regiones tropicales y subtropicales, constituye un cofactor importante para la aparición de CHC en algunas partes de África y Asia.¹⁵

1.2.5.2 Predicción

1.2.5.2.1 Hepatitis B

Se han señalado numerosos factores de riesgo de hepatocarcinogénesis relacionada con la infección por el VHB. Factores virales, como el nivel de ADN del VHB sérico, el nivel de antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), HBeAg, las mutaciones del promotor central, así como los genotipos y los factores del hospedador, incluyendo edad, sexo, fibrosis, cirrosis y los niveles elevados de ALT son factores de riesgo conocidos para el CHC.¹⁰⁸⁻¹¹⁵

En un estudio se recolectaron sueros en diferentes tiempos para la medición del ADN del HBV durante períodos de hasta 16 años. El análisis multivariado mostró que la carga viral persistentemente alta (ADN del VHB detectado en el 50% de las visitas) se asoció con una mayor tasa de desarrollo de CHC¹¹⁰.

En la puntuación de GAG-CHC (Guía con la edad, el sexo, el ADN del VHB, las mutaciones del promotor central y la cirrosis) se demostró que la cirrosis recibe la mayor ponderación como factor de riesgo, seguido por el sexo masculino, la edad y el ADN del VHB. Debido al tamaño de la muestra relativamente pequeño y al pequeño número de eventos, la cohorte no se dividió en conjuntos de entrenamiento y validación. En su lugar, se realizó el método estadístico de bootstrap.¹¹¹ El puntaje puede estar por encima de 100, ya que la edad es uno de los componentes. Un valor de corte de 100 tenía una sensibilidad y especificidad de 84.1% y 76.2% para la predicción a 5 años, y 88.0% y 78.7% para la predicción a 10 años, respectivamente. Los valores predictivos negativos para excluir el futuro desarrollo de CHC fueron 98.3% -100%.^{111,116}

Sobre la base de los factores de riesgo de 4.339 pacientes coreanos, un modelo se estableció un programa de detección de CHC. Los autores aplicaron de forma prospectiva el programa de cribado a 833 pacientes con enfermedad crónica del hígado en tres grupos [un grupo de bajo riesgo (<5% de probabilidad), un grupo intermedio (5% -15% de probabilidad), y un grupo de alto riesgo (>15% de probabilidad)] por este modelo. Los pacientes fueron seguidos, a intervalos que variaron según el índice de riesgo. Según IPM, 2 de 324 pacientes en el grupo de bajo riesgo (0,62%), 20 de 413 pacientes en el grupo de riesgo intermedio (4,8%) y 22 de 96 pacientes en el grupo de alto riesgo (22,9%) fueron diagnosticado con CHC¹¹²

La puntuación de la UC-CHC (Universidad China) estudió prospectivamente 10 años de vigilancia de CHC dirigido por oncólogos en la universidad de Hong Kong^{114,115} y fue validado en 424 pacientes en una clínica hospitalaria de Hong Kong.⁹⁴ La hipoalbuminemia y la cirrosis fueron los factores más importantes, seguidos por el ADN del VHB, la edad y la bilirrubina. La AUROC para la predicción de CHC en 5 y 10 años en la cohorte de validación fue de 0,76 y 0,78, respectivamente. En un punto de corte de 5 puntos, el valor predictivo negativo para excluir el CHC en 10 años fue del 97%, mientras que el valor predictivo positivo fue del 27%.¹¹⁶

El aumento de la evidencia sugiere que la replicación persistente del VHB como lo indica el alto ADN del VHB sérico es un predictor del CHC. Un estudio de cohorte de gran escala en Taiwán (estudio REVEAL-HBV) ha demostrado los sujetos que tenían una carga viral inicial inferior a 2.000 UI / ml tenían el riesgo más bajo de CHC y los sujetos con ADN de HBV superior a 20.000 UI / ml comenzaron a tener un mayor riesgo de CHC¹¹³ Posteriormente se realizó un estudio que superó la limitación del anterior de que el riesgo de CHC se había reflejado en la medición única del ADN del VHB en suero al comienzo. Por ello, hay algunas advertencias sobre estos puntajes. Los pacientes en el estudio REVEAL eran todos mayores de 30 años así que los hallazgos no se aplican a individuos más jóvenes con altas cargas virales que podrían estar en la fase inmunotolerante de la enfermedad.¹¹⁷

En 2010, los investigadores REVEAL-HBV primero desarrollaron nomogramas para CHC predicción utilizando datos de 3.653 pacientes.¹¹⁸ Los mismos investigadores refinaron el análisis y desarrollaron el puntaje REACH-B (estimación del riesgo de carcinoma hepatocelular en la hepatitis B crónica), que se obtuvo en 3.584 pacientes de la comunidad de Taiwán y se validó en 1.505 pacientes de Hong Kong y Corea.¹¹⁹ El puntaje REACH-B comprende la edad, el sexo, el nivel de ALT en

suero, el nivel de ADN del VHB en suero y el HBeAg, los factores en la puntuación incluyen el sexo masculino, la edad, la ALT, el HBeAg positivo y el ADN del VHB. La AUROC para predecir el CHC en 5 y 10 años en la cohorte de validación fue de 0,80 y 0,77, respectivamente. A diferencia de los puntajes CU-CHC y GAG-CHC, no se considera la presencia de cirrosis para evaluar el riesgo de CHC en el puntaje REACH-B.

Además de anterior, en otra cohorte de 2.688 pacientes de Taiwán infectados con los genotipos B o C del VHB, los determinantes del riesgo de CHC incluyen su sexo, edad, estado de HBeAg, genotipo HBV y niveles de ALT y ADN de HBV, pero no nivel de HBsAg.¹²⁰

Kim et al. analizaron prospectivamente 1.110 pacientes con CHB que recibieron una elastografía transitoria; el análisis multivariado mostró que la edad, el sexo masculino y la rigidez hepática son predictores independientes de CHC (todos $P < 0.05$).¹²¹ Además, Wong et al. desarrollaron una nueva medición de la rigidez hepática (LSM): puntuación de CHC compuesta de LSM, edad, albúmina sérica y niveles de ADN del VHB. Debido a que el diagnóstico de cirrosis basado en la ecografía puede ser incorrecto, la cirrosis como factor de CU-CHC fue sustituida por LSM.¹²²

En el estudio de Hung et al. desarrolló una puntuación de riesgo según la edad, el sexo, la ALT, la enfermedad hepática crónica previa, el historial familiar de CHC y el tabaquismo acumulado tuvieron una buena precisión discriminatoria tanto en la derivación del modelo como en los conjuntos de validación (estadística c para 3-, 5- y 10- año de predicción de riesgo: 0,76-0,83).¹²³

1.2.5.2.2 Hepatitis C y otras enfermedades

La hepatitis C se desarrolló una puntuación del estudio HALT C que predicir el desarrollo de CHC. Este puntaje incluyó la edad, la fosfatasa alcalina de la raza, la presencia de varices, el tabaquismo y el recuento de plaquetas como criterios predictivos.¹²⁴ Un estudio revisó 8.482 sujetos daneses con cirrosis alcohólica y describió una tasa de incidencia de CHC a 5 años de 1,0%¹²⁵. Además, se ha demostrado que el riesgo de CHC en la hepatitis autoinmune también es inferior al 1,5%,¹²⁶ mientras que en la etapa 4 de la cirrosis biliar primaria es más elevado¹²⁷

1.2.5.2.3 Nivel de transaminasas

Un estudio desarrolló modelos de predicción para el CHC basado en los datos recolectados rutinariamente en una consulta con el objetivo de proporcionar una herramienta sencilla, eficiente y ampliamente disponible para identificar y cuantificar el riesgo de cáncer en la población de riesgo promedio. El modelo que usa el nivel de transaminasas demostró una alta potencia de predicción, con un valor de AUC de 0,912, que fue significativamente mejor que aquellos que incluyeron AFP.¹²⁸ Debido a que este modelo es capaz de predecir el riesgo de CHC con alta precisión de predicción independientemente de la etiología¹²⁸.

1.2.5.2.4 Según diferentes etiología

En una gran cohorte de pacientes cirróticos con un espectro representativo de enfermedad hepática avanzada, el riesgo de CHC varió ampliamente de acuerdo con la etiología de la cirrosis. Se utilizaron datos clínicos y de laboratorio de rutina para desarrollar un sistema de puntuación fácil de usar para predecir el riesgo de CHC a lo largo del tiempo. El índice de riesgo de hepatocarcinoma de Toronto puede usarse

para identificar pacientes con riesgo muy bajo de CHC, que pueden no requerir vigilancia.¹²⁹ Este sistema fue capaz de estratificar a los pacientes en riesgo bajo, intermedio y alto de CHC. Los pacientes del grupo de bajo riesgo tuvieron una incidencia anual de CHC de aproximadamente 0,3%, muy por debajo del umbral de la vigilancia costo-efectiva, mientras que la incidencia en el grupo de alto riesgo fue del 3,2% al año, lo que sugiere que estos pacientes requieren un seguimiento estrecho.¹²⁹

1.2.5.2.5 Sugerencias sobre la dirección de la investigación futura

Las políticas de salud pública que fomentan la implementación de tales programas en poblaciones bien definidas deberían conducir a un aumento en la detección temprana del tumor y, por lo tanto, a los beneficios de supervivencia.²³ Los estudios deberían identificar biomarcadores que predigan la respuesta al tratamiento y desarrollar biomarcadores para la detección temprana en los programas de vigilancia.²³ Recientemente, Wong et al. en 2015 aportaron sugerencias sobre la dirección de la investigación futura.¹¹⁶

1. Optimizar las puntuaciones de riesgo de CHC para los pacientes con terapia antiviral

2. Reevaluar los predictores de CHC en cohortes de raza caucásica con mayor duración de seguimiento.

3. Incorporar además las pruebas de elastografía y biomarcadores séricos de fibrosis en las puntuaciones de riesgo de CHC.

4. Explorar el papel de la predicción combinada de riesgo de CHC y la vigilancia mediante técnicas basadas en imágenes con un componente de evaluación de la fibrosis (por ejemplo, el impulso de fuerza de radiación acústica, elastografía de onda de corte, elastografía de resonancia magnética).

5. Explorar el papel de otros factores de riesgo de CHC (por ejemplo, genotipos de HBV, mutaciones del promotor central, genética de acogida) como componentes de las puntuaciones de riesgo.

6. Definir el intervalo de vigilancia en pacientes con diferentes niveles de riesgo utilizando la mortalidad general como punto final.

7. Explorar el uso de marcadores tumorales adicionales e imágenes para la vigilancia del CHC en pacientes de alto riesgo.

Tabla 5. Propuestas de investigación futura.

1.3 Biomarcadores

1.3.1 Biomarcadores para diagnosticar CHC

1.3.1.1 Biomarcadores

Los marcadores tumorales se definen, según el instituto nacional del cáncer, como sustancias producidas por células tumorales y/o por otras células del cuerpo, en respuesta al cáncer o ciertas condiciones benignas. Estas sustancias se pueden encontrar en varios fluidos corporales o en muestras de tejidos.¹³⁰ Los marcadores tumorales serológicos son en su mayoría proteínas que pueden ser enzimas, hormonas, antígenos u otras. Su nivel generalmente aumenta en muchas condiciones patológicas, especialmente el cáncer. Además, el pronóstico, el seguimiento y los marcadores tumorales se utilizan principalmente para diagnosticar el cáncer en una etapa temprana.¹³¹ Además de para diagnosticar y pronosticar, otra función de los marcadores es monitorizar el tratamiento. Los biomarcadores séricos son sorprendentes herramientas potenciales para la vigilancia y el diagnóstico en los estadios tempranos del CHC gracias a la metodología no invasiva, objetiva y reproducible que potencialmente permiten.¹³² Algunos de los métodos más comunes de biomarcadores para cánceres implican el uso de espectroscopia,¹³³ ELISA¹³⁴ y/o técnicas potenciométricas.¹³⁵ En particular, si bien un solo marcador por sí solo podría ser poco específico para predecir esta enfermedad, el uso de más de un marcador a la vez debería reducir en gran medida la posibilidad de errores de resultados falsos negativos.¹³⁶

Los recientes avances tecnológicos en genómica, proteómica y metabolómica están permitiendo una mejor elucidación de la biología del cáncer y la caracterización de eventos moleculares claves durante la carcinogénesis.¹³⁷ Para el diagnóstico de

CHC, los esfuerzos recientes se han centrado en estrategias para maximizar la utilidad de AFP, AFP-L3%, Des- γ -carboxyprotrombina (DCP), y Glypican-3 (GPC3), que han sido investigados durante años pero no han alcanzado la etapa de utilidad clínica extendida en Europa o Norteamérica. La AFP se ha utilizado durante muchos años en todo el mundo como un biomarcador de CHC, y el AFP-L3% y DCP se han utilizado durante varios años en Asia, especialmente en Japón, como complemento de ultrasonido y AFP en la vigilancia de CHC. Sin embargo, estudios en países occidentales han demostrado que la AFP, AFP-L3% y DCP tienen una sensibilidad relativamente baja para la detección temprana de CHC. Como consecuencia, su uso se ha vuelto discutible, y las guías actuales de Estados Unidos y Europa no lo recomiendan para la vigilancia del CHC. Además, tenemos GPC3, Golgi protein 73 (GP73), Neopterin, VEGF, AFP mRNA, etc...



Figura 5. Biomarcadores para diagnóstico del CHC.

1.3.1.2 Fases del desarrollo de biomarcadores para la detección temprana de CHC

Sin embargo, el propósito principal de los biomarcadores de CHC es la detección temprana de CHC dentro de un programa de vigilancia, con el objetivo de reducir la mortalidad por CHC. Para lograr este objetivo, los biomarcadores deben establecerse a través de las siguientes fases.^{137,138}:

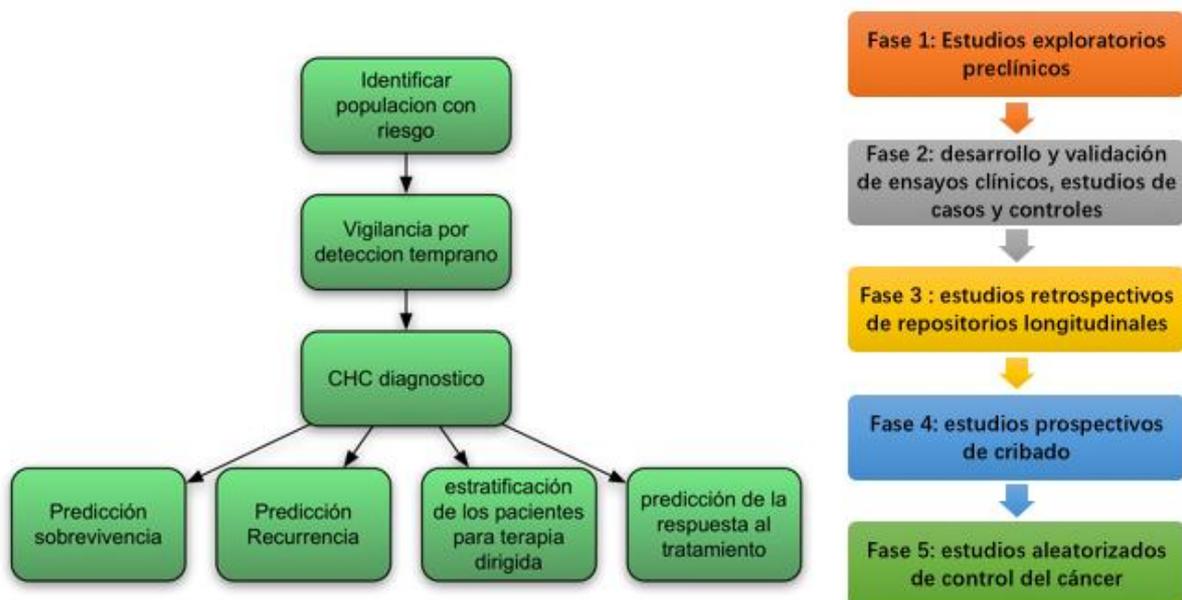


Figura 6. Aplicaciones de biomarcadores de CHC establecidos y novedosos en atención clínica.

Hay 5 fases definidas en el estudio de un biomarcador¹³⁷:

Fase 1 (Estudios exploratorios preclínicos)

El objetivo es identificar marcadores potenciales (1) comparando las diferencias en las expresiones de genes, proteínas y/o otros análisis entre cáncer frente a tejido normal o (2) detecciones de diferencias en el espectro de anticuerpos circulantes en pacientes con cáncer en comparación con individuos control.

Fase 2 (Desarrollo y validación de ensayos clínicos, estudios de casos y controles)

Se desarrolla un ensayo clínico para medir los biomarcadores en bioespectros que pueden obtenerse mediante métodos menos invasivos (por ejemplo, sangre, orina, heces o aire exhalado). Los bioespectros se obtienen a partir de casos de CHC establecidos y sujetos de control no CHC representativos de la población objetivo de cribado. Se genera una curva característica de funcionamiento del receptor (ROC) para evaluar el rendimiento de diagnóstico del ensayo. La reproducibilidad del ensayo también se evalúa dentro y entre los laboratorios.

Fase 3 (Estudios retrospectivos de repositorios longitudinales)

La capacidad de un ensayo para detectar CHC preclínico se evalúa obteniendo bioespecímenes a intervalos regulares de cohortes de individuos con riesgo de cáncer, como por ejemplo aquellos con cirrosis establecidas y haciendo seguimiento de la cohorte para el determinar desarrollo de cáncer con el paso del tiempo. Los nuevos biomarcadores pueden entonces ser evaluados por su capacidad para predecir el desarrollo de cáncer. Si el ensayo puede distinguir a los que posteriormente desarrollarán cáncer de los controles que no desarrollan cáncer meses o años antes de la presentación clínica, los criterios para una prueba de detección positiva se definen para los estudios de fase 4.

Fase 4 (Estudios prospectivos de cribado)

El objetivo es determinar la tasa de detección y la tasa de referencia falsa (o tasa de falsos positivos) de un ensayo de biomarcador. El ensayo se aplica para el cribado de una gran cohorte de la población diana para el cribado de CHC. Los sujetos positivos a la prueba se remiten a una investigación adicional para establecer el diagnóstico de CHC. La tasa de detección es la proporción de sujetos examinados que resultan positivos y tienen CHC, mientras que la tasa de referencia falsa es la

proporción de sujetos sometidos a prueba que resultan positivos pero no tienen CHC. Dado que los pacientes en el grupo de referencia falsa pueden ser referidos para investigaciones posteriores que pueden exponerlos a daño físico o psicológico, esto proporciona una medida de las consecuencias negativas del ensayo.

Fase 5 (Estudios aleatorizados de control del cáncer)

Por último, en la prueba más rigurosa de la utilidad clínica de un biomarcador, se realiza un estudio prospectivo aleatorizado para determinar si el uso de la prueba de cribado puede reducir la mortalidad por CHC en la población diana. Los sujetos con riesgo de CHC son asignados aleatoriamente en 2 grupos, los que se someten y los que no se someten a la prueba de cribado, y serán seguidos para comparar sus resultados de supervivencia.

1.3.1.3 Alfa-fetoproteína

AFP es un biomarcador usado más frecuentemente en clínica en el mundo. La AFP ha sido considerado para ser el biomarcador más útil para la evaluación de CHC, desde que se descubrió en el suero de pacientes con CHC en 1964.¹³⁹ AFP es una glicoproteína de suero fetal codificada por un gen que se encuentra localizado en el cromosoma 4. Su peso molecular se calcula de 70 kDa, con un 4% de carbohidratos. Los cambios que se han observado en las cadenas glucídicas de la AFP, sugieren microheterogeneidad de la AFP. En el feto, AFP es una proteína de transporte que alcanza su máximo en la semana 16 del embarazo, normalmente se produce durante el desarrollo fetal y neonatal por el hígado, el saco vitelino, en pequeñas concentraciones y en el tracto gastrointestinal.¹⁴⁰ La expresión de AFP por hepatocitos y células endodérmicas del saco vitelino se reduce después del nacimiento. La evaluación de la AFP es útil: a) para la detección y el diagnóstico de

CHC en pacientes con riesgo de desarrollar CHC, en asociación con la ecografía hepática; (b) durante la puesta en escena dentro del sistema de clasificación de CLIP (*Cancer of the liver Italian program*); (c) como un marcador para detectar la progresión del tumor en pacientes con CHC productor de AFP. Actualmente, la AFP es el único biomarcador de CHC que se ha estudiado hasta la fase 5 del desarrollo de biomarcadores, además, es el único biomarcador que se ha evaluado en un ensayo controlado aleatorio.¹⁴¹

Se define un umbral de 20 ng / ml como el valor de corte más utilizado para diferenciar a los pacientes con CHC de adultos sanos en las investigaciones clínicas.¹⁴²⁻¹⁴⁵ Un valor de *cut-off* de 20 ng / ml dio lugar a una sensibilidad de 64% y especificidad de 91%,¹⁴⁶ mientras que un valor de *cut-off* de 400 ng / ml dio lugar a una sensibilidad de 17% y especificidad del 99%.¹⁴⁷ Los valores superiores a 400 ng / ml se consideran en general de diagnóstico de CHC, aunque sólo alrededor del 20% de los pacientes con valores elevados tengan CHC ¹⁴⁸. También una revisión sistemática evaluación de AFP (a un nivel de umbral de 20 ng/ml) en pacientes cirróticos mostró sensibilidad y específicas de 41% a 65% y 80% a 94%, respectivamente, para CHC en cualquier etapa.¹⁴⁹ En una revisión sistemática que incluye 14 estudios de diversos diseños de diferentes grupos de pacientes, las estimaciones de grupo (intervalo de confianza del 95%) de sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud positiva y razón de probabilidad negativa de ultrasonografía (USG) para detectar CHC son 60,5% (44-76%), 96,9% (95-98%), 17,7 (8,5-36,9) y 0,5 (0,4-0,6), respectivamente.¹⁵⁰ Previamente, informamos que a través del análisis multivariado, se determinó que un nivel bajo de AFP postoperatorio es un factor de riesgo independiente significativo para la recidiva después de la hepatectomía curativa (P <0.001).¹⁵¹ Un estudio prospectivo de ensayos aleatorios realizado en

Shanghai (China) mostró que un programa de vigilancia utilizando AFP y una ecografía hepática realizada cada 6 meses resultó en una reducción del 37% en la mortalidad por CHC.¹⁴¹

Pero no todos los CHC segregan AFP y no todos los diagnósticos son precisos. Los niveles de AFP son normales en hasta el 40% de los pacientes con CHC, particularmente durante la etapa inicial de la enfermedad (baja sensibilidad).^{152,153} Solo el 50-70% de los pacientes afectados por CHC, presentan niveles elevados de AFP, mientras que aproximadamente un tercio de los pacientes con pequeños nódulos tumorales (< 3 cm) presentan un nivel de AFP en el suero superior a 200 ng/ml. Al fijar un valor de *cut-off* de 100 ng/ml, la sensibilidad resulta tan baja que es inaceptable como valor diagnóstico.¹⁵⁴ Un meta análisis de AFP para la vigilancia CHC encontró que muestra una sensibilidad de 39% a 65% y una especificidad de 76% a 94% para el diagnóstico de tumores.²⁶ También, la AFP puede estar elevada en pacientes con enfermedad hepática crónica en ausencia de CHC, lo que hace que este biomarcador no sea adecuado para las pruebas de vigilancia.¹⁵⁵ El problema con AFP como biomarcador de CHC confiable es que el CHC es positivo para la proteína en solo 60-80% de los casos, y los falsos positivos dificultan distinguir el CHC en etapa inicial de otros trastornos, tales como la hepatitis aguda y la cirrosis, así como tumores embrionarios y ciertos tumores gastrointestinales.¹⁵⁶ De tal manera, el umbral más bajo puede ser una solución eficaz para la detección de fase temprana, con el fin de mejorar significativamente la precisión de diagnóstico para CHC, se necesitan biomarcadores adicionales para complementar la AFP, especialmente debido al hecho de que muchos pacientes con enfermedades hepáticas benignas, tales como hepatitis crónica, cirrosis hepática y cáncer gastrointestinal, también tienen niveles elevados de AFP en suero.^{156,157}

Además, el rendimiento de la ecografía depende de la experiencia del operador, del equipo de ultrasonidos disponible y la textura del eco del hígado. El objetivo de la vigilancia de CHC es detectar pequeños tumores que permitan un tratamiento curativo mediante un análisis temprano y rentable, la vigilancia de CHC por USG y AFP anuales podría detectar un tumor temprano a un coste de US \$ 11.800.¹⁵⁸ Sin embargo, la evaluación de la sensibilidad real de la ecografía es difícil debido a la falta de un buen estándar definitivo para el CHC.³³ El objetivo de la vigilancia de CHC es detectar pequeños tumores que permitan un tratamiento curativo mediante un análisis temprano y rentable, la vigilancia de CHC por USG y AFP anuales podría detectar un tumor temprano a un costo de US \$ 11.800.¹⁵⁸

Las guías europeas y estadounidenses consideran que la AFP es demasiado imprecisa para estudiar a los pacientes con riesgo de CHC y recomiendan únicamente el uso de la ecografía.^{15,36} Esto se basa en el conocimiento de que casi el 80% de los CHC pequeños no muestran niveles aumentados de AFP y la sensibilidad disminuye al 25% en tumores menores de 3 cm.³⁷ La sensibilidad diagnóstica de los ultrasonidos depende de muchos factores, incluyendo la calidad del ecógrafo, la experiencia del examinador y también de las características antropométricas del paciente, la sensibilidad de esta técnica para el diagnóstico de CHC temprano se encuentra entre el 32% y el 65%⁴⁴. Por esta razón, algunos autores, así como las guías asiáticas, sugieren el uso de AFP en la vigilancia de CHC^{159,160}. La sociedad japonesa incluso recomienda aplicar los tres biomarcadores AFP/PIVKA-II/AFP-L3.³⁸

1.3.1.4 Utilidad clínica de la heterogeneidad de la alfa-fetoproteína

El desarrollo de aplicaciones de la química biológica y los análisis relacionados, así como el estudio adicional de AFP han revelado que AFP tiene tres glicofomas

(AFP-L1, AFP-L2 y AFP-L3), de acuerdo con su capacidad de unión a la lectina de *Lens culinaris* (LCA). La capacidad de unión de AFP-L3 es heterogénea y, por ello, los resultados todavía son controvertidos. Un estudio demostró que AFP-L3%, con un valor de *cut-off* de 15%, tenía una sensibilidad y especificidad del 96,9 y 92%, respectivamente, en la detección de CHC.¹⁶¹ En realidad, la utilidad clínica de AFP-L3% y la relación de AFP-L3% a AFP total siguen sin estar claras. El límite para AFP-L3% está configurado a >10% de la AFP sérica total. La medición de AFP-L3% para CHC tiene una especificidad >95% y una sensibilidad de aproximadamente el 51%.^{162,163} Para la detección de CHC, AFP-L3 se utiliza actualmente en un valor umbral de 10%. Un gran estudio prospectivo multicéntrico informó de una especificidad que se acerca al 92%, pero una sensibilidad de solo el 37% en este umbral para el CHC en cualquier etapa.¹⁶⁴ Otro estudio multicéntrico de casos y controles encontró que AFP-L3 mostró una especificidad del 97% y una sensibilidad del 28% para el diagnóstico de CHC en etapa inicial (estadios 0 y A de BCLC).¹⁶⁵ La concentración de AFP-L3 de 15%, se correlaciona más con CHC asociado a invasión de la vena porta, tanto la AFP sérica total y AFP-L3 se puede medir, y la estimación de la relación AFP-L3 / AFP es útil en el diagnóstico y pronóstico de CHC.¹⁶⁶ La elevación de la AFP-L3 se observó en el 34,3% de los pacientes 1 año antes del diagnóstico de CHC.¹⁶⁷ Un estudio mostró que la sensibilidad y especificidad de la PCR-AFP-L3 vs AFP-L3 convencional fueron 57,0%, 63,5%, 40,4% y 81,1%.¹⁶⁸ En un estudio de pacientes con CHC con lesiones menores de 2 cm de tamaño, utilizando el nivel de valor de *cut-off* de 10% era de diagnóstico para la presencia de CHC. AFP-L3 se encuentra asociado con CHC diferenciados y poco avanzados. Los niveles más altos AFP-L3 se encontraron en el CHC hipervasculares, en comparación con CHC isovascular y hipovascular.¹⁶⁶ La utilidad de este marcador es limitada, ya que sólo se

han realizado estudios en poblaciones de Asia oriental en los cuales ya se estudian los niveles de AFP.

1.3.1.5 Des-γ-carboxyprotrombina

DCP es un marcador ideal para el diagnóstico o cribado del CHC más específico que la AFP porque parece no aumentar en otras enfermedades del hígado. Muchos estudios han demostrado que el nivel de DCP sérica en pacientes con enfermedades hepáticas benignas y malignas se desvía significativamente de lo normal, y que su sensibilidad diagnóstica puede ser mayor que la AFP. Los niveles más altos de DCP en pacientes con CHC están asociados con un peor pronóstico.¹⁶⁹ Los pacientes con DCP positivo con frecuencia desarrollan invasión de la vena porta, metástasis intrahepática, trombosis de la vena hepática e infiltración capsular.¹⁷⁰⁻¹⁷² La DCP está implicada en la angiogénesis tumoral, aumentando la expresión génica de factores angiogénicos tales como EGF-R, VEGF y MMP-2 y ayudando a la proliferación y migración de las células endoteliales vasculares humanas. Por el contrario, el nivel de DCP está estrechamente relacionado con un tumor más grande, invasión vascular y sirve como un marcador tumoral más preciso en comparación con AFP y AFP-L3.¹⁴⁵ Informó que DCP en un corte de 125 mAU/mL mejor distinguido CHC de enfermedades crónicas del hígado y la cirrosis de AFP en un corte de 11 ng/mL (sensibilidad de 89% vs 77% y especificidad de 95% frente a 73%) mientras que Nakamura et al. Informaron que la AFP superó al DCP para el diagnóstico de CHC <3 cm, pero el DCP tuvo un mejor rendimiento que el AFP para el diagnóstico de CHC > 5 cm.^{165,173} Por otro lado, un estudio multi céntrico de casos y controles solo DCP exhibió una sensibilidad del 56% en pacientes en etapa inicial.¹⁵⁵ Sin embargo, la combinación de DCP con AFP aumentó la sensibilidad del 65% al 87% a los 3 meses

antes del diagnóstico de CHC; sin embargo, la ciudad específica disminuyó del 84% al 69%. Según el DCP se ha examinado principalmente en los países asiáticos y la experiencia con DCP en los países occidentales, particularmente en Europa, sigue siendo limitada.

Además, la detección combinada de DCP y AFP puede mejorar la sensibilidad de diagnóstico y se puede utilizar para predecir la recurrencia de CHC dentro de los 6 meses posteriores a la cirugía.¹⁷⁴ Una combinación de estos marcadores (AFP, AFP-L3, DCP) sólo mejora la precisión para la detección temprana de CHC; la combinación de pruebas puede aumentar la sensibilidad pero la especificidad para la detección de los primeros descensos de CHC.¹⁷⁵ En estudio francesa, la combinación de DCP y AFP mejoró ligeramente el rendimiento diagnóstico de CHC etapa temprana en esta cohorte francesa (AUC = 0,826; IC del 95%: desde 0,722 hasta 0,929).¹⁷⁶

1.3.1.6 La osteopontina

La osteopontina, también conocida como proteína fosfatasa relacionada con la transformación, es una glicofosfoproteína que se une a la integrina que se sobreexpresa en muchos tipos diferentes de tumores malignos. Se ha descubierto que la proteína desempeña un papel en muchas funciones fisiológicas celulares, incluida la migración, la invasión y metástasis.¹⁷⁷ La osteopontina es arginina glicina aspartato que contiene la fosfoproteína. Está implicado en procesos normales de remodelación de tejido, así como ciertas enfermedades,¹⁷⁸ también se ha evaluado para cáncer de colon y páncreas. La osteopontina es una glicoproteína producida por varios tipos de células diferentes, en particular las células óseas y epiteliales, y altamente expresada en diversos tipos de cáncer, incluido el CHC.¹⁷⁹ La transfección de las células con anti-sentido la osteopontina ARN reduce la malignidad de las células y causó la

disminución de la tumorigénesis.¹⁸⁰ Normalmente, la osteopontina se expresa en la bilis epitelio del conducto, las células estrelladas, y las células de Kupffer, pero no en los hepatocitos. Sin embargo, la expresión elevada de la osteopontina suero se ha informado en pacientes con CHC comparación con los pacientes normales del hígado o aquellos con cirrosis hepática o hepatitis crónica.^{179,181} Es importante destacar que este estudio también se investigó la utilidad de la osteopontina en el diagnóstico temprano. CHC con la osteopontina ARNm más de expresión se asoció con una tasa de supervivencia a 10 años menor que CHC sin la osteopontina más de expresión. En los pacientes con CHC, superior plasma la osteopontina correlacionó positivamente con la función hepática reducida, tal como se define mediante el aumento de la etapa del tumor, lo que sugiere el uso de la osteopontina plasma como factor pronóstico.^{182,183} El AUC para discriminar entre el CHC en etapa inicial (estadio A de BCLC) y la cirrosis fue de 0,73. La osteopontina demostró una sensibilidad y especificidad de 75% y 62% para el CHC en etapa inicial, en comparación con 46% y 93% para AFP. Cuando se combina con AFP, el AUC aumentó a 0.81. En un umbral de 91 ng / ml para la osteopontina, el uso combinado de los biomarcadores dio como resultado una sensibilidad del 83% y una especificidad del 63%. Con base en tales hallazgos, el valor de la osteopontina para el diagnóstico de CHC en etapa inicial se está investigando adicionalmente en estudios retrospectivos de biomarcadores longitudinales.¹⁷⁹ Además, Para la osteopontina, las AUC discriminan entre CHC en estadio temprano (estadio BCLC A) y la cirrosis fue de 0,73. la osteopontina demostró una sensibilidad y especificidad de 75% y 62% para CHC etapa temprana, en comparación con 46% y 93% para AFP. Cuando se combina con la AFP, el AUC aumentó a 0,81. En un umbral de 91 ng / ml para la la osteopontina, el uso combinado de los biomarcadores dio como resultado una sensibilidad de 83% y una especificidad

de 63%. Tsuchiya, 2015 #2176} La mayoría de los estudios que analizan la osteopontina para el diagnóstico de CHC fue retrospectivo e incluyó un rango de 30 a 179 pacientes con CHC. La sensibilidad de la osteopontina para CHC fue del 86%, con una especificidad del 86%, resultando en una precisión diagnóstica comparable a la de AFP. Se necesitan más estudios de validación de utilizar este marcador en la rutina clínica diaria.¹⁸⁴ La combinación de osteopontina y AFP en estos puntos de corte tuvo un mejor rendimiento que cualquiera de los ensayos solo, con un AUROC (IC del 95%) de 0.81 (0.70-0.91), una sensibilidad del 83% y una especificidad del 63%.¹⁷⁹

1.3.1.7 Glypican-3

GPC3 es un proteoglicano de sulfato de heparina y se ha demostrado que es capaz de promover la proliferación de células tumorales mediante la modulación de vías de Wnt y que afectan a la adhesión celular.¹⁸⁵ Gracias a su unión a la membrana celular a través de los anclajes de glicofosfatidilinositol, interactúa con varios factores de crecimiento, como El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que contribuyen al desarrollo de cáncer hepático.¹⁸⁶ Curiosamente, GPC3 parece funcionar de manera diferente en diversos tipos de cáncer; mientras que GPC3 es debajo regularado en cáncer de mama, cáncer de ovario y el adenocarcinoma de pulmón, es por incima de regulación en CHC.¹⁸⁷ Como un marcador tumoral, la expresión de GPC3 se ha demostrado ser elevados en el tejido CHC y en el suero de 40% a 53% de los pacientes con CHC.¹⁸⁵ Estudios recientes han demostrado que los niveles de GPC3 aumentan en pacientes con CHC. GPC3 es capaz de diferenciar entre lesiones hepáticas malignas y benignas; de hecho, los niveles de GPC3 son indetectables en sujetos sanos y en pacientes con

enfermedad hepática benigna (como nódulos displásicos o cirróticos).^{188,189} De tal manera, se realizó un estudio para efectuar la comparación, la sensibilidad agrupada y la especificidad de AFP y los resultados fueron 34,7% (26,2%-44,1%) y 87,6% (82,6%-91,6%), respectivamente. Por último, se evaluó la combinación de GPC3 y AFP en este estudio y se encontró que aumentar la sensibilidad a 76% para los tumores en fase inicial <3 cm de tamaño.¹⁵⁶ Por lo tanto, GPC3 puede funcionar como un biomarcador temprano en hepatocarcinogenesis.¹⁹⁰ Es importante destacar que la expresión de GPC3 parece ser independiente del tamaño del tumor, como GPC3 exhibió una sensibilidad de 56% en pacientes con tumores en fase inicial que son tamaños menos de 3 cm.¹⁹¹ En un meta-análisis, la sensibilidad y la especificidad agrupada de GPC3 suero para el diagnóstico de CHC en general fueron 55,2% (52,9%-57,4%) y 84,2% (82,2-86,0%).¹⁹²

1.3.1.8 Golgi protein 73

GP73 (también conocido como Golp2 y GOLM1) es una proteína de membrana de Golgi específico de tipo II que está codificada por el cromosoma 9q21.33 en el GOLM1.¹⁹³ Fisiológicamente, GP73 se expresa en células epiteliales biliares pero no en hepatocitos. En la enfermedad hepática, la expresión GP73 aumenta en las células hepáticas.¹⁹⁴ La literatura sugiere que GP73 es un marcador de suero valioso en pacientes con CHC, la concentración sérica también puede aumentar en pacientes con tumores hepáticos benignos sólidos. Por lo tanto, un ensayo GP73 es menos adecuado para discriminar entre tumores primarios malignos y benignos del hígado.¹⁹⁵ De hecho, muestra una especificidad del 75% y una sensibilidad del 69%. Hay varias formas de correlacionar las GP73 con diferentes niveles de glicosilación.¹⁹⁶ GP73 está estrechamente asociada con enfermedades hepáticas, particularmente

CHC, y ha recibido una atención creciente. Los resultados de estudios recientes han demostrado que la GP73 en suero es significativamente elevada en carcinoma hepático primario.¹⁹⁷ GP73 es en el suero de pacientes con CHC infectadas por HBV fue significativamente mayor en comparación con los portadores del VHB, los pacientes sin enfermedades hepáticas y adultos sanos. La sensibilidad de diagnóstico de CHC (76,9%) fue marcadamente elevada en comparación con la AFP (48,6%), lo que sugiere GP73 es un novedoso y eficaz suero biomarcador para el diagnóstico de CHC.¹⁹⁸ Con una mediana de la concentración en suero en sujetos normales de 4 mg / ml, que está dentro de la gama de muchas proteínas de plasma clásicos. Informó que mediante el uso de microarrays de tejidos, GP73 fue establecido para ser sobreexpresado en los tumores hepáticos malignos en comparación con los tejidos no cancerosos. El grado de expresión de GP73 correlacionado con el tumor.¹⁹⁹ La combinación de la GP73 y AFP aumentó la sensibilidad y especificidad de 89,2% (IC del 95%: 86,7-91,5%) y 85,2% (IC del 95%: 83,4% -86,4%), respectivamente, con una AUC de 0,96. El uso combinado de GP73 y AFP-L3 para el diagnóstico de casos de CHC AFP séricos bajos también demostró una sensibilidad más alta (94,0%), la especificidad (93,1%), y una mayor precisión (93,3%) que los solo separados.²⁰⁰

1.3.1.9 Alfa-fucosidasa

Alfa-fucosidasa (AFU) es una glicosidasa encuentra en lisosomas celulares y aumento de la actividad se encontró en el suero de los pacientes con CHC. La medición de los niveles de actividad en suero α -L-fucosidasa puede ayudar en la detección de carcinoma de hígado en una etapa temprana, posiblemente mejorar el pronóstico de los pacientes con la enfermedad. Los estudios de su precisión diagnóstica han mostrado una alta sensibilidad (82%) y especificidad (70,7%)

85,4%).^{191,201-203} Los datos apoyan la utilidad clínica de la medición de la actividad sérica α -L-fucosidasa durante el seguimiento de los pacientes cirróticos y confirman que la actividad de suero α -L-fucosidasa de hecho puede ser considerado como un marcador fiable de CHC.²⁰⁴ Su actividad es mayor en pacientes con CHC que en individuos sanos y en pacientes con enfermedad hepática crónica. La medición AFU es útil en asociación con la AFP en el diagnóstico precoz del CHC. Un estudio comparativo de AFP y AFU en una cohorte egipcio encontrado AFU tener una sensibilidad más alta (81,8% frente a 68,2%), pero una baja especificidad (55% vs 75%) con una sensibilidad AFP + AFU combinada de 88,6%.¹⁸⁵ Además, aquí hay una correlación positiva entre los niveles de AFU y el tamaño del tumor en pacientes con CHC.^{201,205-208} Por otro estudio, La detección combinada de AFP y AFU puede mejorar la sensibilidad, especificidad y precisión diagnóstica de AFP de 70, 85 y 79.7%, respectivamente, a 95, 100 y 99.1%, respectivamente.²⁰⁹ Se registraron diferentes valores de corte de AFU por varios autores como valores óptimos de corte, incluidos 443 nmol/ml/h²⁰⁸, 870 nmol/ml/h¹⁹¹, 138 nmol/ml/h.²¹⁰

Sin embargo, la especificidad de AFU es relativamente pobre y también se sobre expresa en diabetes, pancreatitis y los pacientes hipotiroidismo. La actividad de AFU también es susceptible a la etnicidad. Por lo tanto, el valor clínico de AFU requiere una investigación adicional.^{157,211}

1.3.1.10 Neopterinina

En 1998, un estudio realizado en Japón encontró neopterinina, una proteína que ahora se conoce para ser liberado de los macrófagos después de la estimulación inflamatoria, a ser elevados en la orina de pacientes con CHC avanzado.²¹² La neopterinina es mejoradas en la neopterinina en suero en pacientes con tumores

malignos está relacionada no debido a la producción y emisión de neopterina por el cáncer células mismos, pero debido a la activación crónica de la inmunidad celular en respuesta a la presencia de tumores malignos. Los niveles de neopterina urinario pueden estar asociadas con anormalidad de las pruebas de función del hígado y el tamaño del tumor en pacientes con CHC.²¹³

1.3.1.11 γ -glutamyltransferasa

γ -glutamyltransferasa (GGT), es una proteína de membrana que se sintetiza en los microsomas de las células humanas. Es más alto en los hígados de embriones y disminuye rápidamente a los niveles más bajos después del nacimiento.¹⁴⁵ El desarrollo de CHC por cáncer de diferenciación celular inversa es similar a la etapa embrionario, mejorar el nivel de GGT en suero en un grado moderado alto. Por lo tanto, GGT puede servir como un marcador de CHC. Sin embargo, la sensibilidad de GGT para detectar pequeñas CHC es solamente 43,8%.^{176,214}

1.3.1.12 El factor de crecimiento transformado β 1

El factor de crecimiento transformado β 1 es un factor de crecimiento autocrino negativo que regula la proliferación y diferenciación celular. Los niveles elevados circulantes de TGF 1 se han observado en pacientes con CHC.²¹⁵ En 1991, una proteína TGF se detectó en la orina de pacientes CHC y posteriormente TGF β 1 en 1997 por el mismo grupo. En estos estudios, TGF β 1 correlaciona con el pronóstico y la supervivencia. Los niveles de ARNm de TGF-b1 son mayores en tumores más grandes. Las células de CHC muestran resistencia a la inhibición del crecimiento de TGF-b1 porque en las células tumorales hay una sobreexpresión de ciclina D1 correlacionada con la desregulación del ciclo celular y la progresión tumoral.²¹⁶⁻²¹⁸ Un

vínculo funcional era atractiva como se conoce a los TGF para estimular las células no transformadas de forma reversible a crecer como colonias in vitro.^{219,220} Los estudios comparativos contra la AFP (200 ng/mL) han demostrado que TGFβ1 tiene mayor sensibilidad a 68% (límite de 800 pg/mL) y una especificidad de 95%.²²¹

1.3.1.13 El factor de crecimiento endotelial vascular

El desarrollo de tumores sólidos está estrictamente correlacionado con la angiogénesis. El VEGF juega un papel importante en la angiogénesis, estimulando la proliferación y migración de las células endoteliales y aumentando la permeabilidad vascular. El VEGF es un predictor de la agresividad tumoral, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia general en pacientes sometidos a resección de CHC.^{222,223} Los niveles de VEGF son más altos en pacientes con CHC que en pacientes con enfermedad hepática crónica y en CHC avanzado en comparación con CHC temprano.^{224,225} Según los estudios, se especula que los SNP en genes relacionados con la angiogénesis, incluido el VEGF, pueden afectar la progresión tumoral y la recurrencia de la enfermedad en pacientes después del trasplante.²²⁶ La expresión de VEGF es más alta en pacientes con CHC. Reveló que el VEGF es un tipo de biomarcador de metástasis en los ganglios linfáticos en el CHC.²²⁷ El alto nivel de VEGF se asocia con malos resultados en pacientes con CHC tratados con sorafenib, lo que indica que VEGF podría usarse como un indicador de eficacia clínica en pacientes con CHC.²²⁸ VEGF165 hemos conocido es capaz de inhibir la capacidad de proliferación, la migración y la adhesión de células de CHC mediante el aumento de la expresión de moléculas de señalización de p53.²²⁹ Además, otro artículo ha descrito que el nivel de VEGF sérico en pacientes con cáncer de hígado puede usarse como un indicador pronóstico para evaluar la eficacia de los tratamientos de ARF.²³⁰

1.3.1.14 MicroARNs

Los microARN (miARN) son endógenas, pequeño (17-25 nucleótidos), los ARN no codificantes que se unen a secuencias complementarias en las regiones 3' no traducidas del ARNm diana para inducir su degradación. Se conservan en todas estas especies, como miARNs se han encontrado para regular diversos procesos en los gusanos, moscas, y mamíferos, incluyendo seres humanos.²³¹ Actualmente, hay 1492 secuencias de miARN humanos registradas en la base de datos miRBase. Las transcripciones de MiARN pueden ser monocistrónicas o policistrónicas.²³² La presencia de miARNs será necesario continuar investigando para establecer especial circulación miARNs tan fiable y preciso en la detección de CHC en una etapa temprana. Los miARNs asociados con el desarrollo de CHC se han investigado como biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad. Algunos de estos miARNs se han demostrado para predecir con exactitud mal pronóstico en el CHC regulado genes.²³³

El aumento de los niveles de suero de miR-21 se han utilizado para distinguir los casos de CHC de la hepatitis crónica y controles sanos. En el caso de CHC vs hepatitis crónica, la sensibilidad y especificidad fueron 61,1% y 83,3%, respectivamente, con una AUC de 0,773, y en el caso de CHC vs controles sanos los valores fueron de 87,3% y 92,0%, respectivamente, con una AUC de 0,773. Ambos valores eran superiores a la de AFP como un biomarcador en CHC.^{234,235} Basado en miARN microarrays, miR-29 se downregulated en células de CHC, lo que sugiere su papel como marcador pronóstico para la terapia de CHC.²³⁶ Por otra parte, el miR-199a / b-3p también se ha disminuido en CHC en comparación con el hígado normal y el hígado de la hepatitis, lo que indica su papel como un objetivo pronóstico de CHC.²³⁷ Un panel de siete miARNs (miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a,

miR-27a y miR-801) ha demostrado tener alta precisión diagnóstica en el diagnóstico precoz del carcinoma hepatocelular relacionado con el VHB (BCLC estadio 0 y A; AUC, 0.888).²³⁸ Ejemplos de polimorfismos de miRNA asociados con el riesgo de CHC son miR-122 y miR-378, cuyo polimorfismo particular en el sitio 3'UTR de Interleucina alfa (IL- α) conduce a la regulación positiva de la expresión de IL-1 α con la promoción del desarrollo de CHC.²³⁹ Un análisis de las firmas de miARN de un gran número de muestras de tumores reveló que sólo el miR-21 está regulada positivamente en los tumores.²⁴⁰

1.3.1.15 AFP mARN

AFP mARN se considera el marcador valioso para células de CHC circulante y sólo está presente en células de CHC activos. Si se excluyen otras interferencias tales como tumores genitales y la sangre periférica, AFP mARN podría ser utilizado como un marcador significativo para la difusión de CHC en sangre.²²⁹

1.3.1.16 carbonil reductasa 2 humana

El gen de la carbonil reductasa 2 humana (HCR2) codifica una enzima citosólica que se expresa en el hígado y el riñón humanos y está implicada en la desintoxicación de los compuestos derivados del estrés oxidativo. Diferentes estudios mostraron que una disminución de la expresión de HCR2 humana en los tejidos del CHC contribuye al crecimiento del cáncer porque aumenta el daño celular inducido por especies de oxígeno reactivas y otros carcinógenos.²⁴¹

1.3.1.17 El factor de crecimiento de hepatocitos

HGF es una citoquina que tiene una amplia gama de efectos, desde el desarrollo embrionario y la regeneración hepática hasta la protección y / o reparación de varios órganos, incluidos el riñón, el pulmón y el sistema cardiovascular.^{242,243} El HGF se puede detectar en el suero de pacientes con enfermedad crónica hepática. El aumento de los niveles séricos de HGF en pacientes cirróticos es un indicador del desarrollo de CHC,^{244,245} los altos niveles de HGF están relacionados con el desarrollo de complicaciones postoperatorias, como la insuficiencia hepática,²⁴⁶ y también es capaz de predecir la recurrencia temprana del tumor y la metástasis después de la cirugía.²⁴⁷

1.3.1.18 Tumor asociado glucoproteína 72

Tumor asociado glucoproteína 72 (TAG-72) es una glicoproteína macromolecular compleja similar a la mucina 1. Se sobre expresa en la mayoría de los adenocarcinomas humanos incluyendo gástrico, colon y cáncer de páncreas. Sin embargo, rara vez se expresa en los tejidos normales, su aumento de la expresión puede promover la invasión tumoral y la metástasis. Por otra parte, la sobre expresión de TAG-72 está estrechamente correlacionada con una baja supervivencia en pacientes con CHC.^{156,248}

1.3.1.19 Proteína de choque térmico

Proteína de choque térmico (HSP) es una proteína de respuesta al estrés muy conservadas, se puede proteger las células y promover para reparar los daños causados por una variedad de estímulos.²⁴⁹ HSP se expresa bajo condiciones fisiológicas y de estrés, incluyendo carcinogénesis. En el microambiente de

hepatocarcinoma, la sobreexpresión de HSP70 y HSP27 fue capaz de promover el crecimiento del tumor y la metástasis.²⁵⁰ En particular, HSP70 se ha identificado como un marcador potencialmente sensible para diferenciar CHC precoz de las lesiones precancerosas.²⁵¹ Su expresión se observó en 282 de 392 casos de CHC (71,9%), mientras que, sólo el 14 por 115 de los tejidos del hígado no neoplásicas expresan la HSP70.²⁵² Además, la expresión de HSP70 se correlaciona con la diferenciación y la apoptosis de las células tumorales. Establece el crecimiento de células tumorales mediante la estabilización de la ciclina D1 y suprime la apoptosis de las células tumorales mediante la inhibición de la vía de p53.^{253,254}

1.3.1.20 El factor de crecimiento nervioso

El factor de crecimiento nervioso está involucrado en el crecimiento del cáncer, la invasión y la metástasis, además de su papel en la diferenciación y la supervivencia de las células neuronales.²⁵⁵ De hecho, las células estrelladas hepáticas expresan neurotrofinas y sus receptores aumentan durante la regeneración hepática.^{256,257} Sugerencia de estudio Y podría usarse como una herramienta para la progresión del CHC.^{258,259}

1.3.2 SCCA

1.3.2.1 Serpinas

Las serpinas pertenecen a una familia de inhibidores de la serina proteasa, que consiste en un gran grupo de glicoproteínas homólogas, descrito por primera vez en año 1980.²⁶⁰ En base al análisis filogenético, las serpinas se pueden clasificar en 16 grupos o "clados". Las serpinas humanas se dividen en nueve clados (A-I) en los que

se incluyen las serpinas del clado B, también denominadas serpinas de ovoalbúmina (ov-serpinas).²⁶¹

El clado de la familia ov-serpina se propuso originalmente sobre la base de la similitud de secuencia de aminoácidos (39-50%), características estructurales comunes (falta de las regiones de extensión N- y C-terminal, común a otras serpinas y existencia de residuo de serina), falta de secuencia de señal, encontrada en otras serpinas y organización de genes similar. Las proteínas de la superfamilia Serpin comparten una estructura terciaria común que consta de nueve hélices α (A-I), tres láminas β (A-C) y un bucle de sitio reactivo (RSL).^{261,262} La familia de las ov-serpinas / clado B serpinas consta de 13 miembros, incluida la ovoalbúmina de pollo, el activador del plasminógeno-2 (PAI-2, SERPINB2), el antígeno del carcinoma de células escamosas (SCCA1, SERPINB3 y SCCA2, SERPINB4) y el inhibidor de la elastasa (MNEI, SERPINB1).²⁶³ Entre los genes de los 13 miembros de la familia del clado B, tres se localizan en el cromosoma 6p25 (SERPINB1, B6 y B9) y los genes restantes se localizan en el cromosoma 18q21.3 (SERPINB2, B3, B4, B5, B7, B8, B10, B11, B12 y B13).²⁶² En los humanos, diez de los 13 genes del clado B se encuentran en el cromosoma 18, SERPINB1, SERPINB6 y SERPINB9 están codificados por genes ubicados en un grupo separado en el cromosoma 6.²⁶² SERPINB1, que inhibe la neutrofila elastasa y la catepsina G, SERPINB6 responsable de inhibir la catepsina G y SERPINB9, un regulador de la granzima B, residen en las células del sistema inmune tanto innato como adaptativo.²⁶⁴ SERPINB2 (inhibidor del activador del plasminógeno 2, PAI-2) es una serpina que se encuentra en monocitos, macrófagos y en leucocitos en responsable a mediadores inflamatorios.²⁶⁵ SERPINB10 se ha encontrado en la médula ósea en las células sanguíneas en desarrollo del linaje de monocitos y su expresión se reduce después de la maduración inducida por mitógeno

de líneas celulares de monocitos, lo que sugiere una participación en el desarrollo de monocitos.²⁶⁶

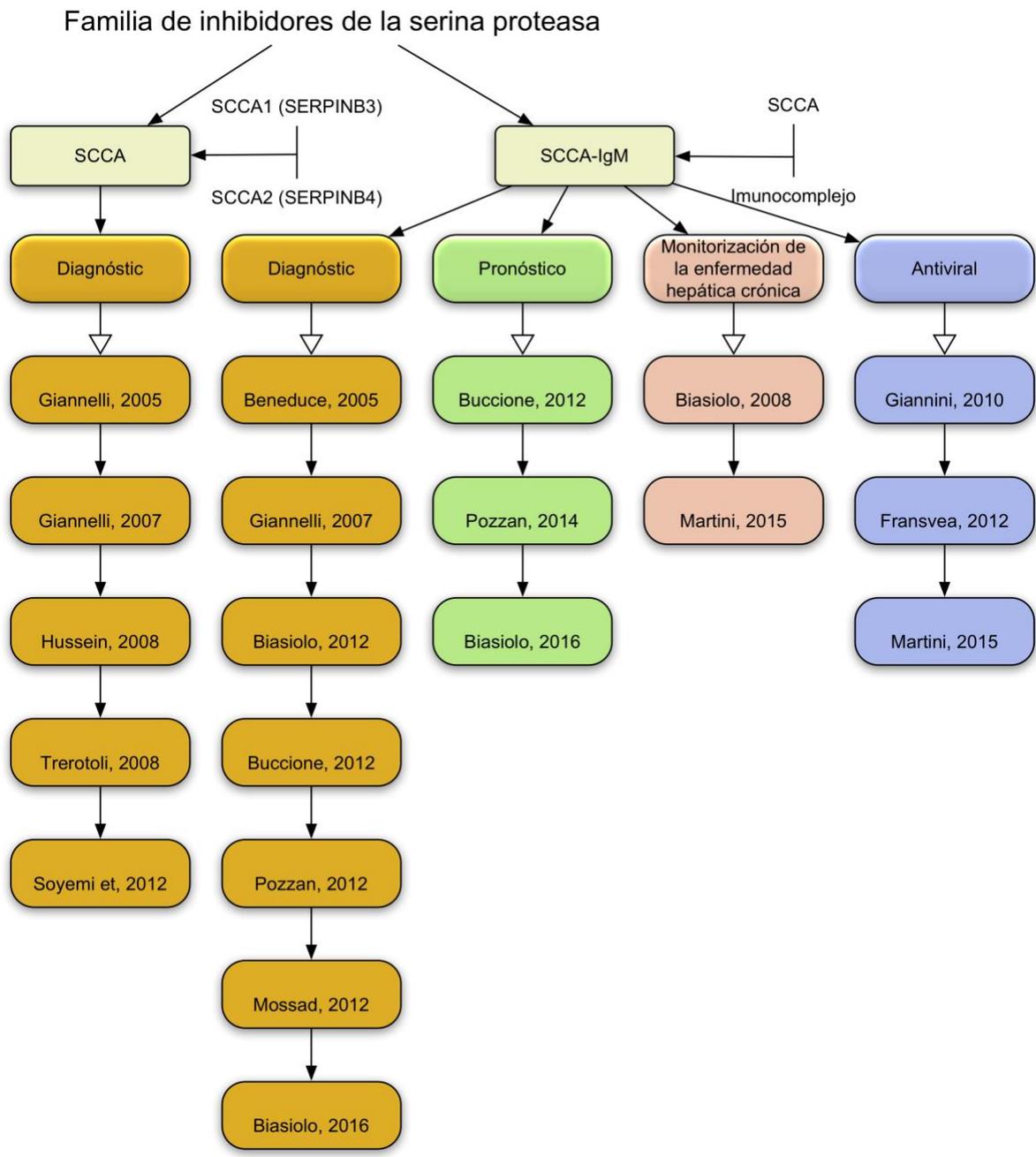


Figura 7. Los estudios del SCCA y SCCA-IgM.

1.3.2.2 SCCA1 and SCCA2

SCCA tiene dos isoformas diferentes, codificadas por genes altamente homólogos 2 SCCA 1(SERPINB3) y SCCA2(SERPINB4), han sido identificados como las formas neutros y ácidos, respectivamente. SCCA 1 y 2 son indetectables en los hepatocitos normales, pero su expresión aumenta progresivamente de la enfermedad hepática crónica a los nódulos displásicos y CHC.²⁶⁷

SERPINB3 y SERPINB4 se purificaron originalmente del carcinoma de células escamosas del cuello uterino, como el componente principal del antígeno TA-4.²⁶⁸ La forma neutral fue codificada por el gen original del antígeno del carcinoma de células escamosas (SCCA) (SCCA1, SERPINB3) y la forma ácida fue codificada por un nuevo gen (SCCA2, SERPINB4).²⁶⁹ Se ha demostrado que SERPINB3 y SERPINB4 tienen propiedades y sustratos distintos; SERPINB3 inhibe las cisteína proteasas tipo papaína tales como papaína, catepsina-S, -K y -L, mientras que SERPINB4 inhibe la catepsina G, la quimasa de los mastocitos humanos y Der p 1 y Der f 1.²⁷⁰ SERPINB3 y SERPINB4 han evolucionado por duplicación de genes y están dispuestos en tándem. Ambos genes tienen aproximadamente 10 kb y contienen 8 exones flanqueados por 7 intrones.²⁶⁹ SERPINB3 y SERPINB4 están co-expresados en tejidos normales: epitelio de la lengua, esófago, amígdala, cuello uterino y algunas áreas de la piel,²⁷¹ también psoriasis²⁷² y esclerodermia sistémica²⁷³. Dos estudios independientes mostraron que estos dos genes se coexpresan con frecuencia en los mismos tejidos, incluidos la vejiga, el útero, el esófago, los pulmones, la próstata, los testículos, el timo y la tráquea, excepto que SERPINB4 no era detectable en la vejiga y el timo.^{274,275} El SCCA también se detectó en saliva, secreciones respiratorias y muestras de líquido amniótico de individuos sanos.²⁷¹ El aumento de la expresión de

SERPINB3 / B4 también puede facilitar un mecanismo de avance para modular la respuesta inmune.²⁷⁶

Los datos disponibles sugieren que SerpinB3 puede conducir a CHC a través de diferentes estrategias: a) SerpinB3 tiene efecto anti-apoptótico, dirigiéndose a la cascada aguas arriba de la caspasa 3;²⁷⁷ b) SerpinB3 induce la transición epitelio-mesenquimal y la disminución de las uniones desmosomales, además, se ha informado de la reducción de la acumulación de E-cadherina y beta-catenina en diferentes líneas celulares, asociada con una mayor proliferación celular²⁷⁸ SerpinB3 promueve el crecimiento tumoral mediante la inhibición de la infiltración intratumoral de células asesinas naturales.²⁷⁹ Hasta la fecha, los mecanismos precisos que determinan los fenómenos descritos aún se desconocen.²⁸⁰

SCCA1 se expresa en más nódulos displásicos de alto grado y en el CHC que en las grandes nódulos de regeneración, lo que sugiere un papel en la hepatocarcinogénesis.²⁸¹ En CHC, la alta expresión de SCCA1 se asocia significativamente con la recurrencia precoz, y muestra un mejor significado pronóstico que otras variables clínicas e histológicas.²⁸² Estos hallazgos clínicos importantes fueron confirmados a nivel molecular: Expresión SCCA en tumor en el hígado se ha correlacionado con la actividad de regeneración hepática.²⁷⁸ Aumento de la proliferación también se documentó en líneas celulares de hepatoma exceso de expresar SERPINB3 y en un modelo de ratón transgénico para este serpina.^{278,283} Los datos recientes indican que SERPINB3 es altamente expresado en el compartimiento de células madre / progenitoras hepáticas de hígados fetales y adultos,²⁸⁴ SERPINB3 ha demostrado ser crucial para la invasión tumoral y la metástasis, ya que promueve epitelio-mesenquimal transición.²⁷⁸ y la transformación la producción de factor de crecimiento beta.²⁸²

Pero SERPINB3 y SERPINB4 tienen características bioquímicas distintivas y especificidad de proteasa de sustrato in vitro, su regulación y función en entornos biológicos no se han distinguido bien, en parte debido al hecho de que estas dos proteínas a menudo se expresan conjuntamente. tanto en tejidos normales como patológicos y comparten una alta homología tanto en el ARNm como en los niveles de la secuencia proteica.²⁸⁵ Además, La importancia biológica de SERPINB3 y B4 en el desarrollo y la función del tejido normal sigue siendo poco clara, en parte debido al²⁸⁶hecho de que sus verdaderos homólogos funcionales en otros organismos, incluido el ratón, no se han definido de manera inequívoca.²⁸⁷

Aunque no se detectaron SERPINB3 / B4 en suero en pacientes con CHC, SERPINB3 / B4 se sobreexpresan en tejidos tumorales hepáticos, también detectables en suero de pacientes con CHC acoplado a IgM para formar complejo inmunitario circulante y se correlaciona con la gravedad del cáncer.^{286,288}

1.3.2.3 Estudio SCCA

Giannelli et.al informaron que la expresión de SCCA se amplificó en el tejido tumoral y en los nódulos metastásicos en comparación con el tejido peritumoral de CHC.²⁸⁹ Beale et al. realizó un estudio transversal que incluyó a 50 pacientes que desarrollaron CHC después de seguir enfermedades de hígado graso alcohólicas y no alcohólicas y 41 sujetos de control con cirrosis demostrada por biopsia. Se encontró que el SCCA-1 sérico aumentó considerablemente en pacientes con hígados y CHC enfermos crónicamente, pero no difirió significativamente entre pacientes cirróticos con y sin cáncer (AUC: p N 0.05, sensibilidad 0.18 y especificidad 0.73).²⁹⁰ Recientemente, Soyemi y sus colegas midieron el SCCA sérico total en un estudio transversal en el que participaron 60 pacientes con CHC y 30 controles

aparentemente sanos, e informaron que los valores séricos de SCCA no pudieron discriminar significativamente a los pacientes con CHC de los controles (AUC: 0,525; sensibilidad 0,75 y especificidad 0,27%).²⁹¹ Giannelli et.al. estudiaron 120 pacientes con CHC y 90 con cirrosis hepática,. eEl análisis del rendimiento diagnóstico del SCCA total reveló un AUC de, con valores de sensibilidad y especificidad de 0,84 y 0,49, respectivamente. Curiosamente, la combinación de AFP y SCCA produjo una detección serológica correcta de CHC en hasta el 91% de los pacientes.²⁹² Hussein et al. midió el SCCA sérico total en 49 pacientes con CHC, 30 afectados por enfermedad hepática crónica sin CHC y 15 sujetos sanos, pero no logró encontrar una correlación significativa entre los valores séricos de SCCA y AFP. Además, el rendimiento diagnóstico de SCCA (AUC: 0,705; sensibilidad 0,78 y especificidad 0,84) fue comparable al de AFP (AUC: 0,717; sensibilidad 0,90 y especificidad 0,93).^{203}}

1.3.2.4 Estudio SCCA-IgM

En los últimos años se ha atribuido un énfasis relevante a la inmunidad innata o natural, que actúa como la primera línea de defensa, y también como el vínculo entre la inmunidad adquirida y la memoria inmunológica.²⁹³ La presencia de inmunocomplejos ligados a IgM con valor diagnóstico se ha encontrado recientemente en diferentes tumores humanos, incluidos cáncer de colon y de próstata, y también en otras afecciones patológicas.²⁹⁴⁻²⁹⁶

No se detectó ECCA libre en niveles significativos en pacientes infectados por HCV con CHC, pero esta molécula se encontró acoplada a IgMs (SCCA-IgM) para formar inmunomodelos circulantes en la mayoría de los pacientes con CHC, mientras que en la población control sana sus niveles estaban por debajo El límite de detección.²⁸⁶ La aparición de este biomarcador-IgM inmune complejo parece ser apoyado por el

modelo de inmunoección reciente que considera natural IgMs como uno de los jugadores más importantes del sistema inmune innato.²⁹⁷

1.3.2.4.1 SCCA-IgM en diagnóstico de CHC

Pontisso et al²⁹⁸ se demostró el aumento significativo en el tiempo de SCCA-IgM solo en pacientes con cirrosis temprana (histológicamente probada) que desarrollaron CHC dentro de los cuatro años de seguimiento. SCCA-IgM se analizó en un estudio longitudinal y retrospectivo que fue realizado preliminarmente en una cohorte de pacientes infectados por VHC con estadios tempranos de cirrosis, definidos a partir de hallazgos histológicos. En consecuencia, se encontró que el valor predictivo de la variación de SCCA-IgM fue significativamente mejor que el de AFP para predecir la progresión a CHC (AUC: 0,821 frente a 0,654) Además, Beneduce et al²⁹⁹ también encontró respecto al valor diagnóstico de SCCA-IgM para CHC, un estudio transversal realizado por Beneduce et al ha demostrado la positividad de este biomarcador en la gran mayoría de las muestras de suero de CHC (sensibilidad del 70% frente a la sensibilidad del 42% de la AFP); mientras que todas las muestras de control sanas fueron negativas. En otro estudio, Giannelli et al. también evaluó el rendimiento diagnóstico de SCCA libre y SCCA-IgM en las muestras de suero de 499 CHC y 462 pacientes cirróticos. Giannelli³⁰⁰ se encontró que el rendimiento diagnóstico de SCCA-IgM sérica (AUC: 0,675; sensibilidad 0,52 y especificidad 0,76) fue marginalmente más alto que el de SCCA libre (AUC: 0,656; sensibilidad 0,42 y especificidad 0,83), pero ligeramente menor que el de AFP sérico. (AUC: 0.724; sensibilidad 0.41 y especificidad 0.94). Es importante destacar que la combinación de SCCA-IgM y AFP en pacientes con concentración de este último biomarcador entre

20 y 200 ng / ml fue efectiva para mejorar el diagnóstico de CHC en el 54% de los pacientes.³⁰⁰

Mossad et al. llevó a cabo otro estudio transversal con 40 pacientes con CHC, 30 pacientes con cirrosis hepática y 20 controles sanos, para investigar la precisión diagnóstica de SCCA-IgM y AFU en comparación con AFP en el diagnóstico precoz de CHC. Se encontró una correlación débil pero significativa entre SCCA-IgM y AFP ($p = 0.007$; $r = 0.284$). Se encontró que el rendimiento diagnóstico de SCCA-IgM (sensibilidad 0,88 y especificidad 0,66) era mayor que el de AFP (sensibilidad 0,70 y especificidad 0,53). Aún más importante, la medición combinada tanto de AFP como de SCCA-IgM fue efectiva para aumentar la sensibilidad diagnóstica (es decir, 0,93), mientras que la especificidad permaneció sustancialmente invariable (es decir, 0,62).²⁰²

Sin embargo, los resultados son controvertidos debido a los diferentes valores de corte utilizados en cada estudio. Las sensibilidades variaron del 42% al 89% y las especificidades del 27% al 89%, con un amplio rango para los valores del área bajo la curva (AUC), de 0,66 a 0,86.^{202,203,286,291,292,300-305} Además, todos los estudios se hacen en Italia y con mayor pacientes incluidos son de etiología de hepatitis C, podría introducir el sesgo a las conclusiones.

1.3.2.4.2 SCCA-IgM en pronóstico de CHC

Buccione et al.³⁰⁶ mostró los pacientes positivos para el VHC con cirrosis manifiesta, la negatividad SCCA-IgM (corte ≤ 200 AU / mL) identificó con precisión a los pacientes con bajo riesgo de desarrollar cáncer de hígado en el año subsiguiente. El objetivo de este estudio fue evaluar si los niveles de SCCA-IgM en el suero podían identificar pacientes con VHC con signos clínicos de cirrosis con riesgo de desarrollar

CHC. El estudio involucró a 57 pacientes cirróticos, durante un período medio de 48 meses. El valor basal de SCCA-IgM serológico fue casi 4 veces mayor en pacientes que desarrollaron CHC que en aquellos que no lo hicieron, y el valor de SCCA-IgM \leq 200 AU / mL identificó con precisión a pacientes con bajo riesgo de cáncer de hígado en el año subsiguiente , con un valor predictivo negativo del 97%. Luego, Pozzan et al³⁰⁴ recientemente se ha demostrado SCCA-IgM mostró una mayor sensibilidad para el diagnóstico de CHC, en comparación con AFP. Analizó retrospectivamente el suero de 327 pacientes, incluidos pacientes con cirrosis y CHC, de hecho, la negatividad de este biomarcador fue capaz de identificar a los pacientes con CHC con una supervivencia global más larga y libre de progresión. Se encontró que un valor de SCCA-IgM menor que el punto de corte era un predictor independiente de supervivencia (razón de riesgo: 2.12, IC 95%: 1.08-3.85, p = 0.017). La mediana de supervivencia fue de 48 meses para los pacientes con SCCA-IgM baja (<130 AU / mL) y 26 meses para aquellos con SCCA-IgM alta (> 130 AU / mL). AFP no pudo predecir la respuesta completa.

1.3.2.4.3 SCCA-IgM en la monitorización de la enfermedad hepática crónica

Biasiolo et al³⁰⁷ demostró un aumento significativo de los niveles de SCCA-IgM a lo largo del tiempo en el 75% de los pacientes no tratados con hepatitis crónica e histológicamente. Martini et al³⁰⁸ mostró que SCCA-IgM era un predictor independiente de prueba no alcohólica histológicamente probada esteatohepatitis en pacientes con hepatitis C crónica.

1.3.2.4.4 SCCA-IgM y tratamiento antiviral

Giannini et al³⁰⁹ se encontró en los paciente con el tratamiento de hepatitis C crónica con tratamiento estándar, solo los pacientes que lograron una respuesta viral sostenida mostraron una disminución significativa en los valores medianos de SCCA-IgM hasta un año de seguimiento. Demostraron que en pacientes con cirrosis relacionada con el VHC que alcanzaron una respuesta virológica sostenida (RVS) después del tratamiento estándar con PEG-IFN y ribavirina, hubo una disminución significativa de los niveles séricos de SCCA-IgM al final del tratamiento y hasta un año de seguimiento, en comparación con la línea de base. Además, Fransvea et al³¹⁰ un estudio prospectivo multicéntrico, 103 pacientes con infección crónica por el VHC sometidos a tratamiento antiviral con PEG-IFN y ribavirina se inscribieron para evaluar la eficacia de SCCA-IgM como marcador de respuesta. Este estudio confirmó que la reducción de los complejos inmunes de SCCA fue significativamente diferente entre los pacientes que mostraron RVS y aquellos que no lo hicieron. Además, la disminución de la concentración serológica del biomarcador fue un predictor independiente de la RVS en relación con el genotipo y la edad del VHC. Más importante, Martini et al³⁰⁸ e observó una reducción significativa de SCCA-IgM, que duró hasta 6 meses de seguimiento, solo en pacientes con VHC positivos respuesta a la terapia estándar. El comportamiento de SCCA-IgM en relación con el tratamiento antiviral se confirmó recientemente en 91 pacientes con hepatitis C crónica. En el subgrupo de pacientes que alcanzaron la RVS y tuvieron la positividad basal para SCCA-IgM, los valores serológicos disminuyeron significativamente después de seis meses de tratamiento y permaneció persistentemente bajo incluso a los seis meses de seguimiento después del tratamiento. En los pacientes con NR, no se observó

ninguna variación significativa en los valores séricos de SCCA-IgM después de seis meses de tratamiento o seis meses después del final de la terapia.

1.3.2.5 Estudio meta-análisis

Un metaanálisis intentó explorar el rendimiento diagnóstico de AFP, DCP, AFP-L3, GPC3 y GP73 para determinar su utilidad para el diagnóstico precoz de CHC. Sin embargo, SCCA y SCCA-IgM no se incluyeron.³¹¹ El metanálisis anterior incluyó tanto artículos en inglés como en chino y comparó las precisiones diagnósticas combinadas entre SCCA y SCCA-IgM; estos datos deben actualizarse.³¹² Varias limitaciones³¹³ del metaanálisis más reciente incluyen lo siguiente: a) la recopilación de datos finalizó en septiembre de 2015; b) no se exploró la heterogeneidad entre los estudios; c) se omitió un estudio publicado en 2012 por Biasiolo et al.³⁰²; d) se incluyó un estudio publicado por Crescenzi et al, pero la sensibilidad registrada del 51% y la especificidad del 49% pudieron haber sido extraídas inapropiadamente de la combinación de AFP-IgM y SCCA-IgM; además, si un biomarcador es insuficiente para diagnosticar con precisión el CHC, las combinaciones de biomarcadores actualmente disponibles deberían evaluarse por metanálisis; e) a nuestro leal saber y entender, la investigación de las razones de la heterogeneidad entre los estudios que van tanto importante que el cálculo de una única medida de resumen es un propósito importante del metanálisis^{314,315}. Los estudios previos no pudieron evaluar la heterogeneidad debido al número limitado de publicaciones en el momento.

2. HIPÓTESIS

La combinación de biomarcadores circulantes usada como herramienta para el diagnóstico de CHC podría ayudar a mejorar el sistema de cribado, e incluso la capacidad predictiva de los métodos séricos actuales basados en marcadores independientes. Mediante el uso de puntos de corte ajustados y nuevas combinaciones se podría estratificar a los pacientes en función del riesgo individual, personalizando el programa de vigilancia, y consiguiendo, a su vez, una optimización de los recursos sanitarios.

3. OBJETIVOS

3.1.1 Meta-análisis

1. Determinar la precisión diagnóstica de SCCA, SCCA-IgM y las combinaciones de los dos con AFP en el diagnóstico de CHC en estadio temprano.
2. Explorar los factores que producen la heterogeneidad en los resultados.

3.1.2 SCCA-IgM en la predicción de CHC

1. Evaluar el valor predictivo del SCCA-IgM para la predicción de CHC a largo plazo en pacientes con cirrosis hepática.
2. Analizar si la combinación de SCCA-IgM y AFP puede mejorar los métodos séricos habituales de práctica clínica en la predicción de CHC a largo plazo y personalizar los programa del vigilancia.

4. METODOLOGÍA

4.1 Meta-análisis de SCCA y SCCA-IgM

4.1.1 Estudio de identificación y selección

Dos investigadores (Chang-Hai Liu y Javier Ampuero) realizaron búsquedas de forma independiente en MEDLINE (utilizando PUBMED como motor de búsqueda), EMBASE y las bases de datos Cochrane. Se utilizaron bases de datos para identificar estudios adecuados que se publicaron hasta el 2 de octubre de 2017. Se utilizaron términos y palabras clave MeSH, y los términos de búsqueda incluyeron los siguientes: antígeno del carcinoma de células escamosas, SCCA, SERPIN, SCCA-IgM, SCCAIC, CHC, hígado, cáncer, tumor hepático, neoplasia hepática, hepatocelular, hepatoma y carcinoma hepático, y una combinación de esos términos MeSH. Las búsquedas se limitaron a publicaciones en inglés con sujetos humanos. Se realizó una búsqueda manual utilizando las referencias enumeradas en los artículos originales y artículos de revisión recuperados. Los resultados fueron recolectados por separado por los dos investigadores. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: (a) los estudios demostraron el rendimiento diagnóstico de SCCA o SCCA-IgM; (b) utilizaron ultrasonografía y/o tomografía computarizada y/o resonancia magnética y/o biopsias hepáticas como patrones de referencia; y (c) los datos podrían recuperarse como tablas de dos por dos como verdaderos positivos, falsos positivos, falsos negativos y verdaderos negativos. Se excluyeron los estudios con menos de diez pacientes para evitar el sesgo de selección. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: 1) informes duplicados; 2) estudios realizados en animales; 3) resúmenes de conferencias, actas de reuniones y cartas al editor; y 4) revisiones sistemáticas o meta-análisis. Este estudio se realizó de acuerdo con la declaración PRISMA.³¹⁶

4.1.2 Extracción de datos y evaluación de calidad

Dos investigadores (Chang-Hai Liu y Javier Ampuero) extrajeron de forma independiente la siguiente información: país, criterios de selección de población, año, nombre del estudio, calidad metodológica (selección de pacientes, prueba de índice, estándar de referencia, flujo y tiempo, selección de pacientes para la preocupación aplicable, texto de índice para preocupación aplicable y estándar de referencia para la preocupación aplicable), etiología, clase Child-Pugh, tamaño de muestra, biopsia, edad, género, datos para tablas de dos por dos, valores de corte, sensibilidad, especificidad y AUC. Cuando se publicó la misma población en varias revistas, conservamos solo el artículo más informativo o el estudio más completo, para evitar la duplicación. También pedimos a los investigadores información adicional, y si no recibimos respuesta, los ítems "no informados" se trataron como "inciertos" o "no disponibles". Si los dos investigadores no estaban de acuerdo, se consultó a un tercer autor (Manuel Romero-Gómez). Dos revisores (Chang-Hai Liu y Javier Ampuero) evaluaron de forma independiente la calidad de los estudios elegibles utilizando la herramienta de Evaluación de calidad para estudios de precisión diagnóstica (QUADAS-2).³¹⁷

4.1.3 Definición y cálculo de las variables experimentales

La precisión diagnóstica representa la ganancia total de sensibilidad y especificidad de una prueba; es igual a la proporción de casos verdaderos positivos más verdaderos negativos del número total de pacientes y los controles juntos. Como calcular en el caso de un número igual de pacientes y controles, la precisión diagnóstica es igual a la media de la sensibilidad y especificidad. El valor de precisión diagnóstica máximo está en el umbral óptimo.¹³¹ Para ilustrar el significado de estos

conceptos a través de sus estimaciones, supóngase que se tienen N sujetos de los que se conoce su estatus verdadero (enfermo o no) y se les ha practicado el test o prueba que se está evaluando y cuyo resultado puede ser inequívocamente positivo o negativo.³¹⁸⁻³²³ Estas características pueden entonces estimarse fácilmente a partir de una tabla de 2x2 como se muestra a continuación.

		Criterio de verdad		
		Enfermos	No enfermos	Total
	Positivos	a	b	a+b
Prueba diagnóstica	Negativos	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Tabla 6. Variables por 2x2 tabla.

a = Verdaderos positivos (VP) = número de pacientes con la enfermedad diagnosticados como "positivos" por la prueba.

b = Falsos positivos (FP) = número de pacientes sin la enfermedad diagnosticados como "positivos" por la prueba.

c = Falsos negativos (FN)= número de pacientes con la enfermedad diagnosticados como "negativos" por la prueba.

d = Verdaderos negativos (VN)= número de pacientes sin la enfermedad diagnosticados como "negativos" por la prueba.

La sensibilidad y la especificidad son las medidas tradicionales y básicas del valor diagnóstico de una prueba. Miden la discriminación diagnóstica de una prueba en relación a un criterio de referencia, que se considera la verdad.³¹⁸⁻³²³

	Definición	Cálculo
Sensibilidad (Se)	La sensibilidad (Se) indica la capacidad de la prueba para	Sensibilidad = Verdaderos positivos / Total de enfermos = $VP / (VP + FN) = a / (a+c)$

	detectar a un sujeto enfermo, es decir, expresa cuan "sensible" es la prueba a la presencia de la enfermedad	
Especificidad (Sp)	La especificidad (Sp) indica la capacidad que tiene la prueba de identificar como sanos (no enfermos) a los que efectivamente lo son	Especificidad = Verdaderos negativos/ Total de no enfermos = $VN / (VN + FP) = d / (b+d)$
Valor predictivo de una prueba positiva (PPV)	EL valor predictivo de una prueba positiva equivale a la probabilidad condicional de que los individuos con una prueba positiva tengan realmente la enfermedad	Valor predictivo positivo = Verdaderos positivos/ Total de positivo = $VP / (VP+FP) = a / (a+b)$
Valor predictivo de una prueba negativa (NPV)	EL valor predictivo de una prueba negativa es la probabilidad condicional de que los individuos con una prueba negativa no tengan realmente la enfermedad	Valor predictivo negativo = Verdaderos negativos / Total de negativos = $VN / (VN+FN) = d / (c+d)$
La razón de verosimilitud (LR)	La razón de verosimilitud (LR). Feinstein califica a la razón de verosimilitud ⁴ como un indicador "reciente y popular" del desempeño de un test diagnóstico.	$LR+= \text{Sensibilidad} / (1- \text{Especificidad})$

		$RV- = (1-\text{Especificidad}) / \text{Sensibilidad}$
--	--	--

Tabla 7. Definición y cálculo de la precisión diagnóstica de las variables experimentales.

La tasa positiva diferencial (DPR), también conocida como índice de Youden es la tasa positiva neta que es el resultado de restar la relación falsa negativa (1-especificidad) de la verdadera positiva (sensibilidad).³²⁴ El valor predictivo positivo (PLR) es la probabilidad de enfermedad en pacientes con una prueba positiva. El valor predictivo negativo (NLR) es la probabilidad de ausencia de enfermedad entre los pacientes con una prueba negativa. Tanto el PPV como el NLR aumentan gradualmente al 100% al aumentar el valor de corte.³²⁵ La razón de probabilidad positiva (LR +) representa la probabilidad de que una persona que tiene la prueba de la enfermedad sea positiva dividida por la probabilidad de que una persona que no tenga la enfermedad sea positiva. LR- representa la probabilidad de que una persona que tiene la prueba de la enfermedad sea negativa, dividida por la probabilidad de que una persona que no tiene la prueba de la enfermedad sea negativa. Los LR pueden variar de 0 a infinito al aumentar el valor de corte. Una razón de probabilidad mayor de 1 indica que el resultado de la prueba está asociado con la enfermedad. Cuanto mayor es el número, más convincentemente el hallazgo sugiere la enfermedad.³²⁶

4.1.4 Síntesis de datos

Según los criterios revisados de EASL¹⁵ y los criterios de AASLD³⁶, nuestros estándares de referencia clasificaron a los pacientes en dos grupos, pacientes con CHC y pacientes sin CHC. Si se informaron varios puntos de corte en un estudio,

utilizamos el punto de corte que mejor se adaptaba a nuestro objetivo principal de cribado del CHC en pacientes con cirrosis.

La regresión bivariada se realizó para estimar la sensibilidad y especificidad generales con 95% de CIs, y se construyeron curvas de resumen jerárquico de características operativa (HSROC) como una mejora y extensión del enfoque de la curva resumen de características operativas del receptor tradicional (sROC).³²⁷ Además, se calcularon las ratios de probabilidad positivos y negativos (PLR y NLR, respectivamente) y el odds ratio de diagnóstico (DOR) a través de las curvas HSROC.^{327,328} La heterogeneidad entre los estudios se midió mediante la prueba Q y el índice de inconsistencia de Higgins (I^2). Un valor de p de más de 0,05 y un valor de I^2 superior al 50% se tomó como indicativo de heterogeneidad significativa.³²⁹ Si hubo heterogeneidad, se realizó un análisis de sensibilidad para determinar si había influencia indebida ejercida por un único estudio sobre los resultados de los estudios combinados.³³⁰ Se utilizó un diagrama de caja bivariable para demostrar el grado de interdependencia de la sensibilidad y la especificidad, incluida la ubicación central y la identificación de cualquier valor atípico. El óvalo interno representa la distribución mediana, y el óvalo externo representa el límite del intervalo de confianza (IC) del 95%. Cualquier punto fuera del óvalo externo se consideró un valor atípico, proporcionando evidencia indirecta de la variabilidad del umbral.

Se realizó un nomograma de Fagan para evaluar la utilidad clínica de SCCA, SCCA-IgM y sus combinaciones con AFP para el diagnóstico de CHC. Evaluamos las probabilidades previas a la prueba de 25, 50 y 75% que mostraron una relación entre la probabilidad previa, la razón de verosimilitud y la probabilidad de la prueba posterior.³³¹ Las razones de probabilidad se usaron para simular tres escenarios

clínicos: 1) bajo sospecha clínica de CHC: 25%; 2) alta sospecha clínica de CHC: 75%; 3) peor escenario posible: 50%.

La posible heterogeneidad entre estudios se exploró mediante metarregresión univariable y análisis de subgrupos.^{314,315} Las covariables se dividieron en dos categorías (sí o no) cuando la metarregresión se realizó de la siguiente manera: selección de pacientes (alto riesgo [sí] vs. bajo riesgo), población (Italia [sí] vs. reposo), prueba índice (alto riesgo [sí] vs. riesgo bajo), estándar de referencia (alto riesgo [sí] vs. riesgo bajo), flujo y tiempo (alto riesgo [sí] vs. bajo riesgo vs. no reportado), diseño del estudio (prospectivo [sí] vs. retrospectivo), etiología (solo viral [sí] vs. mezclado), VHC (VHC > 50% [sí] vs. VHC ≤ 50%), Clase Child-Pugh (Child-Pugh A > 50% [sí] vs. Child-Pugh A ≤ 50%), tamaño de muestra (tamaño de muestra > 50 [sí] vs. tamaño de muestra ≤ 50), punto de corte (SCCA -IgM: 100 AU / mL <punto de corte <200 UA / mL [sí]; SCCA: punto de corte <1 ng / mL [sí] vs. punto de corte > 1 ng / ml), dominante masculino (sexo masculino > 65% [sí] vs. sexo masculino ≤ 65%), biopsia (biopsia [sí] vs. no biopsia). Evaluamos el posible sesgo de publicación mediante el uso de la prueba de asimetría del gráfico de embudo de Deeks, y $p < 0,10$ indicó significación estadística.³³² Utilizamos STATA versión 14 (Stata Corp; College Station, TX) con los programas "Midas" y "Metandi". las pruebas estadísticas fueron bilaterales, con valores de $p \leq 0,05$ indicativos de significación estadística.

4.2 SCCA-IgM en la predicción del hepatocarcinoma

4.2.1 Seguimiento clínico de pacientes.

La puesta en marcha de programas de vigilancia para la detección en poblaciones candidatas de alto riesgo y también para encontrar biomarcadores destinados a la detección temprana del CHC constituye un importante objetivo de

salud pública para reducir las muertes asociadas al CHC. Es por ello que los organismos de política sanitaria y de investigación de la Administración deberán abordar estas necesidades. De esta manera, los pacientes con un riesgo alto de desarrollar un CHC deberían ser incluidos en programas de vigilancia. Los grupos de riesgo alto se describen en la tabla 6.

1	Pacientes cirróticos, Child-Pugh estadio A y B
2	Pacientes cirróticos, Child-Pugh estadio C en espera de trasplante hepático
3	Portadores de VHB no cirróticos con hepatitis activa o antecedentes familiares de CHC
4	Pacientes no cirróticos con hepatitis crónica C y fibrosis hepática avanzada F3

Tabla 8. Recomendaciones para la vigilancia del CHC: categorías de pacientes adultos en los que se recomienda la vigilancia.

La vigilancia debe ser llevada a cabo por personal experimentado, en todas las poblaciones de riesgo, con el empleo de ecografía abdominal cada 6 meses.

Excepciones: Se recomienda un intervalo más corto entre los exámenes de seguimiento (cada 3-4 meses) en los siguientes casos: 1. Cuando se ha detectado un nódulo de menos de 1 cm (véase la política de recordatorio), 2. En la estrategia de seguimiento tras la resección o los tratamientos locorregionales.

Las pruebas que pueden utilizarse en la vigilancia del CHC incluyen análisis serológicos y exploraciones de imagen. La técnica de imagen más ampliamente utilizada en la vigilancia es la ECO. La ECO tiene una exactitud diagnóstica aceptable cuando se emplea como método de vigilancia (sensibilidad de entre el 58% y el 89%; especificidad superior al 90%).^{333,334} La AFP es el biomarcador más ampliamente utilizado del CHC. Se sabe que la elevación persistente de los niveles de AFP constituye un factor de riesgo para la aparición del CHC y puede utilizarse para ayudar a definir las poblaciones en riesgo.³³⁵ Sin embargo, cuando se combina con la ECO,

los niveles de AFP tan solo proporcionan una detección adicional de un 6%–8% de los casos no identificados previamente mediante ECO.³³⁶ Un intervalo de 6 meses constituye una opción razonable. No obstante, teniendo en cuenta que la variabilidad interpacientes es enorme, las guías japonesas han propuesto un intervalo más corto, de 3 meses.³⁸

Desde enero de 2007 hasta marzo de 2016, 62 pacientes cirróticos (30,5%; 62/203) se inscribieron en las consultas ambulatorias de la *Azienda Ospedaliera di Padova* (Padua, Italia) como cohorte de estimación y 155 pacientes cirróticos (69,5%; 141/203) se incluyeron en el Hospital Universitario Virgen del Rocío y Hospital Universitario de Valme (Sevilla, España) como cohorte de validación. El estudio se realizó retrospectivamente en sueros recogidos prospectivamente. Los pacientes fueron reclutados independientemente de la etiología y seguidos cada seis meses para detectar el CHC por ultrasonido de acuerdo con las pautas de la EASL.¹⁵ El estudio se realizó siguiendo las normas éticas expresadas en la Declaración de Helsinki y la Conferencia Internacional sobre Directrices de Armonización para Buenas Prácticas Clínicas. Se tomaron muestras humanas después de obtener un consentimiento informado firmado según lo aprobado por el Comité Ético de ambos hospitales.

La cirrosis fue diagnosticada por al menos uno de los siguientes: clínicos (presencia de hipertensión portal, varices esofágicas, disfunción hepática o ascitis previa o hemorragia variceal), patológicos (biopsia hepática) o radiológicos (gruesa / nodular / redistribución lobular en el ultrasonido) marcadores de cirrosis. Los parámetros demográficos, clínicos y de laboratorio se registraron en la primera visita, incluida la edad, el sexo, la etiología de la cirrosis, las enzimas hepáticas (AST, ALT), la bilirrubina, la albúmina, la creatinina y los niveles de plaquetas. Los pacientes con

hepatitis viral crónica y antecedentes de consumo de alcohol se clasificaron como hepatitis viral. De manera similar, los pacientes con esteatohepatitis se incluyeron como cirrosis alcohólica si se determinaba que el alcohol era la causa de la enfermedad hepática en el registro clínico. La esteatohepatitis no alcohólica, así como las enfermedades hepáticas autoinmunes como la hepatitis autoinmune, la cirrosis biliar primaria o la colangitis esclerosante primaria, se clasificaron como "Otros". El tiempo de seguimiento fue censurado en la última visita a la clínica, el trasplante de hígado o el diagnóstico de CHC dentro del término de 60 meses. Nueve pacientes fueron excluidos debido a la historia de cáncer de otros orígenes. Los CHC se diagnosticaron sin biopsia para confirmar el CHC en la mayoría de los casos debido a los enfoques actuales de diagnóstico clínico, incluida la ecografía, la tomografía computarizada (TC), la resonancia magnética (RM) fueron suficientes para diagnosticar CHC.¹⁵

4.2.2 Criterios diagnósticos de hepatocarcinoma

El diagnóstico de CHC se realizó ante la sospecha de lesión ocupante de espacio en los exámenes ecográficos semestrales durante el seguimiento. Una vez que se sospechó ecográficamente CHC, se confirmó mediante: 1) histopatología; 2) dos técnicas de imagen (ecografía abdominal, angiograma o tomografía computarizada); o 3) una técnica de imagen más un nivel de α -fetoproteína en suero ≥ 200 ng / ml.³³⁷

4.2.3 Procesamiento de muestras

Se realizó extracción de una muestra de sangre de 10 ml de cada participante usando agujas desechables y jeringas de vacío. Posteriormente la

muestra fue recepcionada en la Unidad de investigación de Enfermedades Hepáticas y digestivas, procesadas y almacenadas en condiciones óptimas (refrigeradas a -80°C). Se almacenaron alícuotas de plasma y suero en crioviales a -80°C después de la centrifugación durante 10 minutos a 1500 x g. La AFP sérica y la SCCA-IgM se midieron para cada paciente por un técnico experimentado que era ciego a la información clínica.

4.2.4 Evaluación SCCA

La SCCA-IgM se midió por duplicado usando kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) disponibles en el mercado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Hepa-IC, Xeptagen, Venecia, Italia). Todos los reactivos se proporcionaron en el kit y los resultados se procesaron con el software XEREPRO (Xeptagen). La cantidad de complejos inmunes SCCA-IgM se expresó en unidades arbitrarias (AU) / mL mediante la interpolación de la absorbancia de las muestras en las curvas de calibración trazadas con calibradores SCCA-IgM. De manera resumida, se incubaron suero diluido (100 µl, 1: 8 en tampón de dilución) en placas precargadas con el anticuerpo policlonal específico. Se generaron curvas estándar adecuadas para cada placa de ELISA utilizada. Si los resultados del ensayo duplicado mostraron una diferencia con más del 10% de variación del coeficiente (CV), se realizó un ensayo duplicado repetido, y solo se incluyeron resultados confiables para el análisis. Los niveles de AFP se determinaron mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia usando un analizador automatizado Elecsys (Roche, Suiza).

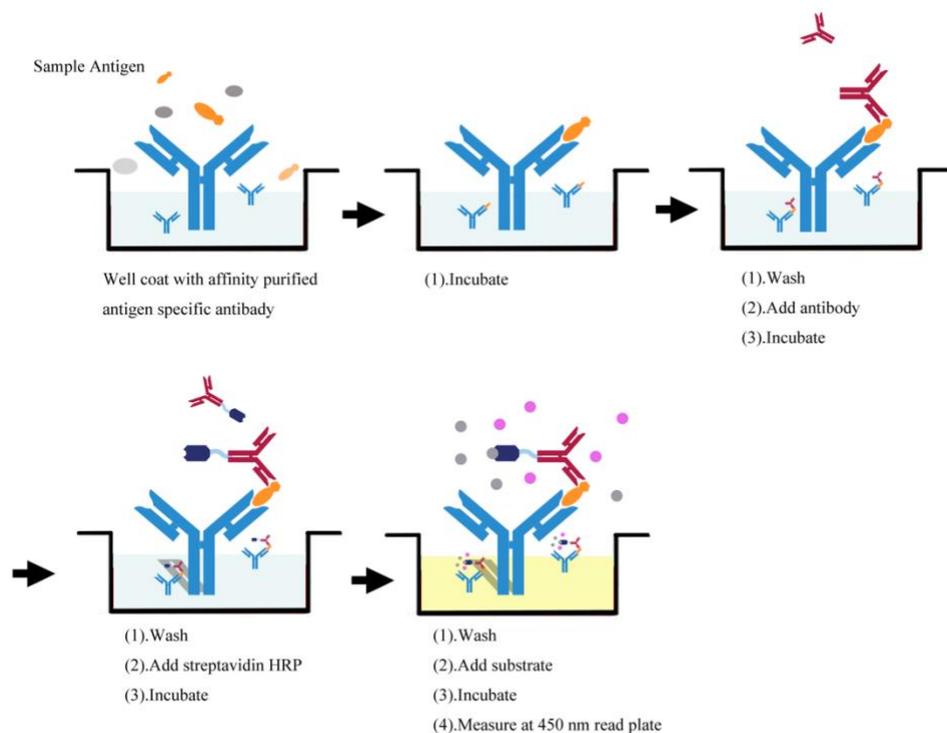


Figura 8. Proceso del usar ELISA para SCCA-IgM.

4.2.4.1 Principio del test

Los calibradores estándar y las muestras son simultáneamente incubadas en los pocillos de una placa microtituladora sensibilizada con anticuerpo anti-SCCA. El inmunocomplejo SCCA-IgM es detectado mediante la incorporación de un anticuerpo secundario conjugado con enzima y el sustrato de la enzima (TMB). El color desarrollado es proporcional a la cantidad del inmunocomplejo de la muestra.

4.2.4.2 Reactivos y materiales

XG003-PL: microplaca de 96 pocillos, sensibilizada con anticuerpo anti-SCCA purificado de conejo.

XG003-Calibrator: Dos viales de calibrador liofilizado de PBS. Polvo blanco. Concentración exacta en la etiqueta. XG-EA2: 14 mL de una solución de anticuerpo secundario anti-IgM conjugado con peroxidasa listo para usar.

XG-CH7: 14 mL de una solución cromógena lista para usar de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine).

XG-ST7: 14 mL de solución bloqueadora de H_2SO_4 0.3M lista para usar.

XG-DB5: 5 mL de solución de dilución concentrada 5x. Diluir con agua desionizada. Una vez diluida, la solución contiene 1% BSA y 0.05% Tween 20. Contiene Proclin como conservante.

XG-WB3: 100 mL de solución de lavado concentrada 10x. Diluir con agua desionizada.

Pipetas de precisión con puntas desechables.

Lavador de microplacas.

Lector de microplacas con filtro 450 ± 20 nm.

Agua destilada o desionizada.

4.2.4.3 Preparación los reactivos

- Reconstituir el calibrador XG003 con 440 μ L de agua desionizada en cada vial.
- Preparar la cantidad necesaria del buffer de dilución XG-DB5 diluyendo 5 veces la solución concentrada con agua desionizada. Si aparecen cristales tras la refrigeración, calentad la botella a 37°C y agitada hasta su disolución.
- Preparar la cantidad necesaria del buffer de lavado XG-WB3 diluyendo 10 veces la solución concentrada en agua desionizada.

4.2.4.4 Ejecución del test

1. Preparar los reactivos como descrito anteriormente.

2. Preparar la microplaca con suficientes pocillos para llevar a cabo el test del estándar y las muestras.
3. Extraer de la matriz de la microplaca las tiras sobrantes y conservarlas en la bolsa de plástico con el desecante suministrado.
4. Lavar las tiras de la microplaca tres veces con el buffer de lavado XG-WB3 (300 μ L/pocillo).
5. Distribuir 100 μ L/pocillo del calibrador estándar (por duplicado) empezando por la solución reconstituida y llevando a cabo en la placa diluciones seriadas con factor de dilución 2 con el objetivo de obtener una curva de calibración de 7 puntos. Usar el buffer de dilución XG-DB5 como diluyente (videoclip en <http://www.xeptagen.com/elisains>). Para la concentración exacta del calibrador reconstituido, hacer referencia al valor de concentración (AU/mL) indicado en el vial XG003-Calibrator. Distribuir también 100 μ L/pocillo del buffer de dilución DB5 como blanco por duplicado.
6. Distribuir 100 μ L/pocillo de las muestras diluidas 8 veces (1:8) por duplicado. Usar el *buffer* de dilución XG-DB5 como diluyente.
7. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Lavar seis veces con el buffer de lavado XG-WB3 (300 μ L/pocillo).
9. Añadir 100 μ L/pocillo de la solución del anticuerpo secundario conjugado XG-EA2.
10. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
11. Lavar seis veces con el *buffer* de lavado XG-WB3 (300 μ L/pocillo).
12. Distribuir 100 μ L/pocillo de la solución cromógena XG-CH7.
13. Permitir que la solución se colore durante 10-15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, añadir 100 μ L/pocillo de la solución de stop

XG-ST7 y medir los valores OD de cada pocillo usando un lector de placas ELISA equipado con un filtro de 450 nm. Una vez bloqueada la reacción debe leerse dentro de una hora.

14. Interpretar los valores de OD con el software Xerepro (<http://www.xeptagen.com/software>) o como descrito en la próxima sección: Elaboración de los resultados.

4.2.4.5 Análisis estadístico

La regresión de riesgos proporcionales de Cox se utilizó para estimar el cociente de riesgo (CR) y los intervalos de confianza (IC). En análisis univariante, las comparaciones entre las variables categóricas se realizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado o Fisher. Los resultados se presentan como frecuencias y porcentajes para variables categóricas, medias y desviaciones estándar para variables continuas normales y mediana, cuartil 1 y 3 para variables continuas no normales. Los factores que muestran una asociación estadística ($p < 0,05$) con el CHC en análisis univariados se combinaron en un modelo multivariable paso a paso hacia atrás. También se incluyeron factores no significativos, pero de posible relevancia clínica, como la edad y el sexo, para evitar factores de confusión. En la cohorte de estimación, usamos los dos años de aparición del CHC como intervalo del tiempo para el análisis univariante y multivariante porque por lo menos hay que hacer cribado a los pacientes con riesgo cada 2 años. El punto de corte predictivo se estableció mediante el método de curva característica de funcionamiento del receptor (ROC) a un valor que maximizaba la especificidad y la sensibilidad. El punto de corte de SCCA-IgM se seleccionó por el valor más alto siguiendo el Índice del Youden. El punto de corte para AFP se estableció en 5 UI/ml siguiendo estudios publicados previamente para diferenciar

pacientes CHC vs no-CHC. Los puntos de corte obtenidos en la cohorte de estimación fueron usados en la cohorte de validación. Para las covariables continuas, se determinaron los valores umbral para mejorar la utilidad clínica. Las variables categóricas se compararon mediante el método de Kaplan-Meier, con curvas comparadas usando la prueba de log-rank. Calculamos la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN) de la combinación de SCCA-IgM y AFP para demostrar la capacidad predictiva de acuerdo a concepto que enseñaba en la tabla 6 y 7. El paquete estadístico SPSS (versión 21.0; SPSS Inc., IL, EE. UU.) Se utilizó en todos los análisis y los gráficos se realizaron utilizando GraphPad PRISM (versión 6.0, GraphPad Software Inc., CA, EE. UU.).

5. RESULTADOS

5.1 Meta-análisis de SCCA y SCCA-IgM

5.1.1 Resultados de la investigación

Como se ve en el diagrama de flujo detallado del proceso de selección de artículos, después de las búsquedas independientes, se excluyeron un total de 211 estudios y se seleccionaron 11 para este meta-análisis. Seis estudios sobre SCCA-IgM, cuatro estudios sobre SCCA y uno sobre SCCA-IgM y SCCA se incluyeron. (Figura 9) En el grupo de estudios sobre SCCA-IgM, el meta-análisis incluyó 739 pacientes con CHC y un grupo de control de 868 pacientes sin CHC; en el grupo de estudios sobre SCCA, hubo 783 pacientes con CHC y 654 pacientes sin CHC. Cuatro estudios analizaron la combinación de AFP y SCCA-IgM (185 pacientes con CHC y 342 pacientes sin CHC), y dos estudios abordaron la combinación de AFP y SCCA (180 pacientes con CHC y 120 pacientes sin CHC).

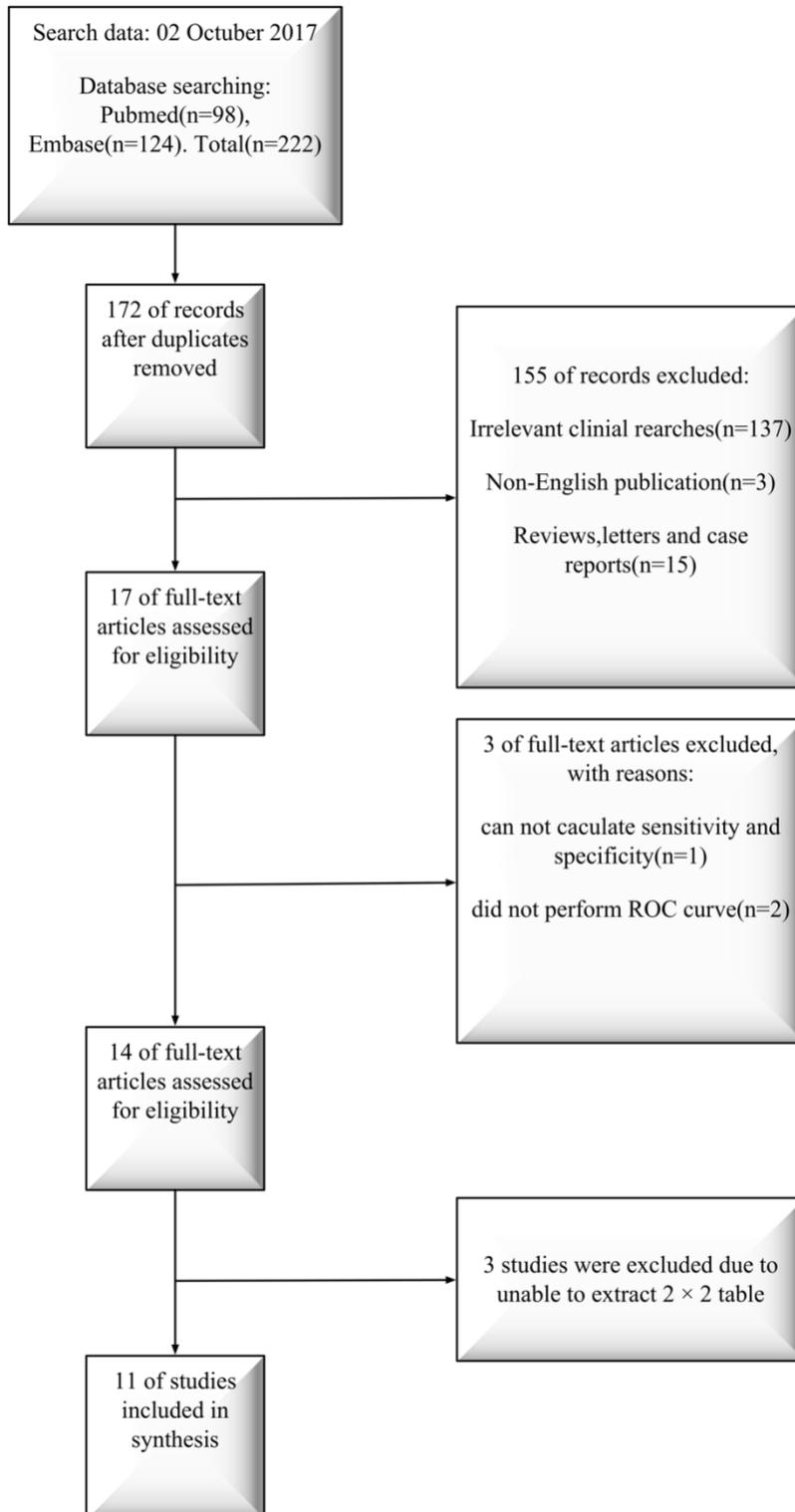


Figura 9. Diagrama de flujo de la selección de artículos.

5.1.2 Características elegibles del estudio y evaluación de calidad

Las características de los estudios elegibles se enumeran en la Tabla 9:

Biomarker	Study	Year	Country	Subjects	TP	FP	FN	TN	Etiology viral only	HCV > 50%	Child A > 50%	Child C > 10%	Sample size > 100	Cut-off	Age > 60	Biopsy	AUC	Cut-off	Se	Sp
SCCA-IgM	Beneduce et al	2005	Italy	50 HCC/50 CR/73 HD	35	13	15	37	Y	Y	NA	NA	Y	Y	Y	Y	0.74	120 AU/mL	70	74
	Giannelli et al	2007	Italy	499 HCC/462 CR	261	112	238	350	N	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	0.68	104 AU/mL	52	76
	Biasiolo et al	2012	Italy	26 HCC/36 CR/ 17 CLD	15	19	11	17	Y	Y	NA	NA	N	Y	Y	Y	NA	156 AU/mL	58	47
	Buccione et al	2012	Italy	HCC 29/28 CR	17	3	12	25	N	Y	Y	N	N	Y	Y	N	NA	200 AU/mL	59	89
	Pozzan et al	2014	Italy	81 HCC/206 CR/40 HD	72	104	9	102	N	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	0.63	89 AU/mL	89	50
	Mossad et al	2014	Egypt	40 HCC/30 CR/ 20 HD	35	10	5	20	Y	Y	N	Y	N	N	N	Y	0.86	233 AU/mL	88	67
	Biasiolo et al	2016	Italy	14 HCC/56 CR	7	8	7	48	N	N	Y	N	N	Y	N	N	0.8	156 AU/mL	50	86
SCCA	Giannelli et al	2005	Italy	120 HCC/90 CR/41 HD	101	47	19	43	N	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	0.71	0.37 ng/mL	84	48

	Giannelli et al	2007	Italy	499 HCC/462 CR	209	80	290	382	N	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	0.66	3.8 ng/mL	42	83
	Hussein et al	2008	Egypt	49 HCC/30 CLD/15 HD	38	7	11	38	NA	NA	N	N	N	Y	N	Y	0.87	1.5 ng/mL	78	84
	Trerotoli et al	2009	Italy	55 HCC/27 CR	40	0	15	27	N	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	0.9	1.1 ng/mL	73	100
	Soyemi et al	2012	Nigeria	60 HCC/30 HD	45	22	15	8	N	N	NA	NA	Y	N	N	N	0.58	0.37 ng/mL	75	27
Combination of SCCA- IgM and AFP	Beneduce et al	2005	Italy	50 HCC/50 CR/73 HD	48	18	2	32	Y	Y	NA	NA	Y	Y	Y	Y	NA	SCCA- IgM: 120 AU/mL; AFP: 20 ng/mL	96	64
	Pozzan et al	2014	Italy	81 HCC/206 CR/40 HD	76	113	5	93	N	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	NA	SCCA- IgM: 89 AU/mL; AFP: 200 U/mL	94	45
	Mossad et al	2014	Egypt	40 HCC/30 CR/20 HD	37	12	3	18	N	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	NA	SCCA- IgM: 233 AU/mL; AFP: 48 ng/mL	93	62
	Biasiolo et al	2016	Italy	14 HCC/56 CR	2	0	12	56	N	N	Y	N	N	Y	N	N	0.83	SCCA- IgM: 156 AU/mL; AFP: 20 ng/mL	14	100
Combination of SCCA and AFP	Giannelli et al	2005	Italy	120 HCC/90 CR/41 HD	109	50	11	40	N	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	0.806	SCCA: 0.37 ng/ml; AFP is 20 IU/ml	91	44
	Soyemi et al	2012	Nigeria	60 HCC/30 HDs	26	0	34	30	N	N	NA	NA	Y	N	N	N	0.62	SCCA: 0.37 ng/mL; AFP: 200 ng/mL	43	100

AFP: alpha-fetoprotein. SCCA: squamous cell carcinoma antigen. SCCA-IgM: squamous cell carcinoma antigen immune-complex.
TP: true positive; FP: false positive; FN: false negative; TN: true positive. Y: yes; N: no; NA: not available.
Cut-off: SCCA-IgM: 100 AU/mL < cut-off < 200 AU/mL [yes]; SCCA: cut-off < 1 ng/mL [yes] vs cut-off > 1 ng/mL.
HCC: hepatocellular carcinoma. CR: cirrhosis. CLD: chronic liver disease. HD: healthy donor. Se: sensitivity; Sp: specificity.

Tabla 9. Las características de los estudios elegibles.

La evaluación de calidad se realizó de acuerdo con los criterios QUADAS-2 modificados y se muestra en un gráfico de barras. (Tabla 10) El mayor sesgo identificado en los estudios fue en "selección de pacientes" y la "prueba de índice". Cuatro estudios seleccionaron a los pacientes con cirrosis como el grupo control,^{300,301,303,305} siete estudios incluyeron pacientes con hepatitis, enfermedad hepática crónica o cirrosis o donantes sanos como el grupo de control.^{202,203,286,291,292,302,304} Tres estudios no incluyeron biopsias tumorales para confirmar el CHC,^{286,291,303} y se marcaron como estudio "incierto"³⁰⁵.

Study	RISK OF BIAS				APPLICABILITY CONCERNS		
	PATIENT SELECTION	INDEX TEST	REFERENCE STANDARD	FLOW AND TIMING	PATIENT SELECTION	INDEX TEST	REFERENCE STANDARD
Beneduce, 2005	High Risk	High Risk	Low Risk	Unclear Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk
Giannelli, 2005	High Risk	Unclear Risk	High Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk
Giannelli, 2007	Unclear Risk	Unclear Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk
Hussein, 2007	High Risk	Unclear Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk
Trerotoli, 2009	Low Risk	Unclear Risk	Low Risk	Low Risk	High Risk	Low Risk	Low Risk
Biasiolo, 2012	High Risk	Low Risk	Low Risk	High Risk	Low Risk	Unclear Risk	Low Risk
Buccione, 2012	Low Risk	Low Risk	High Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk
Soyemi, 2014	High Risk	Unclear Risk	Unclear Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk
Mossad, 2014	High Risk	Unclear Risk	Unclear Risk	Low Risk	High Risk	Low Risk	Low Risk
Pozzan, 2014	High Risk	Unclear Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk
Biasiolo, 2016	Low Risk	Low Risk	Unclear Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk	Low Risk

 Low Risk
  High Risk
  Unclear Risk

Tabla 10. Evaluación de calidad según los criterios QUADAS-2.

5.1.3 Análisis de datos

La prueba de heterogeneidad se realizó en los estudios SCCA-IgM y SCCA. Se observó una heterogeneidad significativa tanto en el grupo SCCA-IgM ($Q = 81,809$, $p = 0,000$, $I^2 = 98,95$) como en el grupo SCCA ($Q = 145,216$, $p = 0,000$, $I^2 = 99,95\%$). Esta heterogeneidad podría explicarse por los diferentes umbrales utilizados en los diversos estudios. Los resultados del análisis de sensibilidad sugirieron que el estudio de Giannelli et al.³⁰⁰ fue un valor atípico importante, con una estimación de 5,99 en el grupo SCCA-IgM vs. 3,89 - 4,34 en el resto de los estudios y 5,02 en el grupo SCCA vs. 3,67 - 4,18 en el resto de los estudios. Después de la omisión de este estudio atípico, realizamos nuevamente el análisis de sensibilidad y observamos que no existían otros valores atípicos y que todos los estudios fueron estables para ambos grupos. Para confirmar la fiabilidad del análisis después de omitir el estudio de valores atípicos, se construyó un diagrama de caja bivalente e ilustró que todos los puntos estaban dentro del IC del 95%, verificando que no existía un efecto umbral.

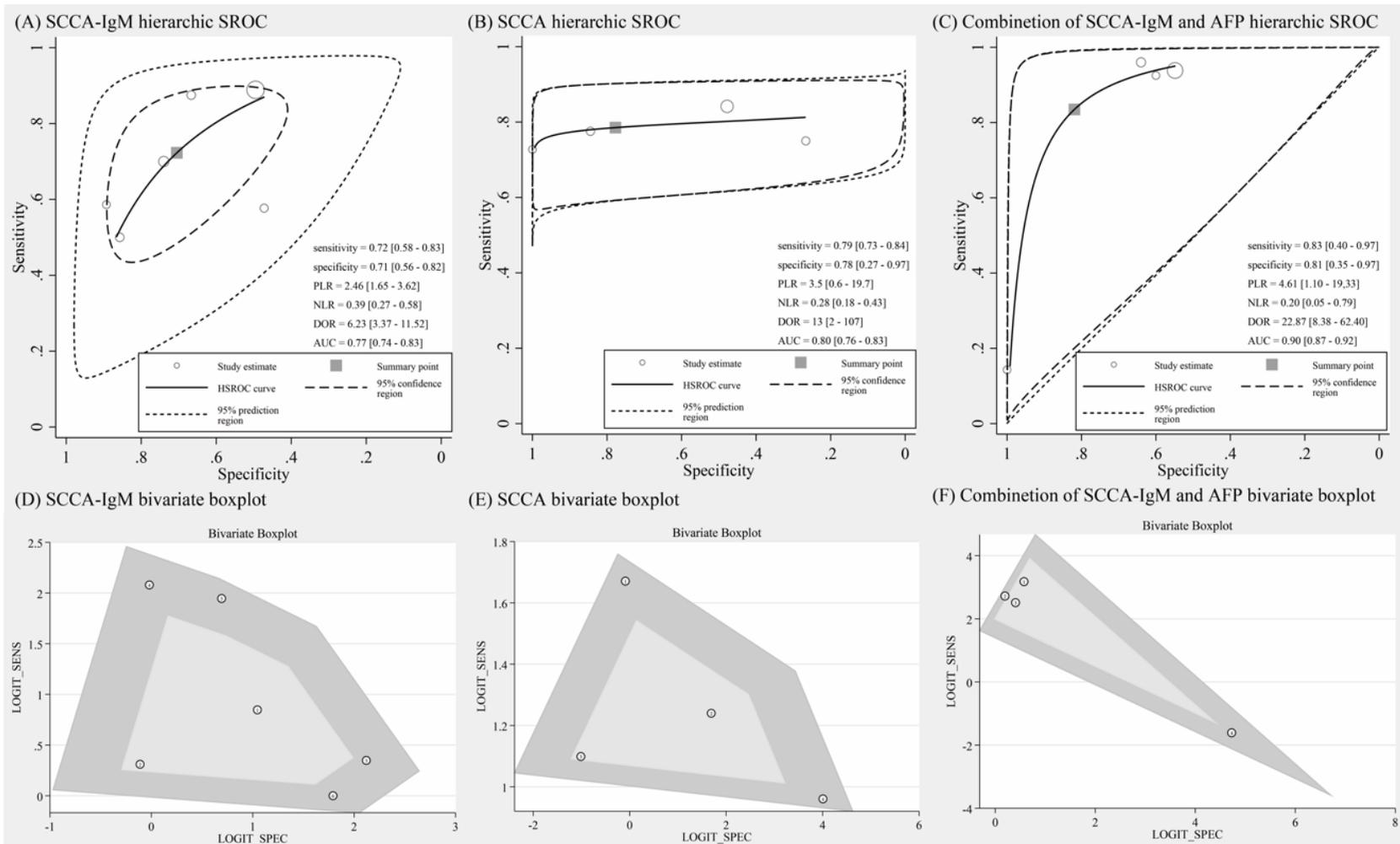


Figura 10. Curva HSROC del rendimiento diagnóstico para CHC de (A) SCCA-IgM, (B) SCCA y (C) la combinación de SCCA-IgM y AFP. Gráfico de caja bivalente para estimar la variabilidad umbral entre la sensibilidad y la especificidad para (D) SCCA-IgM, (E) SCCA y (F) la combinación de SCCA-IgM y AFP. HSROC = característica operativa del receptor de resumen jerárquico; PLR = razón de probabilidad positiva; NLR = razón de verosimilitud negativa; DOR = odds ratio de diagnóstico; AUC = área debajo de la curva.

Después de la omisión de Giannelli et al. Study,³⁰⁰ las curvas HSROC construidas para estimar la sensibilidad, especificidad, PLR, NLR y DOR. (Figura 2) Los AUC de SCCA y SCCA-IgM fueron de 0,80 (IC del 95%: 0,76 a 0,83) y 0,77 (IC del 95%: 0,74 a 0,83), respectivamente. La combinación de SCCA-IgM y AFP dio como resultado un aumento del DOR a 22,87 (IC 95%: 8,38 - 62,40) y un aumento del AUC a 0,90 (IC 95%: 0,87 - 0,92). Desafortunadamente, no pudimos evaluar la combinación de AFP y SCCA porque solo se han publicado dos estudios hasta la fecha, y se requieren un mínimo de cuatro estudios para ejecutar las estadísticas de "Metandi" para HSROC en STATA. Heterogeneidades significativas todavía estaban presentes en SCCA-IgM (Q = 35, p = 0,000, I² = 94), SCCA (Q = 35, p = 0,000, I² = 94%) y la combinación de SCCA-IgM y AFP (Q = 80, p = 0,000, I² = 98).

5.1.4 Nomogramas Fagan

En los nomogramas de Fagan en la baja sospecha de escenario de CHC, los resultados mostraron que una probabilidad posterior negativa del 6% con la combinación de SCCA-IgM y AFP podría considerarse suficiente para excluir la posibilidad de CHC, seguido por 8% con SCCA y 12% con SCCA-IgM. Por otro lado, en la gran sospecha de un escenario de CHC, una probabilidad posterior positiva del 93% podría considerarse suficiente para confirmar el diagnóstico de CHC con la combinación de SCCA-IgM y AFP, seguido de 91% con SCCA y 88% con SCCA-IgM.

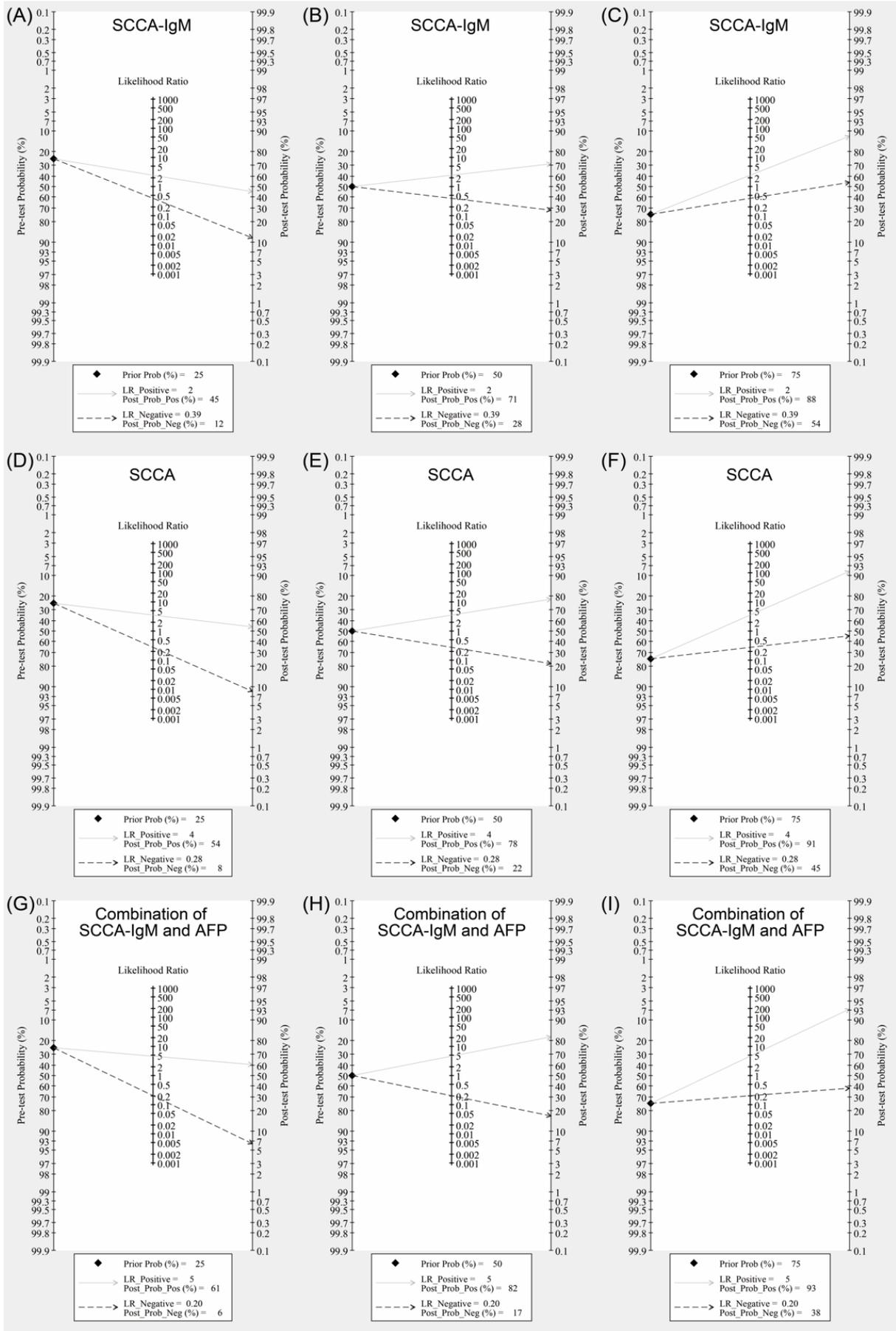


Figura 11. Análisis del nomograma de Fagan que evalúa la utilidad clínica de SCCA-IgM, SCCA y la combinación de SCCA-IgM y AFP para el diagnóstico de CHC de acuerdo con diferentes probabilidades previas a la prueba (previas). SCCA-IgM: A) probabilidad de prueba previa = 25%; B) probabilidad de prueba previa = 50%; C) probabilidad de prueba previa = 75%. SCCA: D) probabilidad de prueba previa = 25%; E) probabilidad de prueba previa = 50%; F) probabilidad de prueba previa = 75%. Combinación de SCCA-IgM y AFP: G) probabilidad de prueba previa = 25%; H) probabilidad de prueba previa = 50%; I) probabilidad de prueba previa = 75%. Prob anterior = probabilidad de prueba previa; LR_Positive = razón de probabilidad positiva; Post_Prob_Pos = probabilidad positiva posterior a la prueba; LR_Negativo = razón de verosimilitud negativa; Post_Prob_Neg = probabilidad negativa posterior a la prueba.

5.1.5 Metarregresión univariable y análisis de subgrupos

El tamaño de muestra pequeño (5 estudios) para SCCA limitó el poder estadístico de la metarregresión. Analizamos SCCA para explorar mejor los cofactores que influyeron en ambos grupos; sin embargo, debemos interpretar estos resultados con precaución. Tanto en los grupos SCCA como SCCA-IgM, la selección del paciente, los valores de corte y la biopsia tumoral fueron estadísticamente significativos.

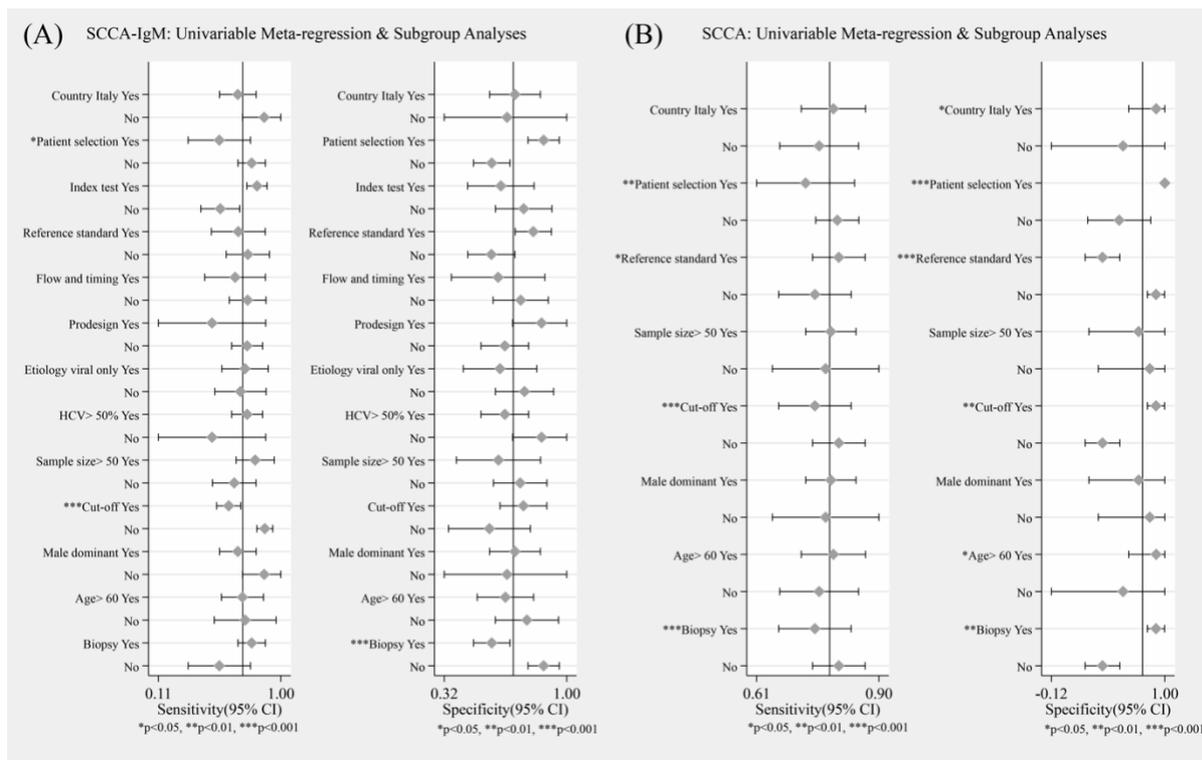


Figura 12. Metarregresión univariada y análisis de subgrupos del rendimiento diagnóstico de (A) SCCA-IgM y (B) SCCA para detectar CHC. Selección de pacientes sí = solo pacientes con cirrosis incluidos como control, no pacientes con hepatitis o donantes sanos; corte sí = SCCA-IgM: 100 AU / mL <corte <200 UA/ mL y SCCA: corte <1 ng / mL; dominante masculino = proporción masculina > 65%.

En el análisis de metarregresión no se incluyeron covariables como etiología,²⁰³ Child-Pugh clase A > 50% y C <10%,^{286,302} debido a que los artículos no informaban los datos o los datos no podían ser extraídos.

5.1.6 El sesgo de publicación

El gráfico de embudo Deeks43 no identificó ningún sesgo de publicación para SCCA-IgM (p = 0,69) o SCCA (p = 0,63).

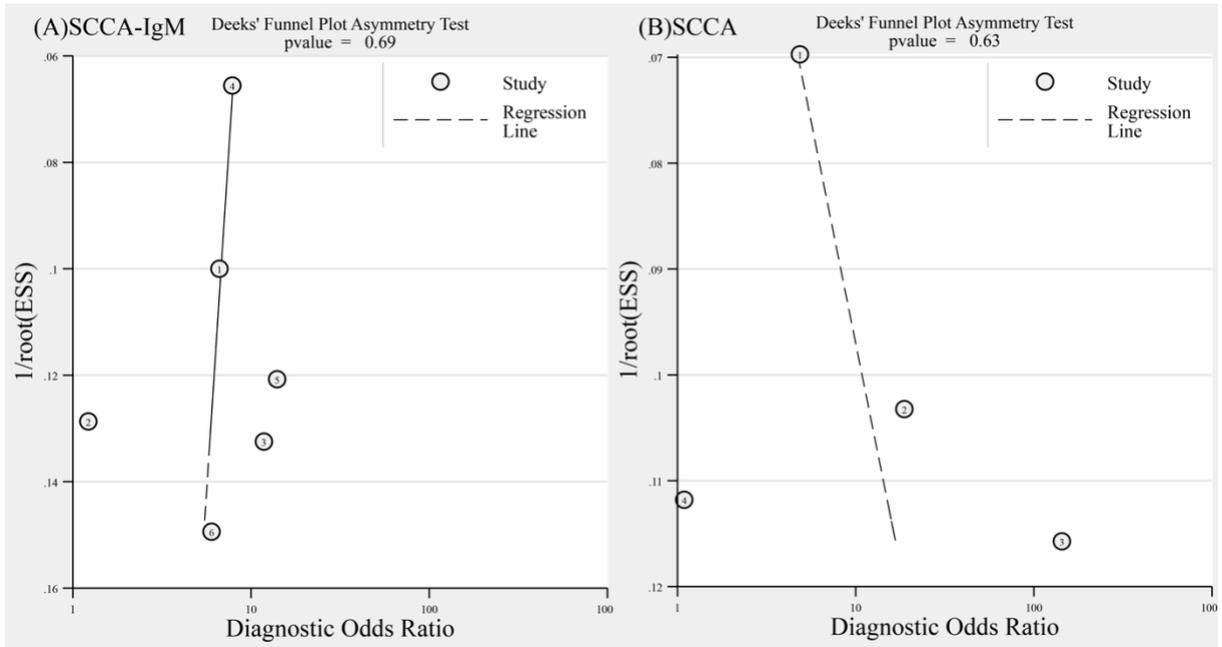


Figura 13. Los diagramas de embudo de Deeks que evalúan el posible sesgo de publicación en la detección de CHC con (A) SCCA-IgM y (B) SCCA.

5.2 SCCA-IgM en la predicción de hepatocarcinoma

5.2.1 Descripción de la cohorte

Las características basales y los parámetros bioquímicos de la cohorte en general, así como las cohortes de estimación y validación, se muestran en la Tabla 11. En resumen, se incluyeron un total de 203 pacientes con cirrosis hepática en el estudio, con 74.9% Child A, 21.2% Child B y 3.9% Child C. La etiología más común de la cirrosis fue el alcohol (54.2%), seguido por el VHC (27.1%) y el VHB (8.4%). Se observó desarrollo de CHC en 22 pacientes (10.8%) durante el seguimiento de dos años (22.1 ± 5.11) y 47 pacientes (23.2%) durante el seguimiento de cinco años (54.2 ± 17.54 meses). Los valores iniciales de SCCA-IgM en suero fueron significativamente más altos en pacientes que desarrollaron CHC que en aquellos que no (425.72 ± 568.33 AU / ml frente a 195.93 ± 188.40 AU / ml, $p = 0.009$) durante el seguimiento de cinco años, así como AFP (15.41 ± 31.71 UI / mL vs. 5.89 ± 8.91 UI / mL, $p = 0.047$).

	Global (n=203)	Italian (n=62) (Estimation cohort)	Spanish (n=141) (Validation cohort)	Univariable analysis
Gender (Male)	73.4% (149/203)	74.2% (46/62)	73.0% (103/141)	0.865
Mean age (years)	57.931 ± 9.76	55.77 ± 10.51	58.87 ± 9.22	
Etiology				0.001
Alcohol	54.2% (110/203)	41.9% (26/62)	59.6% (84/141)	
HCV	27.1% (55/203)	38.7% (24/62)	22.0% (31/141)	
HBV	8.4% (17/203)	16.1% (10/62)	5% (7/144)	
Others	10.3% (21/203)	3.2% (2/62)	13.5% (19/141)	
Child-Pugh				0.340
A	74.9% (152/203)	64.5% (40/62)	79.4% (112/141)	
B	21.2% (43/203)	27.4% (17/62)	18.4% (26/141)	
C	3.9% (8/203)	8.1% (5/62)	2.1% (3/141)	
AST (IU/ml)	51.69 ± 38.49	69.17 ± 47.74	44.50 ± 31.44	0.001
ALT (IU/ml)	42.54 ± 38.68	61.09 ± 56.11	34.91 ± 25.164	0.000
Tot. Bilirrubin (mg/dl)	1.60 ± 1.87	1.94 ± 2.87	1.45 ± 1.22	0.215
Creatinin (mg/dl)	0.86 ± 0.68	0.98 ± 1.21	0.81 ± 0.22	0.292
Platelets (x 10 ⁹ /ml)	116.00 ± 58.10	100.53 ± 43.11	122.45 ± 62.32	0.005
Albumin (mg/dl)	3885.19 ± 586.66	3810.34 ± 613.79	3916.34 ± 574.96	0.248
AFP (IU/mL)	8.09 ± 17.50	12.00 ± 25.43	6.69 ± 12.82	0.101
SCCA-IgM (AU/ml)	249.13 ± 332.01	197.73 ± 431.13	271.73 ± 276.35	0.144
Two-year HCC (Yes)	10.8% (22/203)	12.9% (8/62)	9.9% (14/141)	0.530
Five-year HCC (Yes)	23.2% (47/203)	21% (13/62)	24.1% (34/141)	0.625

Tabla 11. Características de la población incluida.

5.2.2 Factor de riesgo de desarrollar CHC

El análisis univariado mostró que el nivel de SCCA-IgM ($p = 0.004$), AFP ($p = 0.000$), AST ($p = 0.021$) y creatina ($p = 0.018$) se asociaron con la supervivencia libre de CHC durante dos años en la cohorte de estimación. (Tabla 12) Sin embargo, la clasificación de Child-Pugh, el recuento de plaquetas y otros parámetros bioquímicos fueron similares entre ambos grupos de pacientes. Mediante el uso de una regresión de Cox multivariada, después de ajustar por edad, sexo y AST, SCCA-IgM (HR 1.001 IC 95% 1.000 - 1.002; $p = 0.003$), AFP (HR 1.028 IC 95% 1.009 - 1.046; $p = 0.003$) y la creatina (HR 1,564, IC del 95%: 1,151 a 2,142; $p = 0,004$) se asoció de forma independiente con un aumento de la mortalidad a un año. Los pacientes con CHC mostraron niveles más altos de SCCA-IgM que los que no la tenían (608.75 ± 1093.53 vs. 136.83 ± 163.44 ; $p = 0.107$).

Covariate	Non-HCC (n=54)	HCC (n=8)	Univariable analysis HR (95% CI; p value)	Multivariable analysis HR (95% CI; p value)
Gender (Male)	74.1% (41/54)	72.7% (5/8)	0.571 (0.137 - 2.39; 0.444)	
Mean age (years)	55.96 ± 10.82	54.50.1 ± 8.569	0.987 (0.924 - 1.055; 0.706)	
Etiology (alcohol/HCV/HBV/other)	25/17/10/2	1/7/0/0		
Child-Pugh (A/B/C)	35/14/5	5/3/0	0.922 (0.290 - 2.935; 0.891)	
AST (IU/ml)	63.94 ± 42.21	107.29 ± 69.83	1.013 (1.002 - 1.024; 0.021)	
ALT (IU/ml)	58.86 ± 55.48	77.29 ± 62.52	1.004 (0.993 - 1.015; 0.452)	
Tot. Bilirubin (mg/dl)	1.97 ± 3.05	1.75 ± 1.02	0.983 (0.734 - 1.316; 0.906)	
Creatinine (mg/dl)	0.83 ± 0.20	2.05 ± 3.44	1.363 (1.055 - 1.762; 0.018)	1.564 (1.151 - 2.124; 0.004)
Platelets (x 10 ⁹ /ml)	102.25 ± 43.28	88 ± 42.89	0.992 (0.974 - 1.010; 0.387)	
Albumin (mg/dl)	3833 ± 625	3642 ± 525	1.000 (0.998 - 1.001; 0.394)	
AFP (IU/mL)	7.80 ± 9.25	40.38 ± 62.71	1.024 (1.010 - 1.038; 0.000)	1.028 (1.009 - 1.046; 0.003)
SCCA-IgM (AU/ml)	136.83 ± 163.44	608.75 ± 1093.53	1.001 (1.000 - 1.002; 0.004)	1.001 (1.000 - 1.002; 0.003)

Tabla 12. Factores asociados con CHC por la regresión de riesgos proporcionales de Cox.

5.2.3 Estimación interna de la combinación de SCCA-IgM y AFP

La curva ROC analizó SCCA-IgM y AFP, diferenciando pacientes con cirrosis que desarrollaron CHC durante dos años de seguimiento de los pacientes restantes. Al establecer un corte de 124 UA / ml para SCCA-IgM (sensibilidad de 75% y especificidad de 76%) y el uso de un corte de 5 IU / ml para AFP (sensibilidad de 75% y especificidad de 48%), construimos además la curva ROC de la combinación de ellos. El grupo de bajo riesgo (AFP <5 UI / ml y SCCA-IgM <124 UA / ml), el grupo de riesgo intermedio (AFP <5 UI / ml o SCCA-IgM <124 UA / ml) y el grupo de alto riesgo (AFP <5 IU / ml y SCCA-IgM <124 UA / ml) se estratificaron. La SCCA-IgM, AFP y combinación de SCCA-IgM y AFP en la línea base para predecir el desarrollo de CHC se mostró en Figura 14.

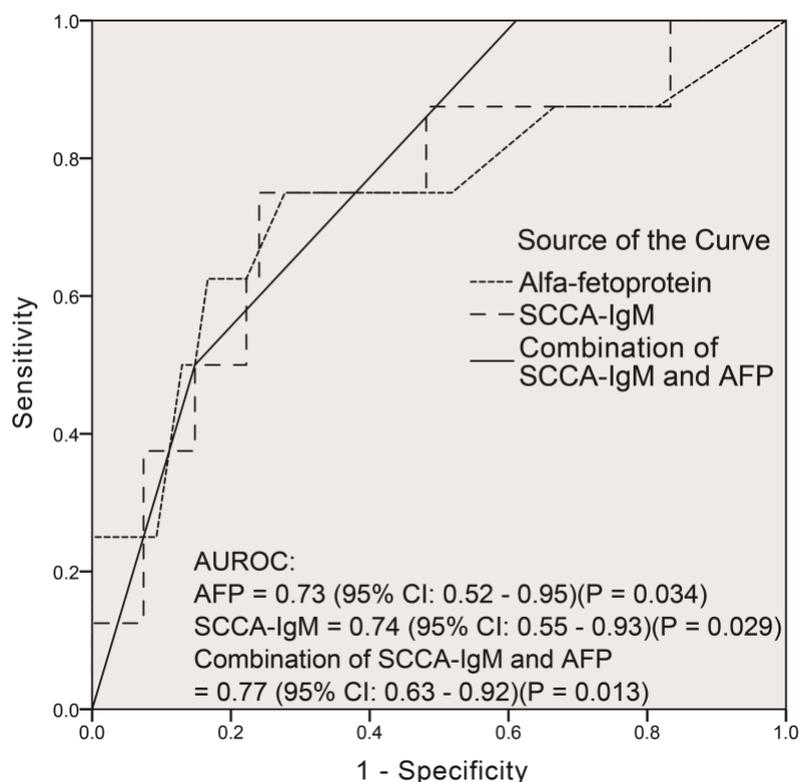


Figura 14. Curvas características operativas del receptor de la combinación de SCCA-IgM y AFP en comparación con SCCA y AFP para predecir la CHC-libre de dos años en la cohorte de estimación.

Las curvas de supervivencia medias predichas se compararon con las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con un seguimiento de dos y cinco años en la cohorte de estimación (Figura 15). La AFP no alcanzó significación estadística para predecir la supervivencia libre de CHC en dos años de seguimiento. Notablemente, encontramos que el grupo de bajo riesgo que fue estratificado por la combinación de SCCA-IgM y AFP identificó correctamente un 100% de la tasa de supervivencia libre de CHC en un seguimiento de dos años y además confirmado por cinco años de seguimiento. (Figura 15C)

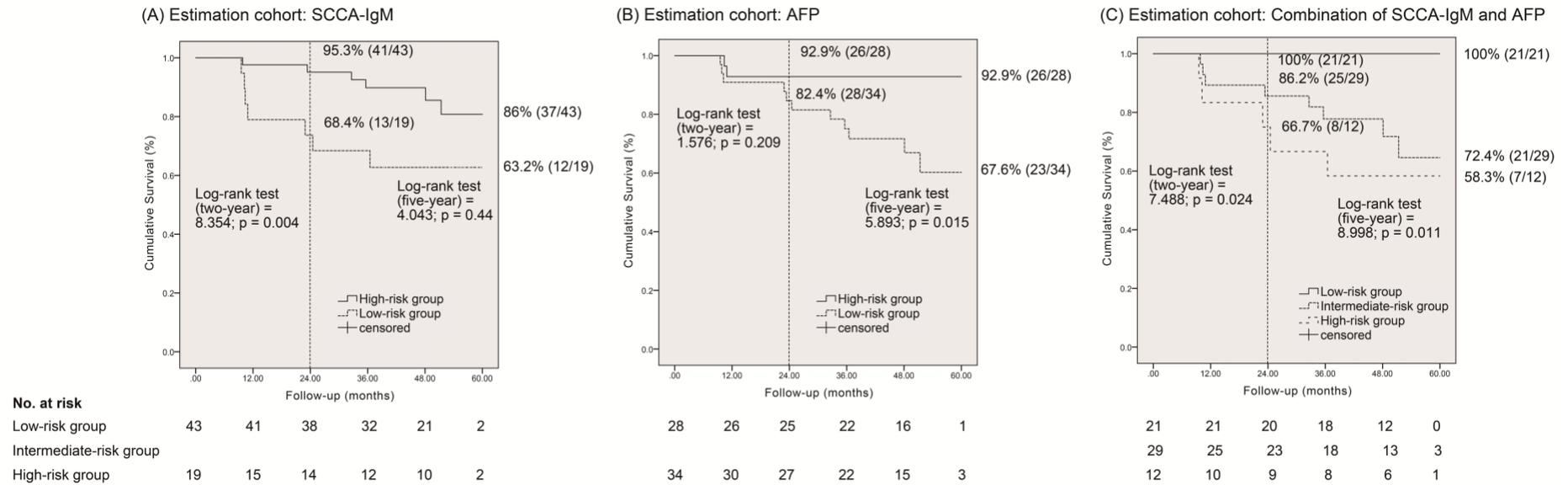


Figura 15. Estimación de la supervivencia libre de enfermedad del carcinoma hepatocelular de dos y cinco años mediante el método de Kaplan-Meier según el SCCA-IgM, la AFP y la combinación de ambos en la cohorte de estimación.

5.2.4 Validación externa

Con el fin de confirmar los resultados de la capacidad predictiva de la supervivencia libre de CHC, se usaron los mismos valores de corte para la cohorte de datos de validación. La alta capacidad de predicción para identificar a los pacientes de bajo riesgo se confirmó en la cohorte de validación, con un 100% de dos años y un 96,2% de cinco años de seguimiento de la supervivencia libre de CHC. (Figura 16C)

Para aplicaciones prácticas, calculamos la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN) y la razón de verosimilitud (IC) de la combinación de SCCA-IgM y AFP para demostrar la capacidad predictiva. (Tabla 13) Hasta donde sabemos, el VPP y el VPN siempre están influenciados por la prevalencia de la enfermedad investigada, que siempre representa menos precisión. Por lo tanto, el grupo de pacientes de bajo riesgo que no se desarrolló podría descartarse con precisión, se demostró una LR- de 0 en la cohorte de estimación y validación en el seguimiento de dos años. La tasa de clasificación correcta disminuyó del 77.3% al 71.9% en el seguimiento de dos años y del 75.3% al 66.5% en el seguimiento de cinco años cuando se aplica el mismo valor de corte desarrollado con una cohorte de estimación de dos años de seguimiento.

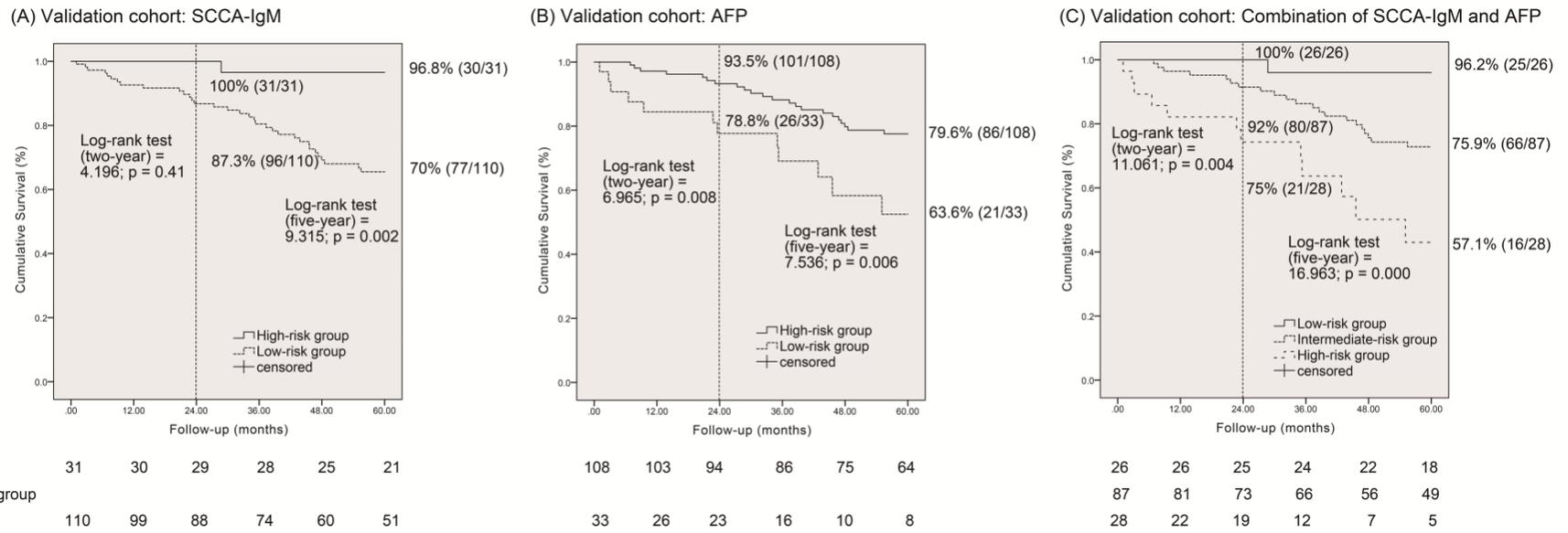


Figura 16. Estimación de la supervivencia libre de enfermedad del carcinoma hepatocelular de dos y cinco años mediante el método de Kaplan-Meier según el SCCA-IgM, la AFP y la combinación de ambos en la cohorte de estimación.

Variables	Two-year incidence in validation cohort				Five-year incidence in validation cohort			
	Estimation cohort		Validation cohort		Estimation cohort		Validation cohort	
Risk	Low-risk	High risk	Low-risk	High risk	Low-risk	High risk	Low-risk	High risk
Cut-off	AFP<5 IU/mL and SCCA-IgM <124 AU/mL	AFP>5 IU/mL and SCCA- IgM >124 AU/mL	AFP<5 IU/mL and SCCA-IgM <124 AU/mL	AFP>5 IU/mL and SCCA- IgM >124 AU/mL	AFP<5 IU/mL and SCCA-IgM <124 AU/mL	AFP>5 IU/mL and SCCA- IgM >124 AU/mL	AFP<5 IU/mL and SCCA-IgM <124 AU/mL	AFP>5 IU/mL and SCCA- IgM >124 AU/mL
Ture positive	8	4	14	7	13	5	33	12
False positive	33	8	101	21	28	7	82	16
Ture negative	21	46	26	106	21	42	25	91
False negative	0	4	0	7	0	8	1	22
Sensitivity (%)	100%	50%	100%	50%	100%	38%	97%	35%
Specificity (%)	39%	85%	20%	83%	43%	86%	23%	85%
PPV (%)	20%	33%	12%	25%	32%	42%	29%	43%
NPV (%)	100%	92%	100%	94%	100%	84%	96%	81%
LR+	1.64	3.38	1.26	3.02	1.75	2.69	1.27	2.36
LR-	0.00	0.59	0.00	0.60	0.00	0.72	0.13	0.76
Correctly classified (%)	77.3%		71.9%		75.3%		66.5%	

Tabla 13. Características de funcionamiento para la combinación de SCCA-IgM y AFP con respecto a la supervivencia sin enfermedad del carcinoma hepatocelular de dos y cinco años.

6. DISCUSIÓN

6.1 ¿Que hemos encontrado?

En el meta-análisis, las DOR de SCCA (13 [IC 95%: 2 - 107]) y SCCA-IgM (6,23 [IC 95%: 3,37 - 11,52]) mostraron que ambos tenían una precisión diagnóstica moderada (AUC: 0.7 - 0.9). La combinación de SCCA-IgM y AFP demostró una precisión diagnóstica alta (90-100). Los análisis de metarregresión y subgrupos mostraron que la heterogeneidad entre los estudios estaba relacionada con la selección del paciente, los valores de corte y el rendimiento de las biopsias tumorales. En comparación con los estudios previos,^{312,313} realizamos un análisis de sensibilidad Giannelli et al. Estudio³⁰⁰ mostró que el nivel de SCCA estaba inversamente relacionado con el tamaño del tumor, lo que puede ser útil para la detección temprana de CHC, y propuso una estrategia de dos pasos con una combinación de biomarcadores para mejorar la precisión diagnóstica. Sin embargo, este estudio utilizó 3.8 ng / mL como el valor de corte, que fue casi dos veces más alto que los valores de corte utilizados en otros estudios (0.37-1.5 ng / mL).^{203,291,292,301} Por lo tanto, la sensibilidad del 42% y la especificidad del 83% podrían ser controvertidos debido al alto valor de corte y su peso desproporcionado en el tamaño total de la muestra (499 del total de 783) al agrupar las sensibilidades, especificidades y AUC en nuestro metanálisis. Además, usamos curvas HSROC en lugar de los sROCs tradicionales para aumentar la confiabilidad de los resultados eliminando el posible efecto de umbral; sin embargo, esto resulta en la pérdida de información clínica relevante sobre el rendimiento de la prueba.³²⁷ Además, incluimos dos nuevos estudios SCCA-IgM por Buccione et al. (Buccione, 2012 #2998) y Biasiolo et al.³⁰⁵ (prospectivo). Más importante aún, se realizó la estimación resumida de una combinación de SCCA-IgM y AFP, e indicó una alta precisión diagnóstica (90-100). El nomograma de Fagan indicó claramente la utilidad de SCCA, SCCA-IgM y SCCA-IgM combinados con AFP

en la práctica clínica bajo diferentes escenarios con respecto a la sospecha de CHC. La metarregresión univariante reveló las covariables que condujeron a una heterogeneidad significativa.

Revelamos que la evaluación de riesgo de CHC mejorada mediante el uso de la presente combinación de SCCA-IgM y AFP permitiría la personalización de la estrategia de vigilancia. Se identificó correctamente un subgrupo de pacientes cirróticos de bajo riesgo con un 100% de seguimiento de dos años validado interna y externamente (a medio plazo) de la tasa de supervivencia libre de CHC, lo que permite personalizar la intensidad del cribado de CHC. Además, una alta incidencia de seguimiento a largo plazo de la tasa de supervivencia libre de CHC (96.2%) confirmó nuestra estrategia de vigilancia propuesta con pacientes con bajo riesgo de desarrollo de CHC. En comparación con el estudio anterior,^{304,305} aunque estudios previos han propuesto SCCA-IgM para la predicción de CHC, nuestro estudio es el primero en validar interna y externamente los biomarcadores propuestos. La validación es un aspecto importante del desarrollo del modelo predictivo, debido a que el rendimiento de los modelos de regresión es generalmente más alto en la cohorte de estimación que en la cohorte de validación, a pesar del diferente nivel de SCCA-IgM entre cohorte italiana y española.³³⁸ Los diferentes niveles de SCCA-IgM producen una disminución de la tasa de clasificación correcta de la cohorte de estimación a la cohorte de validación y explican que la necesidad urgente de un corte bien definido desarrollada por un estudio multicéntrico de población más grande en el futuro.³³⁹ Además, revelamos que la tasa de supervivencia sin CHC de seguimiento de dos años como resultado primario que se consideró la más importante en el uso de la práctica clínica debido al bajo riesgo de subgrupo de pacientes cirróticos para

ser revisado al menos cada dos años a pesar del seguimiento confirmado de cinco años de la tasa de supervivencia libre de CHC.

6.2 ¿Qué existe en la literatura?

EL SCCA es un inhibidor de la serina proteasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 3.³⁴⁰ SCCA se ha encontrado en las capas espinosas y granulares del epitelio escamoso normal y se asocia con células neoplásicas de origen epitelial.²⁷¹ Pontisso et al. demostró su sobreexpresión en pacientes cirróticos con CHC,²⁶⁷ y el nivel de expresión aumentó progresivamente con la progresión de la enfermedad hepática.²⁹⁸ Últimamente, el aumento progresivo de SCCA-IgM se ha asociado con el desarrollo de tumores hepáticos, lo que sugiere que monitorizar los niveles de SCCA-IgM podría ser útil para identificar pacientes cirróticos con mayor riesgo de desarrollar CHC.²⁹⁸ Dos estudios realizados en dos países diferentes Los niveles de SCCA y SCCA-IgM tienen una mejor precisión diagnóstica que la AFP para el diagnóstico de CHC.^{202,203} Además, varios estudios respaldaron la utilidad de SCCA-IgM para el diagnóstico, pronóstico,^{286,304} y el control de la enfermedad hepática crónica,^{307,308} incluida la respuesta histológica después de tratamientos antivirales³⁰⁸⁻³¹⁰. Sin embargo, los resultados son controvertidos debido a los diferentes valores de corte utilizados en cada estudio. Las sensibilidades variaron del 42% al 89% y las especificidades del 27% al 89%, con un amplio rango para los valores del AUC, de 0,66 a 0,86.^{202,203,286,291,292,300-305}

El meta-análisis previo realizado por Zhang et al.³¹² mostró que tanto el SCCA como el SCCA-IgM exhibían una precisión moderada para el diagnóstica CHC. Varios meta-análisis previos también demostraron el rendimiento diagnóstico de biomarcadores combinados tales como GPC3 y AFP (AUC: 0.85),¹⁹² GP73 y AFP

(AUC: 0.91),³⁴¹ y miARN y AFP (AUC: 0.94);³⁴² por lo tanto, se ha demostrado que la combinación de biomarcadores podría ser una estrategia de cribado factible en la práctica clínica. De hecho, las guías de práctica clínica basadas en evidencia japonesa para CHC recomiendan usar una combinación de ultrasonografía y tres biomarcadores [AFP, AFP-L3 y PIVKA-II para detectar la población de alto riesgo cada 3- 4 meses además de realizar CT o MRI cada 6 a 12 meses.³⁴³

SCCA y sus circuitos integrados se encuentran entre los pocos biomarcadores que han logrado atravesar el complejo proceso de descubrimiento y validación de biomarcadores. Las principales ventajas de SCCA están realmente representadas por la expresión mejorada y el aumento de la concentración circulante en pacientes con CHC, así como por la disponibilidad de métodos comerciales (principalmente ELISA) que son adecuados para ser utilizados en la mayoría de los laboratorios clínicos. Sin embargo, los datos clínicos publicados hasta el momento y revisados en este artículo parecen sugerir que ni el SCCA total ni su isoforma SCCA1 pueden estar listos para el manejo de pacientes con CHC. Los estudios que investigan los valores séricos de SCCA-IgM han aportado pruebas más interesantes, ya que se encontró que el rendimiento diagnóstico era frecuentemente superior al de AFP y, lo que es más importante, la combinación de SCCA-IgM y AFP se caracterizaba por: una sensibilidad mucho mejor que cualquier biomarcador solo, con solo una modesta disminución de la especificidad.³⁴⁴ Esto fue aparentemente más evidente para los pacientes con valores de AFP en la llamada "zona gris" (es decir, 20-200 ng / ml).³⁰⁰ Giannelli et al. propuso una estrategia de combinación de biomarcadores para mejorar la precisión diagnóstica.³⁰⁰ La estrategia fue primero cribado con AFP y luego comprobar con SCCA, SCCA-IgM and AFP-IgM. Luego, La combinación se comprobó Pozzan et al.³⁰⁴, Mossad et al.²⁰² y Biasiolo et al.³⁰⁵

La combinación de síntomas clínicos, variables de laboratorio y biomarcadores moleculares se han investigado para desarrollar un modelo predictivo de riesgo de CHC; sin embargo, su realización aún se debate y aún no se ha adoptado en la práctica clínica. Un índice de riesgo de CHC de Toronto (THRI) reciente específico de la enfermedad reveló que la incidencia acumulada de CHC a 10 años difería de la categoría etiológica del 22% al 5%, los pacientes estratificados con tres grupos según la estimación de riesgo de CHC con un período de 10 años. incidencia de CHC del 3%, 10% y 32%, respectivamente.¹²⁹ La AFP ha sido eliminada actualmente por la guía de práctica clínica debido a que el uso de AFP solo dio como resultado un bajo valor predictivo positivo, que potencialmente da como resultado "exagerando" las pruebas de seguimiento (p. ej., tomografía computarizada, resonancia magnética) en los pacientes con AFP levemente elevados".³⁴⁵ Sin embargo, El-Serag et.al³⁴⁵ construyó un algoritmo basado en AFP para identificar pacientes en riesgo de CHC, lo que sugiere que la amplia disponibilidad de pruebas AFP, el alto nivel de estandarización de laboratorio y el bajo coste hicieron de la AFP una estrategia factible para predecir CHC. Además, recientes tres metanálisis han demostrado la utilidad de la combinación de AFP con SCCA-IgM³³⁹, des-gamma-carboxyprotrombina³⁴⁶ y la proteína de Golgi 73³⁴¹ para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular, sugiriendo una estrategia factible de cribado de CHC. Por lo tanto, la consideración que nos queda es que ya no se debe usar AFP para el diagnóstico y pronóstico del CHC o no, de hecho, cómo usarlo de manera apropiada.

pacientes con cirrosis, los pacientes con antecedentes familiares de cáncer hepatocelular y el VHB pacientes no cirróticos. No obstante, la precisión diagnóstica difiere claramente entre (1) CHC frente a cirróticos, (2) CHC frente a pacientes cirróticos y / o pacientes con enfermedad hepática crónica y (3) CHC frente a donantes sanos. Esta suposición fue confirmada en el estudio de Beneduce et al.²⁸⁶ que mostró una sensibilidad combinada idéntica del 70%, pero una especificidad del 100%, 73%, 80% con CHC vs. control, pacientes con cirrosis o pacientes con hepatitis, respectivamente. Por lo tanto, los estudios que incluyeron donantes sanos^{202,286} tenían un AUC (0,88 a 0,74), que fueron significativamente mayores que los del estudio que incluyó sólo a pacientes con cirrosis como el grupo de control (0.66) .³⁰⁰

Segundo, casi siempre se espera heterogeneidad en los meta-análisis que investigan la precisión de las pruebas de diagnóstico, principalmente debido a los diferentes valores de corte utilizados en cada estudio.^{347,348} Abordamos cuidadosamente los criterios de inclusión. Se excluyeron muchos estudios que eran irrelevantes o tenían un enfoque metodológico deficiente (211/222). La heterogeneidad disminuyó ligeramente en el análisis de sensibilidad después de eliminar el valor atípico, pero permaneció cierta heterogeneidad.

Tercero, las medidas de precisión (sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud o DOR) describen qué tan bien los resultados de los biomarcadores experimentales concuerdan con el estándar de oro. El estándar de referencia se usó en lugar del estándar de oro cuando el estándar de oro no estaba disponible, como ocurre a menudo en la práctica clínica. En la mayoría de los casos, el estándar de referencia fue el diagnóstico de CHC según los criterios del grupo BCLC. Actualmente, las guías de manejo de CHC recomiendan la radiología no invasiva como procedimiento de diagnóstico de rutina, y la biopsia está reservada para lesiones de

más de 1 cm que tienen características atípicas.⁴¹ Sin embargo, algunos autores aún respaldan el desempeño obligatorio de biopsias de tumores en casos de imágenes negativas para confirmar o excluir el CHC³⁹. En el estudio actual, la metarregresión apoyó la suposición previa. No obstante, ambos biomarcadores y biopsias de tumores son un reto debido a que requieren las pruebas moleculares para ser validados con cuidado para asegurar que el número necesariamente restringido de muestras de tejido puede proporcionar una representación molecular confiable de todo el tumor, debido a que la heterogeneidad molecular intratumoral de los CHC se sabe que ser alto.³⁹

Cuarta, la etiología, el paciente con VHC > 50% y el tamaño de la muestra no mostraron significación estadística en los estudios actuales. Un estudio con 10 años de seguimiento, ha reportado un sistema de puntuación del THRI (Toronto hepatocarcinoma risk Index), en el cual también se indica claramente que la aparición del CHC se diferencia con la etiología.¹²⁹ En la segunda parte de esta tesis, la etiología no tiene significancia estadística porque el tamaño de la cohorte se considera pequeña; sin embargo, un futuro estudio con un gran tamaño de pacientes podría confirmar esta suposición. También, en el presente estudio, la mayoría de los sujetos eran de Italia, que tiene una gran cantidad de pacientes incluidos que sufren hepatitis C, por lo que más estudios deben ser evaluados con pacientes de Asia y África donde el VHB se considera la principal causa de CHC. Actualmente, los estudios hechos en África por Soyemi et al. demostraron que el SCCA solo tiene un AUC de 0,58 con mayor del etiología del VHB.²⁹¹ Un diseño experimental basado en poblaciones multi-país, multi-raza y multi-etilogía es muy necesario para confirmar el valor de los presentes biomarcadores.

Quinto, del estudio realizado con el diseño prospectivo, que muestra un resultado alentador de SCCA-IgM (AUC: 0,8), mayor que el de AFP (AUC: 0,67).³⁰⁵ El presente estudio no dedujo el propio diseño como una covariante significativo debido a que existe un solo estudio prospectivo hasta la fecha. Además, como se ha mencionado anteriormente, a pesar de considerar solo cinco estudios en el grupo SCCA incluido, la metarregresión puede ser engañosa y los resultados deben interpretarse con precaución. SCCA se asemejó en parte a las mismas variantes en el grupo SCCA-IgM que impactan en la heterogeneidad del meta-análisis.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la investigación futura se justifica que incorpora la selección de pacientes de un solo enfoque (enfoque en cada subgrupo del programa de vigilancia para el CHC), estándar de referencia (biopsias para confirmar definitivamente CHC), y un valor de corte basado en poblaciones múltiples, además de estudios prospectivos que reevalúan rigurosamente el rendimiento diagnóstico de SCCA, SCCA-IgM y sus combinaciones con otros biomarcadores.

El carcinoma hepatocelular es un objetivo potencialmente viable para la vigilancia, ya que ocurre en poblaciones de riesgo bien definidas (la cirrosis es un factor de riesgo primario). CHC tiene una fase subclínica prolongada. Más del 20% de los pacientes con cirrosis pueden desarrollar CHC durante un período de 10 años. Durante la fase subclínica, no hay síntomas y el pronóstico mejora si el CHC puede diagnosticarse temprano. El pronóstico del CHC es sombrío. Por lo tanto, el CHC recogido por los programas de vigilancia puede ser tratado a tiempo y la curación es posible.³⁴⁹⁻³⁵²

Mediante el uso de biomarcadores de combinación actuales, permitiremos la asignación racional de los recursos médicos limitados a los pacientes de alto riesgo

que más necesitan ser examinados, y evitaremos la distribución innecesaria de recursos médicos limitados para las personas de bajo riesgo que tenían una tasa del 100% de supervivencia libre de enfermedad. Además, el VPP desordenado que fue influenciado por la baja prevalencia de desarrollo de CHC mediante el uso del programa de vigilancia actual "*one-size-fits-all*", fortalece aún más la necesidad de alterar la vigilancia a un subgrupo de poblaciones de alto riesgo dentro de los pacientes cirróticos que asegurará una alta probabilidad previa a la prueba,³⁵³ puede permitir evitar la ansiedad innecesaria del paciente y del proveedor,³⁴⁵ mientras optimiza la aproximación del riesgo del paciente individualizado. La intensidad de detección actual "talla única" se basa en el tiempo estimado de duplicación del volumen tumoral^{354,355} y una incidencia anualizada de CHC de 1.5% o más haría que la vigilancia sea rentable³⁵⁶. Un estudio multicéntrico demostró que un intervalo de 6 meses resultó en una mayor sensibilidad para la detección de CHC temprano que en un intervalo de 12 meses³⁵⁷; sin embargo, la reducción del intervalo de detección de 6 meses a 3 meses no aumentó la proporción de tumores detectados en una etapa temprana ni tampoco el paciente recibió tratamiento curativo³⁵⁸. Sin embargo, la modificación de la frecuencia de detección de CHC según el riesgo de CHC individual estimado mediante el uso de la presente combinación de biomarcadores puede permitir la detección más eficaz del tumor temprano debido a que los sujetos de alto riesgo tienen más probabilidades de desarrollar CHC, estudios previos^{359,360} en cáncer colorectal y de mama apoyan nuestra suposición. Por otro lado, la combinación propuesta de SCCA-IgM y AFP que clasifica correctamente el 100% de la supervivencia libre de CHC que se definió con el subgrupo de bajo riesgo entre pacientes cirróticos nos permitirá excluir a esos pacientes del programa de vigilancia o extender la intensidad de proyección a dos años. Además, un reciente estudio de

costo-efectividad ha verificado las estrategias de vigilancia de CHC adaptadas de acuerdo con el riesgo estimado de estratificación del paciente que de hecho reveló una relación coste-efectividad superior. La estrategia actual de SCCA-IgM y AFP se debe implementar y verificar más a fondo en el establecimiento clínico a través de un estudio futuro. Además, un kit fácil de usar y basado en pacientes ambulatorios en lugar de en laboratorio optimizará el rendimiento de la combinación de los biomarcadores actuales. En resumen, la presente estrategia de vigilancia adaptada entre los pacientes para estratificar el riesgo de CHC permitirá una asignación más racional de recursos médicos, una intervención preventiva rentable y precisa, que mejorará sustancialmente el pronóstico sombrío del CHC y mantendrá el espíritu de avanzar con el tiempo en la era de la medicina de precisión.

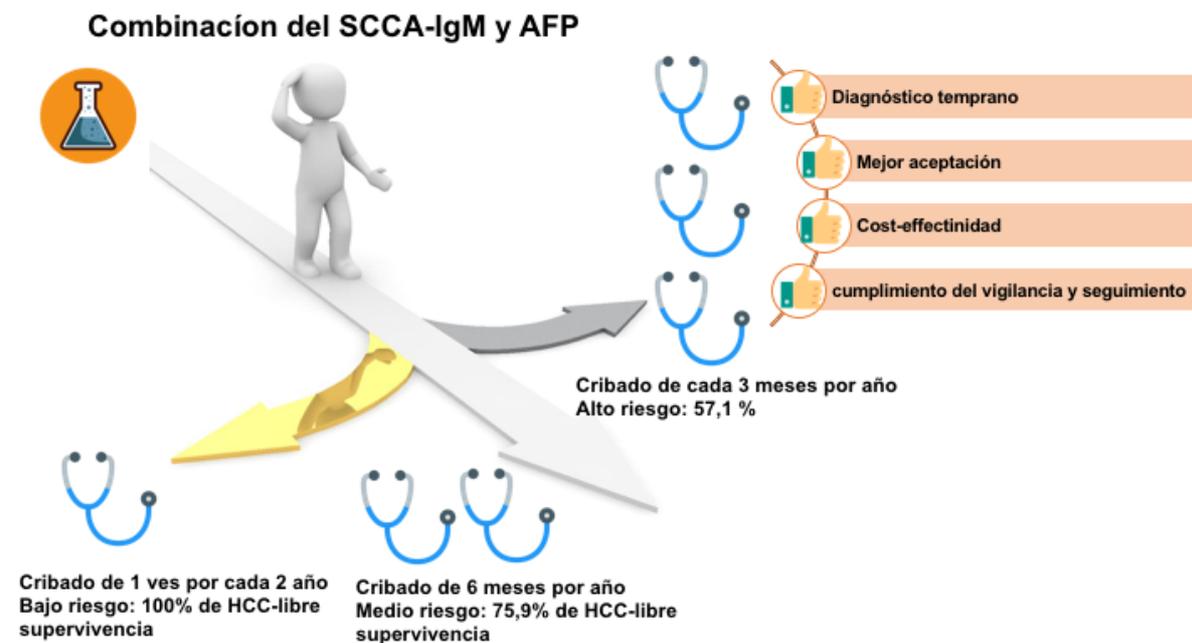


Figura 18. Representación de los tres grupos de pacientes en función del nivel individual de riesgo.

6.4 Limitaciones del estudio

Hubo varias limitaciones por el parte de meta-análisis. En primer lugar, los estudios incluidos contenían un número relativamente pequeño de pacientes. En segundo lugar, la exclusión de los estudios que no son del inglés y la inclusión de estudios retrospectivos con un solo estudio prospectivo pueden haber provocado un sesgo. Solo la inclusión de estudios en inglés podría conducir a mejores resultados porque es más probable que los estudios con resultados positivos sean aceptados por una revista internacional. En tercer lugar, el estudio omitido en el análisis de sensibilidad tuvo el mayor tamaño de muestra del paciente (499 pacientes con CHC y 462 pacientes cirróticos como grupo de control) de cualquier estudio realizado hasta el momento. La combinación de AFP y SCCA no se pudo evaluar debido a que solo existen dos estudios sobre esta combinación. Finalmente, debido a que solo se incluyeron cinco estudios sobre SCCA, el poder de los métodos estadísticos para explorar con precisión las razones de la heterogeneidad observada es limitado.

Por otro parte, nuestra investigación experimental también tiene límites. Primero, la posibilidad de subestimar la tasa de desarrollo de CHC porque la ecografía abdominal se realizó solo cuando los pacientes tenían niveles elevados de AFP. En segundo lugar, la definición de cirrosis no se obtuvo a partir de biopsias hepáticas. Esto puede conducir a una subestimación de la cirrosis subclínica de la población estudiada. Los enfoques de medicina de precisión se basan en información molecular derivada de muestras de biopsia,^{361,362} que es crucial con el diseño de diagnóstico de precisión diagnóstica³³⁹. Sin embargo, la preocupación ética prohibió cierto diseño de estudio para realizar la biopsia debido a que la enfermedad investigada, como CHC y cirrosis, no requiere la biopsia para confirmar de acuerdo con la guía clínica actual con el enfoque tecnológico reciente que características radiológicas típicas en

contraste cruzado imágenes seccionales tienen un valor predictivo positivo de casi el 100%.³⁶³⁻³⁶⁵ En tercer lugar, el sesgo de tiempo de anticipación y el tiempo de longitud fueron siempre una consideración crucial del diseño experimental de precisión diagnóstica . Finalmente, el estudio se realizó retrospectivamente en sueros recolectados prospectivamente. Dado el solo 20% de cumplimiento de la vigilancia de CHC y nuestro principal objetivo es estudiar lo que sucedió entre los diferentes grupos de riesgo en la palabra real, creemos que el diseño actual es la mejor opción.³⁶⁶

7. CONCLUSIONES

Conclusiones

1.- El meta-análisis confirma que tanto SCCA como SCCA-IgM mostraron una precisión diagnóstica moderada para el cribado de CHC.

2.- La combinación de SCCA-IgM y AFP proporciona una mejor precisión diagnóstica para la detección temprana de CHC.

3.-La selección del paciente y la confirmación diagnóstica de CHC mediante biopsia deben considerarse variables de alto impacto en el diseño de futuros experimentos de precisión diagnóstica.

4.- El proyecto de investigación confirmó que la combinación de SCCA-IgM y AFP mejora el valor predictivo para detectar CHC y estratificar el riesgo.

5.- La estratificación de los pacientes por grupos de riesgo de hepaocarcinoma permitirá diseñar un cribado personalizado de forma los criterios de vigilancia
vigilancia de CHC se adaptará a las necesidades individuales de los pacientes.

8. ANEXO

8.1 Leyenda de las figuras.

Figura 1. Etiología de la cirrosis hepática.....	3
Figura 2. Estadios clínicos de cirrosis con diferente pronóstico.....	5
Figura 3. Diagnóstico del CHC.	13
Figura 4. Tratamiento del CHC.	14
Figura 5. Biomarcadores para diagnóstico del CHC.....	30
Figura 6. Aplicaciones de biomarcadores de CHC establecidos y novedosos en atención clínica.....	31
Figura 7. Los estudios del SCCA y SCCA-IgM.	52
Figura 8. Proceso del usar ELISA para SCCA-IgM.....	78
Figura 9. Diagrama de flujo de la selección de artículos.	85
Figura 10. Curva HSROC del rendimiento diagnóstico para CHC de (A) SCCA-IgM, (B) SCCA y (C) la combinación de SCCA-IgM y AFP. Gráfico de caja bivalente para estimar la variabilidad umbral entre la sensibilidad y la especificidad para (D) SCCA-IgM, (E) SCCA y (F) la combinación de SCCA-IgM y AFP. HSROC = característica operativa del receptor de resumen jerárquico; PLR = razón de probabilidad positiva; NLR = razón de verosimilitud negativa; DOR = odds ratio de diagnóstico; AUC = área debajo de la curva.....	91
Figura 11. Análisis del nomograma de Fagan que evalúa la utilidad clínica de SCCA- IgM, SCCA y la combinación de SCCA-IgM y AFP para el diagnóstico de CHC de acuerdo con diferentes probabilidades previas a la prueba (previas). SCCA- IgM: A) probabilidad de prueba previa = 25%; B) probabilidad de prueba previa = 50%; C) probabilidad de prueba previa = 75%. SCCA: D) probabilidad de prueba previa = 25%; E) probabilidad de prueba previa = 50%; F) probabilidad de	

prueba previa = 75%. Combinación de SCCA-IgM y AFP: G) probabilidad de prueba previa = 25%; H) probabilidad de prueba previa = 50%; I) probabilidad de prueba previa = 75%. Prob anterior = probabilidad de prueba previa; LR_Positive = razón de probabilidad positiva; Post_Prob_Pos = probabilidad positiva posterior a la prueba; LR_Negativo = razón de verosimilitud negativa; Post_Prob_Neg = probabilidad negativa posterior a la prueba. 94

Figura 12. Metarregresión univariada y análisis de subgrupos del rendimiento diagnóstico de (A) SCCA-IgM y (B) SCCA para detectar CHC. Selección de pacientes sí = solo pacientes con cirrosis incluidos como control, no pacientes con hepatitis o donantes sanos; corte sí = SCCA-IgM: 100 AU / mL <corte <200 UA / mL y SCCA: corte <1 ng / mL; dominante masculino = proporción masculina > 65%. 95

Figura 13. Los diagramas de embudo de Deeks que evalúan el posible sesgo de publicación en la detección de CHC con (A) SCCA-IgM y (B) SCCA. 96

Figura 14. Curvas características operativas del receptor de la combinación de SCCA-IgM y AFP en comparación con SCCA y AFP para predecir la CHC-libre de dos años en la cohorte de estimación. 102

Figura 15. Estimación de la supervivencia libre de enfermedad del carcinoma hepatocelular de dos y cinco años mediante el método de Kaplan-Meier según el SCCA-IgM, la AFP y la combinación de ambos en la cohorte de estimación... 103

Figura 16. Estimación de la supervivencia libre de enfermedad del carcinoma hepatocelular de dos y cinco años mediante el método de Kaplan-Meier según el SCCA-IgM, la AFP y la combinación de ambos en la cohorte de estimación... 105

Figura 17. Implicaciones del futuro diseño del experimento de precisión de diagnóstico..... 113

Figura 18. Representación de los tres grupos de pacientes en función del nivel individual de riesgo..... 118

8.2 Leyenda de las tablas

Tabla 1. La puntuación de Child-Pugh (5-15 puntos) es el resultado de la suma de la puntuación de cada una de las 5 variables. De esa forma se determina: Child A: 5-6 puntos; mortalidad 0% a 1 año y 15% a los 2 años; Child B: 7-9 puntos; mortalidad 20% a 1 año y 40% a los 2 años; Child C: 10-15 puntos; mortalidad 55% a 1 año y 65% a los 2 años).....	6
Tabla 2. Índices del MELD = $9,57 \ln(\text{creat, mg/dl}) + 3,78 \ln(\text{Bil, mg/dl}) + 11,2 \ln(\text{INR}) + 6,43$. Datos tomados de Wiesmar R.....	6
Tabla 3. Vigilancia del CHC.....	10
Tabla 4. Factores del riesgo del CHC.	18
Tabla 5. Propuestas de investigación futura.....	28
Tabla 6. Variables por 2x2 tabla.	69
Tabla 7. Definición y cálculo de la precisión diagnóstica de las variables experimentales.	71
Tabla 8. Recomendaciones para la vigilancia del CHC: categorías de pacientes adultos en los que se recomienda la vigilancia.	74
Tabla 9. Las características de los estudios elegibles.	88
Tabla 10. Evaluación de calidad según los criterios QUADAS-2.....	89
Tabla 11. Características de la población incluida.....	98
Tabla 12. Factores asociados con CHC por la regresión de riesgos proporcionales de Cox.....	100
Tabla 13. Características de funcionamiento para la combinación de SCCA-IgM y AFP con respecto a la supervivencia sin enfermedad del carcinoma hepatocelular de dos y cinco años.	106

9. REFERENCIAS

1. Buey LG, Mateos FG, Moreno-Otero R. Cirrosis hepática. *Medicine-Programa de formación médica continuada acreditado* 2012; 11: 625-33.
2. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 2013; 58: 593-608.
3. Lefton HB, Rosa A, Cohen M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. *Med Clin North Am* 2009; 93: 787-99, vii.
4. Hatzakis A, Wait S, Bruix J, et al. The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference*. *J Viral Hepat* 2011; 18 Suppl 1: 1-16.
5. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014; 383: 1749-61.
6. Cequera A, Garcia de Leon Mendez MC. [Biomarkers for liver fibrosis: advances, advantages and disadvantages]. *Rev Gastroenterol Mex* 2014; 79: 187-99.
7. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518-26.
8. Benvegna L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut* 2004; 53: 744-9.
9. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006; 44: 217-31.

10. Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *J Hepatol* 2005; 42 Suppl: S100-7.
11. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003; 124: 91-6.
12. Kanwal F, Kramer J, Asch SM, et al. An explicit quality indicator set for measurement of quality of care in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 709-17.
13. Kanwal F, Schnitzler MS, Bacon BR, Hoang T, Buchanan PM, Asch SM. Quality of care in patients with chronic hepatitis C virus infection: a cohort study. *Ann Intern Med* 2010; 153: 231-9.
14. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
15. European Association For The Study Of The L, European Organisation For R, Treatment Of C. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 56: 908-43.
16. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-917.
17. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 25-34.
18. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: E359-86.

19. Llovet JM, Bustamante J, Castells A, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999; 29: 62-7.
20. Collier J, Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 27: 273-8.
21. Davila JA, Weston A, Smalley W, El-Serag HB. Utilization of screening for hepatocellular carcinoma in the United States. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 777-82.
22. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012; 142: 1264-73 e1.
23. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16018.
24. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-17.
25. Solmi L, Primerano AM, Gandolfi L. Ultrasound follow-up of patients at risk for hepatocellular carcinoma: results of a prospective study on 360 cases. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1189-94.
26. Daniele B, Bencivenga A, Megna AS, Tinessa V. Alpha-fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S108-12.
27. Farinati F, Marino D, De Giorgio M, et al. Diagnostic and prognostic role of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: both or neither? *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 524-32.
28. Zhang B, Yang B. Combined alpha fetoprotein testing and ultrasonography as a screening test for primary liver cancer. *J Med Screen* 1999; 6: 108-10.

29. Zhao C, Nguyen MH. Hepatocellular Carcinoma Screening and Surveillance: Practice Guidelines and Real-Life Practice. *J Clin Gastroenterol* 2016; 50: 120-33.
30. Naimark D, Naglie G, Detsky AS. The meaning of life expectancy: what is a clinically significant gain? *J Gen Intern Med* 1994; 9: 702-7.
31. Laupacis A, Feeny D, Detsky AS, Tugwell PX. How attractive does a new technology have to be to warrant adoption and utilization? Tentative guidelines for using clinical and economic evaluations. *Cmaj* 1992; 146: 473-81.
32. Oka H, Saito A, Ito K, et al. Multicenter prospective analysis of newly diagnosed hepatocellular carcinoma with respect to the percentage of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1378-83.
33. Amarapurkar D, Han KH, Chan HL, Ueno Y. Application of surveillance programs for hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific Region. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 955-61.
34. Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2016; 150: 835-53.
35. Omata M, Lesmana LA, Tateishi R, et al. Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus recommendations on hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 2010; 4: 439-74.
36. Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver D. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011; 53: 1020-2.
37. Saffroy R, Pham P, Reffas M, Takka M, Lemoine A, Debuire B. New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1169-79.

38. Makuuchi M, Kokudo N, Arii S, et al. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res* 2008; 38: 37-51.
39. Dhanasekaran R, Venkatesh SK, Torbenson MS, Roberts LR. Clinical implications of basic research in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016; 64: 736-45.
40. Torbenson M, Schirmacher P. Liver cancer biopsy--back to the future?! *Hepatology* 2015; 61: 431-3.
41. Forner A, Vilana R, Ayuso C, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 97-104.
42. Leoni S, Piscaglia F, Golfieri R, et al. The impact of vascular and nonvascular findings on the noninvasive diagnosis of small hepatocellular carcinoma based on the EASL and AASLD criteria. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 599-609.
43. Danila M, Sporea I, Sirli R, Popescu A, Sendroiu M, Martie A. The role of contrast enhanced ultrasound (CEUS) in the assessment of liver nodules in patients with cirrhosis. *Med Ultrason* 2010; 12: 145-9.
44. Singal A, Volk ML, Waljee A, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 37-47.
45. Singal AG, Conjeevaram HS, Volk ML, et al. Effectiveness of hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21: 793-9.
46. Kim DY, Han KH. Epidemiology and surveillance of hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer* 2012; 1: 2-14.

47. Llovet JM, Bruix J. Early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000; 14: 991-1008.
48. Bruix J, Castells A, Bosch J, et al. Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure. *Gastroenterology* 1996; 111: 1018-22.
49. Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, et al. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* 2003; 38: 200-7.
50. Cherqui D. Laparoscopic liver resection: A new paradigm in the management of hepatocellular carcinoma? *J Hepatol* 2015; 63: 540-2.
51. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-9.
52. Machicao VI. Model for End-Stage Liver Disease-Sodium Score: The Evolution in the Prioritization of Liver Transplantation. *Clin Liver Dis* 2017; 21: 275-87.
53. Wang P, Li H, Shi B, et al. Prognostic factors in patients with recurrent hepatocellular carcinoma treated with salvage liver transplantation: a single-center study. *Oncotarget* 2016; 7: 35071-83.
54. Lencioni R, Crocetti L. Image-guided ablation for hepatocellular carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2013; 190: 181-94.
55. Cho YK, Kim JK, Kim MY, Rhim H, Han JK. Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies. *Hepatology* 2009; 49: 453-9.

56. Shiina S, Tateishi R, Arano T, et al. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 569-77; quiz 78.
57. Malek NP, Schmidt S, Huber P, Manns MP, Greten TF. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 2014; 111: 101-6.
58. Lin CT, Hsu KF, Chen TW, et al. Comparing hepatic resection and transarterial chemoembolization for Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) stage B hepatocellular carcinoma: change for treatment of choice? *World J Surg* 2010; 34: 2155-61.
59. Yin L, Li H, Li AJ, et al. Partial hepatectomy vs. transcatheter arterial chemoembolization for resectable multiple hepatocellular carcinoma beyond Milan Criteria: a RCT. *J Hepatol* 2014; 61: 82-8.
60. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001; 33: 1394-403.
61. Salem R, Lewandowski RJ, Gates VL, et al. Research reporting standards for radioembolization of hepatic malignancies. *J Vasc Interv Radiol* 2011; 22: 265-78.
62. Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S179-88.
63. Kudo M, Han G, Finn RS, et al. Brivanib as adjuvant therapy to transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma: A randomized phase III trial. *Hepatology* 2014; 60: 1697-707.
64. Burrel M, Reig M, Forner A, et al. Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolisation (TACE) using Drug Eluting Beads. Implications for clinical practice and trial design. *J Hepatol* 2012; 56: 1330-5.

65. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-90.
66. Llovet JM, Villanueva A, Lachenmayer A, Finn RS. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12: 408-24.
67. Forner A, Ayuso C, Isabel Real M, et al. [Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma]. *Med Clin (Barc)* 2009; 132: 272-87.
68. el-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 87-107, vi.
69. Parikh S, Hyman D. Hepatocellular cancer: a guide for the internist. *Am J Med* 2007; 120: 194-202.
70. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 2007; 317: 121-4.
71. Feng H, Cheng AS, Tsang DP, et al. Cell cycle-related kinase is a direct androgen receptor-regulated gene that drives beta-catenin/T cell factor-dependent hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 2011; 121: 3159-75.
72. Fernandez E, La Vecchia C, D'Avanzo B, Negri E, Franceschi S. Family history and the risk of liver, gallbladder, and pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 209-12.
73. Sung WK, Zheng H, Li S, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012; 44: 765-9.
74. Chan KC, Jiang P, Chan CW, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 18761-8.

75. Chen CL, Yang HI, Yang WS, et al. Metabolic factors and risk of hepatocellular carcinoma by chronic hepatitis B/C infection: a follow-up study in Taiwan. *Gastroenterology* 2008; 135: 111-21.
76. Wong GL, Wong VW, Choi PC, et al. Metabolic syndrome increases the risk of liver cirrhosis in chronic hepatitis B. *Gut* 2009; 58: 111-7.
77. Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, et al. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35: 1485-93.
78. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348: 1625-38.
79. Marrero JA, Fontana RJ, Fu S, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 42: 218-24.
80. Trichopoulos D, Bamia C, Lagiou P, et al. Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 1686-95.
81. Tanioka H, Omagari K, Kato Y, et al. Present status of hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma in Nagasaki Prefecture, Japan: a cross-sectional study of 1019 patients. *J Infect Chemother* 2002; 8: 64-9.
82. Ioannou GN, Splan MF, Weiss NS, McDonald GB, Beretta L, Lee SP. Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 938-45, 45 e1-4.
83. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127: S35-50.

84. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 3-16.
85. Lai CL, Yuen MF. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma with antiviral therapy. *Hepatology* 2013; 57: 399-408.
86. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-38.
87. Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1521-31.
88. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al. Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2013; 58: 98-107.
89. Wong GL, Chan HL, Mak CW, et al. Entecavir treatment reduces hepatic events and deaths in chronic hepatitis B patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2013; 58: 1537-47.
90. Franceschi S, Raza SA. Epidemiology and prevention of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2009; 286: 5-8.
91. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347: 168-74.
92. Wong VW, Sung JJ. Diagnosis and personalized management of hepatitis B including significance of genotypes. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25: 570-7.
93. Chan HL, Wong GL, Tse CH, et al. Hepatitis B virus genotype C is associated with more severe liver fibrosis than genotype B. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 1361-6.

94. Chan HL, Hui AY, Wong ML, et al. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53: 1494-8.
95. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 265-72.
96. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1134-43.
97. Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36: 1206-13.
98. Rodríguez Montes JAd, Franco López Ad, de Madrid Departamento de Medicina UA. Terapia combinada mediante radiofrecuencia y quimioembolización en el carcinoma hepatocelular. 2011.
99. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009; 13: 511-31.
100. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012; 142: 1592-609.
101. Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annu Rev Med* 2016; 67: 103-17.
102. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007; 132: 2169-80.

103. Seitz HK, Stickel F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol Chem* 2006; 387: 349-60.
104. Inoue M, Iwasaki M, Otani T, Sasazuki S, Noda M, Tsugane S. Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1871-7.
105. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 460-8.
106. Donadon V, Balbi M, Mas MD, Casarin P, Zanette G. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients with chronic liver disease. *Liver Int* 2010; 30: 750-8.
107. Lai SW, Chen PC, Liao KF, Muo CH, Lin CC, Sung FC. Risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients and risk reduction associated with anti-diabetic therapy: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 46-52.
108. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011; 365: 1118-27.
109. Chemin I, Zoulim F. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2009; 286: 52-9.
110. Wu CF, Yu MW, Lin CL, et al. Long-term tracking of hepatitis B viral load and the relationship with risk for hepatocellular carcinoma in men. *Carcinogenesis* 2008; 29: 106-12.
111. Yuen MF, Tanaka Y, Fong DY, et al. Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50: 80-8.
112. Han KH, Ahn SH. How to predict HCC development in patients with chronic B viral liver disease? *Intervirology* 2005; 48: 23-8.

113. Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73.
114. Mok TS, Yeo W, Yu S, et al. An intensive surveillance program detected a high incidence of hepatocellular carcinoma among hepatitis B virus carriers with abnormal alpha-fetoprotein levels or abdominal ultrasonography results. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8041-7.
115. Chan HL, Tse CH, Mo F, et al. High viral load and hepatitis B virus subgenotype ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 177-82.
116. Wong VW, Janssen HL. Can we use HCC risk scores to individualize surveillance in chronic hepatitis B infection? *J Hepatol* 2015; 63: 722-32.
117. Sherman M, Colombo M. Hepatocellular carcinoma screening and diagnosis. *Semin Liver Dis* 2014; 34: 389-97.
118. Yang HI, Sherman M, Su J, et al. Nomograms for risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2437-44.
119. Yang HI, Yuen MF, Chan HL, et al. Risk estimation for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B (REACH-B): development and validation of a predictive score. *Lancet Oncol* 2011; 12: 568-74.
120. Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, et al. High levels of hepatitis B surface antigen increase risk of hepatocellular carcinoma in patients with low HBV load. *Gastroenterology* 2012; 142: 1140-9.e3; quiz e13-4.
121. Kim DY, Song KJ, Kim SU, et al. Transient elastography-based risk estimation of hepatitis B virus-related occurrence of hepatocellular carcinoma: development and validation of a predictive model. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 1463-9.

122. Wong GL, Chan HL, Wong CK, et al. Liver stiffness-based optimization of hepatocellular carcinoma risk score in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2014; 60: 339-45.
123. Hung YC, Lin CL, Liu CJ, et al. Development of risk scoring system for stratifying population for hepatocellular carcinoma screening. *Hepatology* 2015; 61: 1934-44.
124. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology* 2009; 136: 138-48.
125. Jepsen P, Ott P, Andersen PK, Sorensen HT, Vilstrup H. Risk for hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis: a Danish nationwide cohort study. *Ann Intern Med* 2012; 156: 841-7, W295.
126. Gronbaek L, Vilstrup H, Jepsen P. Autoimmune hepatitis in Denmark: incidence, prevalence, prognosis, and causes of death. A nationwide registry-based cohort study. *J Hepatol* 2014; 60: 612-7.
127. Caballeria L, Pares A, Castells A, Gines A, Bru C, Rodes J. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: similar incidence to that in hepatitis C virus-related cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1160-3.
128. Wen CP, Lin J, Yang YC, et al. Hepatocellular carcinoma risk prediction model for the general population: the predictive power of transaminases. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 1599-611.
129. Sharma SA, Kowgier M, Hansen BE, et al. Toronto HCC Risk Index: A validated scoring system to predict 10-year risk of HCC in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2017.

130. Jilani S, Prystupa A, Krakowski P, Załuska W, Mosiewicz J. A clinical guide to tumour markers categorized under cancer types—A review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879: 573-8.
131. Hussein TD. Evaluation Of Serological Tumor Markers-A Review. *rpublication.com*.
132. Malaguarnera G, Giordano M, Paladina I, Berretta M, Cappellani A, Malaguarnera M. Serum markers of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2744-55.
133. Chen Z, Ren X, Meng X, Zhang Y, Chen D, Tang F. Novel fluorescence method for detection of alpha-L-fucosidase based on CdTe quantum dots. *Anal Chem* 2012; 84: 4077-82.
134. Nilsson B. Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Opin Immunol* 1989; 2: 898-904.
135. Othman AM, El-Houseini ME, El-Sofy MS, Aboul-Enein HY. Potentiometric determination of alpha-L-fucosidase enzyme by using 2-chloro-4-nitrophenol-rhodamine B ion pair chemical recognition in PVC membrane sensor. *Anal Bioanal Chem* 2011; 400: 787-95.
136. Berretta M, Cavaliere C, Alessandrini L, et al. Serum and tissue markers in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: clinical and prognostic implications. *Oncotarget* 2017; 8: 14192-220.
137. Chaiteerakij R, Addissie BD, Roberts LR. Update on biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 237-45.
138. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1054-61.

139. IuS T. [Detection of Embryo-Specific Alpha-Globulin in the Blood Serum of a Patient with Primary Liver Cancer]. *Vopr Med Khim* 1964; 10: 90-1.
140. Gitlin D, Perricelli A, Gitlin JD. The presence of serum alpha-fetoprotein in sharks and its synthesis by fetal gastrointestinal tract and liver. *Comp Biochem Physiol B* 1973; 46: 207-15.
141. Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 417-22.
142. Nomura F, Ishijima M, Kuwa K, Tanaka N, Nakai T, Ohnishi K. Serum des-gamma-carboxy prothrombin levels determined by a new generation of sensitive immunoassays in patients with small-sized hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 650-4.
143. Cedrone A, Covino M, Caturelli E, et al. Utility of alpha-fetoprotein (AFP) in the screening of patients with virus-related chronic liver disease: does different viral etiology influence AFP levels in HCC? A study in 350 western patients. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1654-8.
144. Marrero JA, Feng Z. Alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2010; 138: 400-1.
145. Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, et al. AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC. *J Gastroenterol* 2010; 45: 1272-82.
146. Sherman M, Peltekian KM, Lee C. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* 1995; 22: 432-8.

147. Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol* 2001; 34: 570-5.
148. Kim JU, Shariff MI, Crossey MM, et al. Hepatocellular carcinoma: Review of disease and tumor biomarkers. *World J Hepatol* 2016; 8: 471-84.
149. Gupta S, Bent S, Kohlwes J. Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis. *Ann Intern Med* 2003; 139: 46-50.
150. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 513-23.
151. Nobuoka D, Kato Y, Gotohda N, et al. Postoperative serum alpha-fetoprotein level is a useful predictor of recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2010; 24: 521-8.
152. Barletta E, Tinessa V, Daniele B. [Screening of hepatocellular carcinoma: role of the alpha-fetoprotein (AFP) and ultrasonography]. *Recenti Prog Med* 2005; 96: 295-9; quiz 328.
153. Marrero JA. Screening tests for hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 235-51, vi.
154. Zoli M, Magalotti D, Bianchi G, Gueli C, Marchesini G, Pisi E. Efficacy of a surveillance program for early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer-Am Cancer Soc* 1996; 78: 977-85.
155. Lok AS, Sterling RK, Everhart JE, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2010; 138: 493-502.

156. Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, Saito K, Uemura Y, Nakatsura T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 10573-83.
157. Zhao YJ, Ju Q, Li GC. Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol* 2013; 1: 593-8.
158. Kang JY, Lee TP, Yap I, Lun KC. Analysis of cost-effectiveness of different strategies for hepatocellular carcinoma screening in hepatitis B virus carriers. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7: 463-8.
159. Poon D, Anderson BO, Chen LT, et al. Management of hepatocellular carcinoma in Asia: consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009. *Lancet Oncol* 2009; 10: 1111-8.
160. Lee E, Edward S, Singal AG, Lavieri MS, Volk M. Improving screening for hepatocellular carcinoma by incorporating data on levels of alpha-fetoprotein, over time. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11: 437-40.
161. Singhal A, Jayaraman M, Dhanasekaran DN, Kohli V. Molecular and serum markers in hepatocellular carcinoma: predictive tools for prognosis and recurrence. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012; 82: 116-40.
162. Aoyagi Y, Suzuki Y, Isemura M, et al. The fucosylation index of alpha-fetoprotein and its usefulness in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer-Am Cancer Soc* 1988; 61: 769-74.
163. Taketa K. Alpha-fetoprotein: reevaluation in hepatology. *Hepatology* 1990; 12: 1420-32.
164. Sterling RK, Jeffers L, Gordon F, et al. Utility of Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin, alone or

in combination, as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 104-13.

165. Marrero JA, Feng Z, Wang Y, et al. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2009; 137: 110-8.

166. Hayashi K, Kumada T, Nakano S, et al. Usefulness of measurement of Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein as a marker of prognosis and recurrence of small hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3028-33.

167. Kumada T, Toyoda H, Tada T, et al. High-sensitivity Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein assay predicts early detection of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2014; 49: 555-63.

168. Toyoda H, Kumada T, Tada T. Highly sensitive Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein: a new tool for the management of hepatocellular carcinoma. *Oncology-Basel* 2011; 81 Suppl 1: 61-5.

169. Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology-Basel* 2002; 62 Suppl 1: 57-63.

170. Suehiro T, Sugimachi K, Matsumata T, Itasaka H, Taketomi A, Maeda T. Protein induced by vitamin K absence or antagonist II as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. Comparison with alpha-fetoprotein. *Cancer-Am Cancer Soc* 1994; 73: 2464-71.

171. Toyosaka A, Okamoto E, Mitsunobu M, Oriyama T, Nakao N, Miura K. Intrahepatic metastases in hepatocellular carcinoma: evidence for spread via the portal vein as an efferent vessel. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1610-5.

172. Shakado S, Sakisaka S, Chayama K, et al. Alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy-prothrombin at twenty-four weeks after interferon-based therapy predict hepatocellular carcinoma development. *World J Hepatol* 2015; 7: 2757-64.
173. Nakamura S, Nouse K, Sakaguchi K, et al. Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2038-43.
174. Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, et al. Significance of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 2795-804.
175. Xu J, Li D, Li X, et al. 67 laminin receptor promotes the malignant potential of tumour cells up-regulating lysyl oxidase-like 2 expression in cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis* 2014; 46: 750-7.
176. Pote N, Cauchy F, Albuquerque M, et al. Performance of PIVKA-II for early hepatocellular carcinoma diagnosis and prediction of microvascular invasion. *J Hepatol* 2015; 62: 848-54.
177. Shevde LA, Das S, Clark DW, Samant RS. Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis. *Curr Mol Med* 2010; 10: 71-81.
178. Zhu Y, Denhardt DT, Cao H, et al. Hypoxia upregulates osteopontin expression in NIH-3T3 cells via a Ras-activated enhancer. *Oncogene* 2005; 24: 6555-63.
179. Shang S, Plymoth A, Ge S, et al. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; 55: 483-90.
180. Irita J, Okura T, Jotoku M, et al. Osteopontin deficiency protects against aldosterone-induced inflammation, oxidative stress, and interstitial fibrosis in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301: F833-44.

181. Kawashima R, Mochida S, Matsui A, et al. Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 527-31.
182. Kim KA, Lee JS, Jung ES, et al. [Usefulness of serum alpha-fetoprotein (AFP) as a marker for hepatocellular carcinoma (HCC) in hepatitis C virus related cirrhosis: analysis of the factors influencing AFP elevation without HCC development]. *Korean J Gastroenterol* 2006; 48: 321-6.
183. Khodavirdi AC, Song Z, Yang S, et al. Increased expression of osteopontin contributes to the progression of prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 883-8.
184. Wan HG, Xu H, Gu YM, Wang H, Xu W, Zu MH. Comparison osteopontin vs AFP for the diagnosis of HCC: a meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014; 38: 706-14.
185. el-Houseini ME, Mohammed MS, Elshemey WM, Hussein TD, Desouky OS, Elsayed AA. Enhanced detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Control* 2005; 12: 248-53.
186. Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res* 1997; 57: 5179-84.
187. Filmus J, Capurro M. The role of glypican-3 in the regulation of body size and cancer. *Cell Cycle* 2008; 7: 2787-90.
188. Zhu ZW, Friess H, Wang L, et al. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut* 2001; 48: 558-64.

189. Haruyama Y, Kataoka H. Glypican-3 is a prognostic factor and an immunotherapeutic target in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 275-83.
190. AlSalloom AA. An update of biochemical markers of hepatocellular carcinoma. *Int J Health Sci (Qassim)* 2016; 10: 121-36.
191. Tangkijvanich P, Tosukhowong P, Bunyongyod P, et al. Alpha-L-fucosidase as a serum marker of hepatocellular carcinoma in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30: 110-4.
192. Jia X, Liu J, Gao Y, Huang Y, Du Z. Diagnosis accuracy of serum glypican-3 in patients with hepatocellular carcinoma: a systematic review with meta-analysis. *Arch Med Res* 2014; 45: 580-8.
193. Kladney RD, Bulla GA, Guo L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection. *Gene* 2000; 249: 53-65.
194. Kladney RD, Cui X, Bulla GA, Brunt EM, Fimmel CJ. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease. *Hepatology* 2002; 35: 1431-40.
195. Broker ME, Ijzermans JN, Witjes CD, van Vuuren HJ, de Man RA. The predictive value of Golgi protein 73 in differentiating benign from malignant liver tumors. *Plos One* 2014; 9: e100187.
196. Block TM, Comunale MA, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 779-84.
197. Kristiansen G, Fritzsche FR, Wassermann K, et al. GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics. *Br J Cancer* 2008; 99: 939-48.

198. Mao YL, Yang HY, Xu HF, et al. [Significance of Golgi glycoprotein 73, a new tumor marker in diagnosis of hepatocellular carcinoma: a primary study]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008; 88: 948-51.
199. Riener MO, Stenner F, Liewen H, Hellerbrand C, Bahra M, Kristiansen G. Alpha-fetoprotein and serum golgi phosphoprotein 2 are equally discriminative in detecting early hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2009; 50: 326.
200. Xu WJ, Guo BL, Han YG, Shi L, Ma WS. Diagnostic value of alpha-fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 in hepatocellular carcinomas with low AFP levels. *Tumour Biol* 2014; 35: 12069-74.
201. Ishizuka H, Nakayama T, Matsuoka S, et al. Prediction of the development of hepato-cellular-carcinoma in patients with liver cirrhosis by the serial determinations of serum alpha-L-fucosidase activity. *Intern Med* 1999; 38: 927-31.
202. Mossad NA, Mahmoud EH, Osman EA, Mahmoud SH, Shousha HI. Evaluation of squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complex (SCCA-IGM) and alpha-L-fucosidase (AFU) as novel diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2014; 35: 11559-64.
203. Hussein MM, Ibrahim AA, Abdella HM, Montasser IF, Hassan MI. Evaluation of serum squamous cell carcinoma antigen as a novel biomarker for diagnosis of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Indian J Cancer* 2008; 45: 167-72.
204. Cottone M, Turri M, Caltagirone M, et al. Screening for hepatocellular carcinoma in patients with Child's A cirrhosis: an 8-year prospective study by ultrasound and alphafetoprotein. *J Hepatol* 1994; 21: 1029-34.
205. Haydon GH, Hayes PC. Screening for hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 856-60.

206. Deugnier Y, David V, Brissot P, et al. Serum alpha-L-fucosidase: a new marker for the diagnosis of primary hepatic carcinoma? *Hepatology* 1984; 4: 889-92.
207. Leray G, Deugnier Y, Jouanolle AM, et al. Biochemical aspects of alpha-L-fucosidase in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1989; 9: 249-52.
208. Giardina MG, Matarazzo M, Varriale A, Morante R, Napoli A, Martino R. Serum alpha-L-fucosidase. A useful marker in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer-Am Cancer Soc* 1992; 70: 1044-8.
209. Fawzy Montaser M, Amin Sakr M, Omar Khalifa M. Alpha-L-fucosidase as a tumour marker of hepatocellular carcinoma. *Arab J Gastroenterol* 2012; 13: 9-13.
210. Yi X, Yu S, Bao Y. Alpha-fetoprotein-L3 in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2013; 425: 212-20.
211. Bertino G, Ardiri A, Malaguarnera M, Malaguarnera G, Bertino N, Calvagno GS. Hepatocellular carcinoma serum markers. *Semin Oncol* 2012; 39: 410-33.
212. Daito K, Suou T, Kawasaki H. Clinical significance of serum and urinary neopterin levels in patients with various liver diseases. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 471-6.
213. Reibnegger G, Fuchs D, Fuith LC, et al. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in malignant disease. *Cancer Detect Prev* 1991; 15: 483-90.
214. Cui R, He J, Zhang F, et al. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKAlI) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma markers complementary to alpha-fetoprotein. *Br J Cancer* 2003; 88: 1878-82.
215. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 2003; 116: 217-24.

216. Ko TC, Yu W, Sakai T, et al. TGF-beta1 effects on proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression. *Oncogene* 1998; 16: 3445-54.
217. Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Li XQ, et al. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* 1998; 17: 2313-22.
218. Seewaldt VL, Kim JH, Parker MB, Dietze EC, Srinivasan KV, Caldwell LE. Dysregulated expression of cyclin D1 in normal human mammary epithelial cells inhibits all-trans-retinoic acid-mediated G0/G1-phase arrest and differentiation in vitro. *Exp Cell Res* 1999; 249: 70-85.
219. Chuang LY, Tsai JH, Yeh YC, et al. Epidermal growth factor-related transforming growth factors in the urine of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1991; 13: 1112-6.
220. Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, et al. Clinical evaluation of urinary transforming growth factor-beta1 and serum alpha-fetoprotein as tumour markers of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1997; 75: 1460-6.
221. Song BC, Chung YH, Kim JA, et al. Transforming growth factor-beta1 as a useful serologic marker of small hepatocellular carcinoma. *Cancer-Am Cancer Soc* 2002; 94: 175-80.
222. Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 663-8.
223. Li XM, Tang ZY, Qin LX, Zhou J, Sun HC. Serum vascular endothelial growth factor is a predictor of invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18: 511-7.

224. Mise M, Aii S, Higashitaji H, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor. *Hepatology* 1996; 23: 455-64.
225. Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3004-9.
226. Yvamoto EY, Ferreira RF, Nogueira V, et al. Influence of vascular endothelial growth factor and alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma. *Genet Mol Res* 2015; 14: 17453-62.
227. Xiang ZL, Zeng ZC, Fan J, Tang ZY, Zeng HY, Gao DM. Gene expression profiling of fixed tissues identified hypoxia-inducible factor-1alpha, VEGF, and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of lymph node metastasis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 5463-72.
228. Cao G, Li X, Qin C, Li J. Prognostic Value of VEGF in Hepatocellular Carcinoma Patients Treated with Sorafenib: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit* 2015; 21: 3144-51.
229. Zhi H, Zhan J, Deng QL, Huang ZM. [Postoperative detection of AFP mRNA in the peripheral blood of hepatic cellular carcinoma patients and its correlation with recurrence]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2007; 29: 112-5.
230. Guan Q, Gu J, Zhang H, Ren W, Ji W, Fan Y. Correlation between vascular endothelial growth factor levels and prognosis of hepatocellular carcinoma patients receiving radiofrequency ablation. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2015; 29: 119-23.
231. Ferracin M, Veronese A, Negrini M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10: 297-308.

232. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* 2002; 21: 4663-70.
233. Chen Z, Ma T, Huang C, Hu T, Li J. The pivotal role of microRNA-155 in the control of cancer. *J Cell Physiol* 2014; 229: 545-50.
234. Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 56: 167-75.
235. Mirzaei HR, Sahebkar A, Mohammadi M, et al. Circulating microRNAs in Hepatocellular Carcinoma: Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *Curr Pharm Des* 2016; 22: 5257-69.
236. Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 51: 836-45.
237. Hou J, Lin L, Zhou W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2011; 19: 232-43.
238. Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4781-8.
239. Gao Y, He Y, Ding J, et al. An insertion/deletion polymorphism at miRNA-122-binding site in the interleukin-1alpha 3' untranslated region confers risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2009; 30: 2064-9.
240. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-61.

241. Liu S, Ma L, Huang W, et al. Decreased expression of the human carbonyl reductase 2 gene HCR2 in hepatocellular carcinoma. *Cell Mol Biol Lett* 2006; 11: 230-41.
242. Nakamura T. Hepatocyte growth factor as mitogen, motogen and morphogen, and its roles in organ regeneration. *Princess Takamatsu Symp* 1994; 24: 195-213.
243. Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 404-10.
244. Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3787-800.
245. Firtina Karagonlar Z, Koc D, Iscan E, Erdal E, Atabey N. Elevated hepatocyte growth factor expression as an autocrine c-Met activation mechanism in acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci* 2016; 107: 407-16.
246. Mizuguchi T, Katsuramaki T, Nobuoka T, et al. Serum hyaluronate level for predicting subclinical liver dysfunction after hepatectomy. *World J Surg* 2004; 28: 971-6.
247. Wu FS, Zheng SS, Wu LJ, et al. [Study on the prognostic value of hepatocyte growth factor and c-met for patients with hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2006; 44: 603-8.
248. Zhang Y, Deng ZS, Liao MM, et al. Tumor associated glycoprotein-72 is a novel marker for poor survival in hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2012; 18: 911-6.
249. Joo M, Chi JG, Lee H. Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 829-34.

250. Luk JM, Lam CT, Siu AF, et al. Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. *Proteomics* 2006; 6: 1049-57.
251. Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, et al. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 37: 198-207.
252. Shin E, Ryu HS, Kim SH, Jung H, Jang JJ, Lee K. The clinicopathological significance of heat shock protein 70 and glutamine synthetase expression in hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18: 544-50.
253. Diehl JA, Yang W, Rimerman RA, Xiao H, Emili A. Hsc70 regulates accumulation of cyclin D1 and cyclin D1-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 1764-74.
254. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 164-72.
255. Bothwell M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18: 223-53.
256. Trim N, Morgan S, Evans M, et al. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 2000; 156: 1235-43.
257. Rasi G, Serafino A, Bellis L, et al. Nerve growth factor involvement in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4986-95.
258. Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 2002; 67: 203-33.

259. Tokusashi Y, Asai K, Tamakawa S, et al. Expression of NGF in hepatocellular carcinoma cells with its receptors in non-tumor cell components. *Int J Cancer* 2005; 114: 39-45.
260. Hunt LT, Dayhoff MO. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 864-71.
261. Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 2002; 102: 4751-804.
262. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001; 276: 33293-6.
263. Remold-O'Donnell E. The ovalbumin family of serpin proteins. *Febs Lett* 1993; 315: 105-8.
264. Mangan MS, Kaiserman D, Bird PI. The role of serpins in vertebrate immunity. *Tissue Antigens* 2008; 72: 1-10.
265. Medcalf RL, Stasinopoulos SJ. The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *Febs J* 2005; 272: 4858-67.
266. Riewald M, Chuang T, Neubauer A, Riess H, Schleef RR. Expression of bomapin, a novel human serpin, in normal/malignant hematopoiesis and in the monocytic cell lines THP-1 and AML-193. *Blood* 1998; 91: 1256-62.
267. Pontisso P, Calabrese F, Benvegna L, et al. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 90: 833-7.

268. Kato H, Tamai K, Morioka H, Nagai M, Nagaya T, Torigoe T. Tumor-antigen TA-4 in the detection of recurrence in cervical squamous cell carcinoma. *Cancer-Am Cancer Soc* 1984; 54: 1544-6.
269. Schneider SS, Schick C, Fish KE, et al. A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 3147-51.
270. Schick C, Pemberton PA, Shi GP, et al. Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry-US* 1998; 37: 5258-66.
271. Kato H. Expression and function of squamous cell carcinoma antigen. *Anticancer Res* 1996; 16: 2149-53.
272. Hamanaka S, Ujihara M, Numa F, Kato H. Serum level of squamous cell carcinoma antigen as a new indicator of disease activity in patients with psoriasis. *Arch Dermatol* 1997; 133: 393-5.
273. Giannelli G, Iannone F, Fransvea E, Chiala A, Lapadula G, Antonaci S. Squamous cellular carcinoma immunocomplexed is increased in scleroderma patients with lung fibrosis. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: 794-5.
274. Gomes S, Marques PI, Matthiesen R, Seixas S. Adaptive evolution and divergence of SERPINB3: a young duplicate in great Apes. *Plos One* 2014; 9: e104935.
275. Cataltepe S, Gornstein ER, Schick C, et al. Co-expression of the squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in normal adult human tissues and squamous cell carcinomas. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 113-22.
276. Iversen OJ, Lysvand H, Hagen L. The autoantigen Pso p27: a post-translational modification of SCCA molecules. *Autoimmunity* 2011; 44: 229-34.

277. Suminami Y, Nagashima S, Vujanovic NL, Hirabayashi K, Kato H, Whiteside TL. Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Br J Cancer* 2000; 82: 981-9.
278. Quarta S, Vidalino L, Turato C, et al. SERPINB3 induces epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol* 2010; 221: 343-56.
279. Suminami Y, Nagashima S, Murakami A, et al. Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1776-80.
280. Turato C, Simonato D, Quarta S, Gatta A, Pontisso P. MicroRNAs and SerpinB3 in hepatocellular carcinoma. *Life Sci* 2014; 100: 9-17.
281. Guido M, Roskams T, Pontisso P, et al. Squamous cell carcinoma antigen in human liver carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2008; 61: 445-7.
282. Turato C, Vitale A, Fasolato S, et al. SERPINB3 is associated with TGF-beta1 and cytoplasmic beta-catenin expression in hepatocellular carcinomas with poor prognosis. *Br J Cancer* 2014; 110: 2708-15.
283. Villano G, Quarta S, Ruvoletto MG, et al. Role of squamous cell carcinoma antigen-1 on liver cells after partial hepatectomy in transgenic mice. *Int J Mol Med* 2010; 25: 137-43.
284. Villano G, Turato C, Quarta S, et al. Hepatic progenitor cells express SerpinB3. *Bmc Cell Biol* 2014; 15: 5.
285. de Bruijn HW, Duk JM, van der Zee AG, et al. The clinical value of squamous cell carcinoma antigen in cancer of the uterine cervix. *Tumour Biol* 1998; 19: 505-16.
286. Beneduce L, Castaldi F, Marino M, et al. Squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer-Am Cancer Soc* 2005; 103: 2558-65.

287. Sun Y, Sheshadri N, Zong WX. SERPINB3 and B4: From biochemistry to biology. *Semin Cell Dev Biol* 2016.
288. Yazigi R, Munoz AK, Richardson B, Risser R. Correlation of squamous cell carcinoma antigen levels and treatment response in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1991; 41: 135-8.
289. Giannelli G, Marinosci F, Sgarra C, Lupo L, Dentico P, Antonaci S. Clinical role of tissue and serum levels of SCCA antigen in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 116: 579-83.
290. Beale G, Chattopadhyay D, Gray J, et al. AFP, PIVKAlI, GP3, SCCA-1 and follistatin as surveillance biomarkers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Bmc Cancer* 2008; 8: 200.
291. Soyemi OM, Otegbayo JA, Ola SO, Akere A, Soyemi T. Comparative diagnostic efficacy of serum squamous cell carcinoma antigen in hepatocellular carcinoma. *BMC Res Notes* 2012; 5: 403.
292. Giannelli G, Marinosci F, Trerotoli P, et al. SCCA antigen combined with alpha-fetoprotein as serologic markers of HCC. *Int J Cancer* 2005; 117: 506-9.
293. Rubin B. Natural immunity has significant impact on immune responses against cancer. *Scand J Immunol* 2009; 69: 275-90.
294. Castaldi F, Marino M, Beneduce L, et al. Detection of circulating CEA-IgM complexes in early stage colorectal cancer. *Int J Biol Markers* 2005; 20: 204-8.
295. Beneduce L, Prayer-Galetti T, Giustinian AM, et al. Detection of prostate-specific antigen coupled to immunoglobulin M in prostate cancer patients. *Cancer Detect Prev* 2007; 31: 402-7.

296. Marcello A, Wirths O, Schneider-Axmann T, Degerman-Gunnarsson M, Lannfelt L, Bayer TA. Circulating immune complexes of Abeta and IgM in plasma of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 2009; 116: 913-20.
297. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-8.
298. Pontisso P, Quarta S, Caberlotto C, et al. Progressive increase of SCCA-IgM immune complexes in cirrhotic patients is associated with development of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2006; 119: 735-40.
299. Beneduce L, Castaldi F, Marino M, et al. Improvement of liver cancer detection with simultaneous assessment of circulating levels of free alpha-fetoprotein (AFP) and AFP-IgM complexes. *Int J Biol Markers* 2004; 19: 155-9.
300. Giannelli G, Fransvea E, Trerotoli P, et al. Clinical validation of combined serological biomarkers for improved hepatocellular carcinoma diagnosis in 961 patients. *Clin Chim Acta* 2007; 383: 147-52.
301. Trerotoli P, Fransvea E, Angelotti U, et al. Tissue expression of Squamous Cellular Carcinoma Antigen (SCCA) is inversely correlated to tumor size in HCC. *Mol Cancer* 2009; 8: 29.
302. Biasiolo A, Tono N, Ruvoletto M, et al. IgM-linked SerpinB3 and SerpinB4 in sera of patients with chronic liver disease. *Plos One* 2012; 7: e40658.
303. Buccione D, Fatti G, Gallotta A, et al. Serum SCCA-IgM as a predictor of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Open Journal of Gastroenterology* 2012; 02: 56-61.
304. Pozzan C, Cardin R, Piciocchi M, et al. Diagnostic and prognostic role of SCCA-IgM serum levels in hepatocellular carcinoma (HCC). *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29: 1637-44.

305. Biasiolo A, Trotta E, Fasolato S, et al. Squamous cell carcinoma antigen-IgM is associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: A prospective study. *Dig Liver Dis* 2016; 48: 197-202.
306. Buccione D, Fatti G, Gallotta A, et al. Serum Scca-IgM as a predictor of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Open Journal of Gastroenterology* 2012; 2: 56.
307. Biasiolo A, Chemello L, Quarta S, et al. Monitoring SCCA-IgM complexes in serum predicts liver disease progression in patients with chronic hepatitis. *J Viral Hepat* 2008; 15: 246-9.
308. Martini A, Fattovich G, Guido M, et al. HCV genotype 3 and squamous cell carcinoma antigen (SCCA)-IgM are independently associated with histological features of NASH in HCV-infected patients. *J Viral Hepat* 2015; 22: 800-8.
309. Giannini EG, Basso M, Bazzica M, et al. Successful antiviral therapy determines a significant decrease in squamous cell carcinoma antigen-associated (SCCA) variants' serum levels in anti-HCV positive cirrhotic patients. *J Viral Hepat* 2010; 17: 563-8.
310. Fransvea E, Trerotoli P, Sacco R, et al. SCCA-IC serum levels are predictive of clinical response in HCV chronic hepatitis to antiviral therapy: a multicentric prospective study. *J Viral Hepat* 2012; 19: 704-10.
311. Hu B, Tian X, Sun J, Meng X. Evaluation of individual and combined applications of serum biomarkers for diagnosis of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 23559-80.
312. Zhang J, Shao C, Zhou Q, Zhu Y, Zhu J, Tu C. Diagnostic accuracy of serum squamous cell carcinoma antigen and squamous cell carcinoma antigen-

immunoglobulin M for hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol* 2015; 3: 1165-71.

313. Yu J, Wang ZJ, Chen LH, Dong WZ. Diagnostic value of serum squamous cell carcinoma antigen for hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Scand J Clin Lab Invest* 2017; 77: 8-14.

314. Lijmer JG, Bossuyt PM, Heisterkamp SH. Exploring sources of heterogeneity in systematic reviews of diagnostic tests. *Stat Med* 2002; 21: 1525-37.

315. Petitti DB. Approaches to heterogeneity in meta-analysis. *Stat Med* 2001; 20: 3625-33.

316. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med* 2009; 151: 264-9, W64.

317. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med* 2011; 155: 529-36.

318. Knottnerus JA, Leffers P. The influence of referral patterns on the characteristics of diagnostic tests. *J Clin Epidemiol* 1992; 45: 1143-54.

319. Kassirer JP, Kopelman RI. The luxuriant language of diagnosis. *Hosp Pract (Off Ed)* 1989; 24: 36-8, 40, 2, 9.

320. Taube A. Sensitivity, specificity and predictive values: a graphical approach. *Stat Med* 1986; 5: 585-91.

321. Robertson EA, Zweig MH, Van Steirteghem AC. Evaluating the clinical efficacy of laboratory tests. *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 78-86.

322. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI, Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. *Ann Intern Med* 1981; 94: 557-92.
323. Feinstein AR. Clinical biostatistics XXXI. On the sensitivity, specificity, and discrimination of diagnostic tests. *Clin Pharmacol Ther* 1975; 17: 104-16.
324. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer-Am Cancer Soc* 1950; 3: 32-5.
325. Hajian-Tilaki KO, Gholizadehpasha AR, Bozorgzadeh S, Hajian-Tilaki E. Body mass index and waist circumference are predictor biomarkers of breast cancer risk in Iranian women. *Med Oncol* 2011; 28: 1296-301.
326. McGee S. Simplifying likelihood ratios. *J Gen Intern Med* 2002; 17: 646-9.
327. Reitsma JB, Glas AS, Rutjes AW, Scholten RJ, Bossuyt PM, Zwinderman AH. Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews. *J Clin Epidemiol* 2005; 58: 982-90.
328. Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA* 1994; 271: 703-7.
329. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 2003; 327: 557-60.
330. Copas JB, Shi JQ. A sensitivity analysis for publication bias in systematic reviews. *Stat Methods Med Res* 2001; 10: 251-65.
331. Hellmich M, Lehmacher W. A ruler for interpreting diagnostic test results. *Methods Inf Med* 2005; 44: 124-6.

332. Deeks JJ, Macaskill P, Irwig L. The performance of tests of publication bias and other sample size effects in systematic reviews of diagnostic test accuracy was assessed. *J Clin Epidemiol* 2005; 58: 882-93.
333. Bolondi L. Screening for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 39: 1076-84.
334. Kim CK, Lim JH, Lee WJ. Detection of hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules in cirrhotic liver: accuracy of ultrasonography in transplant patients. *J Ultrasound Med* 2001; 20: 99-104.
335. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993; 328: 1797-801.
336. Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, et al. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol* 2005; 43: 434-41.
337. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001; 35: 421-30.
338. Toll DB, Janssen KJ, Vergouwe Y, Moons KG. Validation, updating and impact of clinical prediction rules: a review. *J Clin Epidemiol* 2008; 61: 1085-94.
339. Liu CH, Gil-Gomez A, Ampuero J, Romero-Gomez M. Diagnostic accuracy of SCCA and SCCA-IgM for hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Liver Int* 2018.
340. Turato C, Pontisso P. SERPINB3 (serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2015; 19: 202-9.

341. Dai M, Chen X, Liu X, Peng Z, Meng J, Dai S. Diagnostic Value of the Combination of Golgi Protein 73 and Alpha-Fetoprotein in Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Plos One* 2015; 10: e0140067.
342. He S, Hu XW, Wang D, Han LF, Zhang DC, Wei C. Accuracy of microRNAs for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2016; 40: 405-17.
343. Kudo M, Izumi N, Kokudo N, et al. Management of hepatocellular carcinoma in Japan: Consensus-Based Clinical Practice Guidelines proposed by the Japan Society of Hepatology (JSH) 2010 updated version. *Dig Dis* 2011; 29: 339-64.
344. Montagnana M, Danese E, Lippi G. Squamous cell carcinoma antigen in hepatocellular carcinoma: Ready for the prime time? *Clin Chim Acta* 2015; 445: 161-6.
345. El-Serag HB, Kanwal F, Davila JA, Kramer J, Richardson P. A new laboratory-based algorithm to predict development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C and cirrhosis. *Gastroenterology* 2014; 146: 1249-55.e1.
346. Chen H, Chen S, Li S, et al. Combining des-gamma-carboxyprothrombin and alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosing: an update meta-analysis and validation study. *Oncotarget* 2017; 8: 90390-401.
347. Kim KW, Lee J, Choi SH, Huh J, Park SH. Systematic Review and Meta-Analysis of Studies Evaluating Diagnostic Test Accuracy: A Practical Review for Clinical Researchers-Part I. General Guidance and Tips. *Korean J Radiol* 2015; 16: 1175-87.
348. Lee J, Kim KW, Choi SH, Huh J, Park SH. Systematic Review and Meta-Analysis of Studies Evaluating Diagnostic Test Accuracy: A Practical Review for

Clinical Researchers-Part II. Statistical Methods of Meta-Analysis. *Korean J Radiol* 2015; 16: 1188-96.

349. Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 2008; 48 Suppl 1: S20-37.

350. Izzo F, Cremona F, Ruffolo F, Palaia R, Parisi V, Curley SA. Outcome of 67 patients with hepatocellular cancer detected during screening of 1125 patients with chronic hepatitis. *Ann Surg* 1998; 227: 513-8.

351. Luna G, Florence L, Johansen K. Hepatocellular carcinoma. A 5 year institutional experience. *Am J Surg* 1985; 149: 591-4.

352. Tang ZY, Yu YQ, Zhou XD, Yang BH, Ma ZC, Lin ZY. Subclinical hepatocellular carcinoma: an analysis of 391 patients. *J Surg Oncol Suppl* 1993; 3: 55-8.

353. Ampuero J, Romero-Gomez M. Editorial: looking for patients at risk of cirrhosis in the general population-many needles in a haystack. *Aliment Pharmacol Ther* 2018; 47: 692-4.

354. Furlan A, Marin D, Agnello F, et al. Hepatocellular carcinoma presenting at contrast-enhanced multi-detector-row computed tomography or gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging as a small (≤ 2 cm), indeterminate nodule: growth rate and optimal interval time for imaging follow-up. *J Comput Assist Tomogr* 2012; 36: 20-5.

355. Taouli B, Goh JS, Lu Y, et al. Growth rate of hepatocellular carcinoma: evaluation with serial computed tomography or magnetic resonance imaging. *J Comput Assist Tomogr* 2005; 29: 425-9.

356. Yuen MF, Lai CL. Screening for hepatocellular carcinoma: survival benefit and cost-effectiveness. *Ann Oncol* 2003; 14: 1463-7.

357. Santi V, Trevisani F, Gramenzi A, et al. Semiannual surveillance is superior to annual surveillance for the detection of early hepatocellular carcinoma and patient survival. *J Hepatol* 2010; 53: 291-7.
358. Trinchet JC, Chaffaut C, Bourcier V, et al. Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatology* 2011; 54: 1987-97.
359. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* 2008; 134: 1570-95.
360. Tice JA, Cummings SR, Smith-Bindman R, Ichikawa L, Barlow WE, Kerlikowske K. Using clinical factors and mammographic breast density to estimate breast cancer risk: development and validation of a new predictive model. *Ann Intern Med* 2008; 148: 337-47.
361. Fujiwara N, Friedman SL, Goossens N, Hoshida Y. Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine. *J Hepatol* 2017.
362. Doyle A, Sherman M. Liver Biopsy for Hepatocellular Carcinoma (HCC): Should this be a Routine? *Current Hepatology Reports* 2017; 16: 46-50.
363. Forner A, Vilana R, Ayuso C, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 97-104.
364. Serste T, Barrau V, Ozenne V, et al. Accuracy and disagreement of computed tomography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of small

hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules: role of biopsy. *Hepatology* 2012; 55: 800-6.

365. Sangiovanni A, Manini MA, Iavarone M, et al. The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Gut* 2010; 59: 638-44.

366. Singal AG, El-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 2140-51.