

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



Papel del p53 y los receptores de muerte celular en la supervivencia de paciente con hepatocarcinoma. Implicación en el mecanismo antitumoral de Sorafenib

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Virginia Gómez Cabeza de Vaca

Bajo la dirección de los doctores

Prof. Francisco Javier Padillo Ruiz

Dr. Jordi Muntané Relat

Dr. José María Álamo Martínez

Sevilla, 2016

UNIVERSIDAD DE SEVILLA FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

Papel del p53 y los receptores de muerte celular en la supervivencia de paciente con hepatocarcinoma. Implicación en el mecanismo antitumoral de Sorafenib

Doctorando: Virginia Gómez Cabeza de Vaca

Directores: Prof. Francisco Javier Padillo Ruíz

Dr. Jordi Muntané Relat

Dr. José María Álamo Martínez

D. FRANCISCO JAVIER PADILLO RUÍZ, CATEDRÁTICO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA; D. JORDI MUNTANÉ RELAT, SUBDIRECTOR I+D+I DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA INTERCENTRO CIRUGÍA GENERAL Y DIGESTIVA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN MACARENA-VIRGEN DEL ROCÍO Y D. JOSÉ MARÍA ÁLAMO MARTÍNEZ, PROFESOR ASOCIADO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICAN: Que Doña Virginia Gómez Cabeza de Vaca ha realizado bajo nuestra dirección su Tesis Doctoral titulada: “PAPEL DEL P53 Y LOS RECEPTORES DE MUERTE CELULAR EN LA SUPERVIVENCIA DE PACIENTES CON HEPATOCARCINOMA. IMPLICACIÓN EN EL MECANISMO ANTITUMORAL DE SORAFENIB” finalizada, reúne las condiciones necesarias para obtener el grado de Doctor, por lo que autorizamos la presentación de la misma para su defensa y calificación por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, expiden el siguiente certificado en Sevilla a de de 201.

Fdo. Francisco Javier Padillo Ruiz

Fdo. Jordi Muntané Relat

Fdo. José María Álamo Martínez

“El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad”.

Víctor Hugo

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis directores de Tesis la oportunidad de haber terminado este trabajo que comencé siendo Residente de Cirugía en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

Al Dr. D. José María Álamo siempre dispuesto a colaborar, al Dr. Prof. D. Javier Padillo, persona brillante y emprendedora con quien he tenido el privilegio de trabajar y especialmente al Dr. D. Jordi Muntané un investigador incansable y ejemplo a seguir.

A los que fueron mis compañeros Residentes y Adjuntos de Sevilla, de todos guardo un grato recuerdo y sobre todo a mis actuales compañeros del Servicio de Cirugía General del Hospital San Roque de Las Palmas de Gran Canaria donde voy feliz a trabajar.

A mis padres Antonio y Juani por ser mi ejemplo de vida y a mis hermanos Juan Diego y Antoñito por ser mis mejores amigos. A mi cuñada Regina por ser mi hermana.

A Paco, mi marido y amigo por alegrarme la vida y acompañarme en esta aventura que es vivir.

A nuestro hijo, Pedro, un regalo del cielo que nos hace levantarnos con ilusión por las mañanas.

Índice de abreviaturas

CHC: carcinoma hepatocelular

CBP: cirrosis biliar primaria

VHB: virus de hepatitis B

VHC: virus de hepatitis C

TH: trasplante hepático

RE: retículo endoplásmico

CTL: Linfocitos T citotóxicos

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

TNF: factor de necrosis tumoral

IL: interleuquina

LOE: lesión ocupante de espacio

TC: tomografía computerizada

RM: resonancia magnética

PET: tomografía por emisión de positrones

AFP: alfa fetoproteína

PAAF: punción y aspiración con aguja fina

EASL: European Association for the Study of the Liver

CLIP: Cancer Living Italian Program

CUPI: Chinese University Prognostic Index

JIS: Japan Integrated Staging

GRETCH: Groupe d'Étude et de Traitement du Carcinoma Hepatocellulaire

BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer

AASLD: Association for the Study of Liver Diseases

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

AJCC: American Joint Committee On Cancer

MELD: Model for End-Stage Liver Disease

OCATT: Organización catalana de Trasplante

TACE: Quimioembolización arterial transcatéter

UNOS: United Network for Organ Sharing

RFA: radiofrecuencia

PEI: Percutaneous Ethanol Injection

PIAF: Cisplatino/ Interferon/ Doxorrubicina / Fluorouracil

EGFR: Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial vascular

sGC: guanilatociclasa soluble

Ms AFP: fracción monosializada de alfa fetoproteína

PIVKAll: desgammacarboxiprotrombina

TPS: antígeno polipeptídico específico tisular

DCP: Des-γ carboxiprotrombina

GPDA: Dipeptidil aminopeptidasa

hTERT: transcriptasa inversa de la telomerasa

AT: transactivación N-terminal

PRD: dominio rico en prolina

4D: Dominio de tetramerización

CTD: dominio C-Terminal

RITA: Reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis

PRIMA-1: Receptor de membrane rico en Prolina

CECC: Células escamosas del cuello

MEFs: Fibroblastos del embrión de ratón

LLA: leucemia linfoblástica aguda

ETOH: Ethyl Alcohol

Cx: Cicloheximida

ACT: Actinomicina D

S: Sorafenib

SiRNA: Small Interfering RNA

ShRNA: Short Hairpin RNA

TUNEL: terminal Deoxinucleotidil Transferasa

Tabla de contenidos

I. ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL HEPATOCARCINOMA	19
1.1.1. ETIOPATOGENIA	
1.1.2. ONCOGÉNESIS	
1.1.3. HISTOLOGÍA	
1.2. EXPRESIÓN CLÍNICA DEL HEPATOCARCINOMA	31
1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA	
1.2.2. PRESENTACIÓN CLÍNICA	
1.3. DIAGNÓSTICO	34
1.3.1. PRUEBAS DE IMAGEN	
1.3.2. MARCADORES SEROLÓGICOS	
1.3.3. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	
1.3.4. ALGORITMO DIAGNÓSTICO DEL HCC	
1.4. EVOLUCIÓN NATURAL Y ESTADIFICACIÓN DEL HEPATOCARCINOMA	40
1.4.1. BCLC	

1.5. TRATAMIENTO	49
1.5.1. RESECCIÓN QUIRÚRGICA	
1.5.2. TRASPLANTE HEPÁTICO	
1.5.3. QUIMIOEMBOLIZACIÓN ARTERIAL	
1.5.4. RADIOFRECUENCIA	
1.5.5. RADIOTERAPIA	
1.5.6. ALCOHOLIZACIÓN PERCUTÁNEA	
1.5.7. QUIMIOTERAPIA Y OTROS TRATAMIENTOS SISTÉMICOS	
1.5.8. ANÁLOGOS DE HORMONAS	
1.5.9. PERSPECTIVAS FUTURAS	
1.6. CRIBADO Y SEGUIMIENTO	80
1.7. MARCADORES BIOLÓGICOS	82
1.7.1. ALFA-FETOPROTEÍNA	
1.7.2. OTROS MARCADORES BIOLÓGICOS	
1.7.3. MARCADORES GENÉTICOS	
2. OBJETIVOS	103
3. MATERIALES Y MÉTODO	105

4. RESULTADOS	118
5. DISCUSIÓN	167
6. CONCLUSIONES	173
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175

Introducción

1.1.- BIOLOGÍA MOLECULAR DEL HEPATOCARCINOMA

1.1.1.- ETIOPATOGENIA

El carcinoma hepatocelular (CHC), es el cáncer primario de hígado más frecuente (90%) que representa la quinta neoplasia maligna más común en todo el mundo, tercera causa de muerte relacionada con cáncer y con un número estimado de nuevos casos anual creciente que oscila entre 500 000 a 1 millón y con un número de fallecidos entre 600 000 y 700 000 por año (1).

Existe una distribución geográfica de manera que la incidencia es elevada en países en vías de desarrollo como los del sudeste asiático y el África subsahariana; intermedia en Japón y países europeos del área mediterránea, e inferior en el norte de Europa y EE.UU. Se observan diferencias significativas también respecto a factores de riesgo y patogénesis entre los diferentes países (2).

La mortalidad de este cáncer es muy elevada, con una tasa de supervivencia a los 5 años del 5-6%. Hasta hace pocos años su diagnóstico se realizaba en fases avanzadas, cuando el paciente presentaba síntomas relacionados con el tumor y éste había alcanzado gran tamaño, lo cual impedía la aplicación de un tratamiento con finalidad curativa; por tanto, el pronóstico a corto plazo era malo. Sin embargo, en los últimos años la introducción de la ecografía, los avances en las técnicas de imagen y la inclusión de los pacientes con un riesgo elevado en un programa de seguimiento intencionado han permitido el diagnóstico de este tumor en un estadio más inicial, en el que es posible la aplicación de un tratamiento con intención curativa mejorando así la tasa de supervivencia (3).

El desarrollo del CHC está vinculado a la existencia de cirrosis hepática de cualquier etiología. Sin embargo, también se ha diagnosticado en pacientes no cirróticos con hígado normal.

Los factores de riesgo más importantes son (Tabla 1) (4,5):

- Edad del paciente y género masculino, asociado a una mayor exposición a los factores de riesgo (6), mayor índice de masa corporal, niveles elevados de andrógenos y disminuidos de estradiol.
- Alteraciones inmunológicas (trastornos relacionados con las hepatitis autoinmunes): Su incidencia es baja ya que aparece más frecuentemente en el sexo femenino.
- Cirrosis: hasta el 90% de los CHC aparecen en hígados cirróticos o con fibrosis avanzada. No está claro si esta asociación está relacionada con un aumento del proceso regenerativo o está provocado por la propia cirrosis. El riesgo de desarrollo de tumor depende del tipo de cirrosis, de manera que cuando la causa es viral (78% de los CHC a nivel mundial) el riesgo es mucho más elevado que cuando estamos ante otras causas no virales como la cirrosis biliar primaria (CBP) (7). En este último caso la incidencia es muy baja ya que la prevalencia de esta enfermedad es baja y porque aparece más frecuentemente en el sexo femenino, de todas maneras el riesgo existe, siendo del 0,3% en fases precoces de la enfermedad y del 1,5% en fases más avanzadas. La incidencia de CHC sobre hígado no cirrótico asciende al 10-20% pero se ha observado que aunque no presentan una cirrosis confirmada mediante biopsia, aparece cierto grado de fibrosis, esteatosis o displasia celular.

- VHB: se ha estimado que hasta 40 millones de personas son portadoras de este virus, es por ello que es tan frecuentes en Asia Oriental y África subsahariana (zona endémica de VHB) y además se ha demostrado que el riesgo relativo de desarrollar un CHC es mucho más alto en los portadores crónicos de HbsAg positivo y aún mayor en los portadores HbeAg positivo de forma concomitante. Aunque también influyen factores como la carga del VHB en sangre y la edad del paciente. Por el contrario, -el tratamiento del VHB con interferón o análogos de los nucleótidos reduce el riesgo de forma significativa. Las campañas de vacunación en áreas de alta incidencia de HVB como Taiwan han permitido una disminución de la incidencia de CHC hasta el 60% (8,9).
- La infección crónica por el VHC. Es la causa más frecuente en las zonas de baja e intermedia prevalencia como Estados Unidos, Europa y el área mediterránea. En los países orientales más del 70% de los pacientes con CHC presentan anticuerpos anti-HVC en suero. El riesgo relativo de desarrollar un CHC es mucho más alto en los pacientes positivos para VHC afectos de cirrosis o fibrosis avanzada y la media de aparición desde la infección por VHC es 30 años. Sin embargo, también puede ocurrir en portadores sanos del virus C. Algunos marcadores de inflamación involucrados son: las células CD68+, la presencia de 8-hidroxideoxiguanina en el ADN y la proteína 4-hidroxinonenal (10,11,12).

Los buenos resultados obtenidos con Interferón y Ribavirina en lo que se refiere a mejor evolución de la infección han contribuido a una disminución sustancial de la incidencia de CHC.

- Hemocromatosis: esta enfermedad se caracteriza por la absorción aumentada de hierro que a su vez incrementa las reacciones oxidativas intracelulares. Es aún controvertido si el riesgo de desarrollo de CHC es mayor en estos pacientes que en otros con cirrosis de etiología diferente. Una vez que aparece la cirrosis el riesgo anual de aparición de CHC es del 5%. También se asocia, al igual que con otros factores, a la diabetes mellitus tipo 2. Otras entidades como la β -talasemia heterocigota también se asocia a un aumento de CHC (13).
- Las toxinas ambientales como la aflatoxina B1 (14), las aguas contaminadas y otras infecciones como la esquistosomiasis. En zonas rurales de Asia oriental y África, existen dos contaminantes relacionados con el desarrollo del CHC. Uno es la aflatoxina B1, que es una micotoxina que contamina los granos de algunos cereales, legumbres y frutos secos como el maíz, la soja y los cacahuets, cuyo efecto oncogénico se ha relacionado con la mutación del gen p53. El otro, es la toxina procedente de algas azul verdosas (*microcystin*), que contaminan el agua.
- Enolismo. El consumo elevado (mayor de 50-70 gramos al día) y prolongado de alcohol ha demostrado ser una causa directa de desarrollo de CHC. En Asia contribuye a un 10% de los CHC y al doble, en el caso de Europa. A pesar de que la ingesta alcohólica está relacionada con el riesgo de desarrollar cirrosis y CHC, la relación existente entre la cantidad y la duración del hábito enólico con el desarrollo del proceso maligno no están claramente determinadas. La

coexistencia de infección crónica por VHC y VHB, y la ingesta de alcohol potencia el riesgo de desarrollar CHC.

- La esteatohepatitis no alcohólica. Es una de las causas más comunes de enfermedad hepática en USA. Su evolución va desde una esteatosis leve al desarrollo de cirrosis. Se asocia estrechamente con la diabetes mellitus de tipo 2 y la obesidad, como parte del síndrome metabólico. Se estima que hasta el 70% de pacientes diabéticos presentan esteatosis hepática, ascendiendo al 9% en el caso de pacientes obesos.
- Enfermedades metabólicas: déficit de $\alpha 1$ anti-tripsina, porfiria cutánea parda, tirosinemia, hipercitrulinemia, glucogenosis grado IV, intolerancia hereditaria a la fructosa, enfermedad de Wilson, son considerados factores de bajo riesgo de CHC.
- Adenomas, anticonceptivos y andrógenos: Los adenomas asociados a glucogenosis grado IV (15), a andrógenos o a anabolizantes pueden transformarse en CHC incluso en hígados no cirróticos. La enfermedad de Fanconi también es un factor de riesgo sobre todo si se trata con esteroides. En el caso de la ingesta de anticonceptivos, el riesgo de transformación de adenomas en CHC existe pero es menor al 10%. Esta transformación es más frecuente en nódulos mayores de 5 cm, en el género masculino y se relaciona a su vez con mutaciones a nivel de las *β – catenina*.
- En algunas series, del total de pacientes sometidos a hepatectomía parcial (HP), el 7,9% tenían VHB y el 60%, VHC. En el caso de los pacientes sometidos a trasplante hepático (TH), el 7,1% tenían VHB, el 74%, VHC, y el 16% eran consumidores de alcohol. Sin embargo, en

EEUU, en el 25% de los casos no se encuentra una causa clara que justifique la aparición de la enfermedad.

Tabla 1. Pacientes con riesgo elevado de CHC.

Cirrosis	No cirrosis
Hepatitis B	Portadores de hepatitis B
Hepatitis C	Historia familiar de CHC
Enfermedad por alcohol	Africanos > 20 años
Esteatohepatitis no alcohólica	Hombres asiáticos > 40 años
Hemocromatosis hereditaria	Mujeres asiáticas > 50 años
Cirrosis biliar primaria	
Deficiencia de α -1-antitripsina	

1.1.2.- ONCOGÉNESIS

La oncogénesis del CHC se asocia con un proceso inflamatorio crónico del tejido hepático cirrótico (vía indirecta) y la estabilidad genética de los hepatocitos (vía directa). Por ejemplo, en el hígado infectado con el VHC, la reacción inflamatoria crónica, las especies reactivas del oxígeno (ROS), daño en el ADN celular, estrés del retículo endoplásmico (RE), la apoptosis y la respuesta autofágica están involucrados en la inducción de CHC (16).

a) VHB Y VHC

El mecanismo mejor conocido de la oncogénesis del CHC es la respuesta inflamatoria crónica. En el caso de infección por el VHB o el VHC, serán los linfocitos T citotóxicos (CTL), específicos frente a las proteínas virales los que provoquen el daño a nivel del hepatocito. Estos ciclos mantenidos de necrosis, inflamación y regeneración (renovación celular acelerada) causan

mutaciones en el ADN y por lo tanto, pueden inducir a su vez la aparición de CHC por la propagación de lesiones oncogénicas.

Este mecanismo de hepatocarcinogénesis se encuentra promovido por el estrés oxidativo de los hepatocitos generados a partir de diversas fuentes intracelulares (mitocondria, retículo endoplásmico, NADPH oxidasa, y síntesis de derivados del ácido araquidónico) y la activación de las células estrelladas que promueven la aparición de mutaciones de ADN celular contribuyendo a un estado pro-carcinógeno en el tejido.

En el caso del VHB se han demostrado que existen unos mecanismos más directos de carcinogénesis que consisten en la integración del ADN del VHB a nivel del ADN de los hepatocitos induciendo así alteraciones en la pauta de lectura en el ADN celular y genes relevantes en la aparición del cáncer, como son la telomerasa, transcriptasa inversa, y otros. Además, el VHB puede ejercer otra acción directa sobre la génesis del cáncer, mediante la inactivación de la proteína p53 (proteína supresora de tumores) y por la activación de la expresión de múltiples genes de control del crecimiento (activación transcripcional de HBX). De acuerdo con algunas observaciones, la delección a nivel de la región pre-S de algunas proteínas del VHB está particularmente involucrada en el desarrollo de CHC mediante la inducción de estrés a nivel del retículo endoplásmico y, en consecuencia, generando daños celulares.

Aunque el VHC presenta muchas diferencias virológicas significativas con el VHB, múltiples mecanismos de inducción de carcinogénesis son comunes para ambos virus. El daño continuado a los hepatocitos que provoca la acumulación de lesiones en el ADN, y su propagación a través de la

proliferación celular es el mecanismo básico del cáncer (17). Por otro lado, aunque el proceso inflamatorio crónico en la hepatitis C está relacionada con el aumento de la mutagénesis y el desarrollo final del CHC, en el caso de la hepatitis autoinmune la aparición de CHC es un evento raro, lo que indica que la inflamación por sí sola no es un factor suficiente en la aparición del CHC.

Otras proteínas no estructurales del VHC (proteína del núcleo y NS) también juegan un papel importante en el CHC. Esta proteína del núcleo del VHC puede interferir con el crecimiento del ciclo celular desregulando la mitosis de las células. Otros posibles mecanismos relacionados con la carcinogénesis del VHC son la interacción con PKR-quinasa (inhibición de la apoptosis y el crecimiento celular acelerada), la unión a p53 y p73, así como la regulación positiva de los oncogenes celulares (WKT-1).

La interacción de la proteína del núcleo del VHC en diferentes vías de acción de los hepatocitos, incluyen la producción de otros productos como TNF- α , TGF- β , NF- κ B, CD95L, Bcl-XL y otros.

El papel particular en la transformación de la célula, la diferenciación y la oncogénesis han sido atribuidos a NS5A, NS3 y NS4A que interactúan con múltiples proteínas celulares. Los más importantes son el TNF- α , interferón, NF- κ B y p53.

b) VHC, VHB y COINFECCIÓN CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA

La coinfección del VHB, VHC y el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) es común, ya que comparten la misma vía de transmisión. En los múltiples estudios se ha puesto de manifiesto que la co-infección

VHB/VHC/VIH presenta un riesgo significativamente mayor de desarrollar CHC y éste tiene mayor rapidez de progresión. Tanto antígenos específicos comunes como diferentes vías pueden estar involucrados en el CHC. Probablemente la patogénesis del proceso es una combinación de mecanismos específicos para cada uno de estos virus. Una observación similar se hizo para el virus de la hepatitis D(HDV)/VHB.

c) ALCOHOL

Como señalamos antes, el alcohol es un factor independiente e importante en el desarrollo del CHC. El consumo de alcohol tiene como resultado la activación de los monocitos y la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y la prostaglandina E2. Otro mecanismo de daño del hepatocito es un estrés oxidativo y sus consecuencias oncogénicas: fibrosis y cirrosis, la fosforilación de STAT1 (transductor de señal y activador de la transcripción del factor 1), la pérdida de producción de IFN- γ y acortamiento del telómero (18).

d) AFLATOXINA

Su acción carcinogénica, se asocia con su función mutagénica sobre el gen supresor de tumores p53 y la activación de oncogenes. En el caso de la toxina de este hongo (*Aspergillus* sp.) se ha observado que la incidencia de CHC no se correlaciona con la cirrosis hepática, indicando que el poder oncogénico de esta toxina se relaciona con su potencial mutacional.

1.1.3.- HISTOLOGÍA

Es ampliamente conocido que el hígado cirrótico alberga nódulos que son estadios intermedios entre nódulos no neoplásicos y CHC. Estos nódulos no neoplásicos pueden dividirse en nódulos de bajo o de alto riesgo dependiendo del grado de atipia. Estos nódulos se definen como regiones nodulares de menos de 2 cm con displasia pero sin criterios histológicos de malignidad (encapsulación, necrosis o hemorragia). Los nódulos de bajo grado miden alrededor de 1 cm y tienen baja probabilidad de transformación maligna. Los nódulos de alto riesgo son menos frecuentes y se caracterizan por una mayor densidad celular con un patrón trabecular característico. En ocasiones estos nódulos son difícilmente diferenciables de CHC y se malignizan hasta en un tercio de los casos.

Los CHC se pueden dividir igualmente en función de su morfología macroscópica, grado de diferenciación, vascularización, presencia de cápsula y de invasión vascular. Todos estos criterios tienen implicaciones en la práctica clínica diaria. Según su distribución pueden comportarse como nódulos solitarios o multinodulares, que puede presentarse como múltiples nódulos a nivel de diferentes segmentos o como una gran masa tumoral dominante rodeada de metástasis intrahepáticas localizadas en los segmentos adyacentes. Los CHC difusos son extremadamente raros y se presentan como grandes masas infiltrativas que se consideran un reto en el diagnóstico por imagen. Un tercer tipo de CHC es el de tipo infiltrativo que típicamente es pobremente diferenciado. Desde el punto de vista de diferenciación celular, el CHC presenta diferentes grados, conocidos como los grados de Edmondson,

que van desde bien diferenciados, moderadamente diferenciados, pobremente diferenciados e indiferenciados. El grado de diferenciación disminuye a medida que el tumor aumenta de tamaño. Los HCC bien diferenciados presentan una estructura muy similar a los hepatocitos normales por lo que su diagnóstico histológico es difícil. El análisis inmunohistoquímico puede ayudar a establecer el diagnóstico con certeza.

La vascularización es un parámetro clave en la diferenciación entre nódulos no neoplásicos y CHC. La progresión de nódulos de bajo riesgo a CHC se observa en la pérdida de los tractos portaes y desarrollo de una nueva triada de vasos arteriales que derivan el flujo de sangre a la lesión tumoral. Esta neoangiogénesis ha sido considerada una adecuada diana terapéutica tanto en el uso de quimioembolización como de tratamientos moleculares oncológicos anti-angiogénicos.

Los nódulos tumorales suelen estar rodeados de una cápsula fibrótica. Esta cápsula aparece en el 80% de los CHC resecaos y suele estar infiltrada por células tumorales. Esta invasión microscópica de la cápsula por células tumorales está presente al menos en un tercio de los tumores mayores de 2 cm en comparación con dos tercios presentes en los casos de tumores de mayor tamaño.

El CHC tiene gran tendencia a la invasión vascular y a su localización extendida. La invasión portal es más frecuente en el subtipo expansivo, en tumores grandes y en los pobremente diferenciados. La invasión microscópica aparece en el 20% de tumores de 2 cm, 30-60% de aquellos entre 2-5 cm y 60-90% de aquellos mayores de 5 cm. La presencia de invasión portal es el factor predictivo más importante de recurrencia tumoral. Una vez que el CHC infiltra el

tracto portal, los trombos tumorales se desarrollan y avanzan en ambas direcciones y en particular hacia la vena porta principal. Como consecuencia de esto, fragmentos tumorales pueden extenderse a través del hígado y obstruir ramas segmentarias. Una vez que el trombo se ha establecido en la rama principal de la porta hay un alto riesgo de trombosis completa y por tanto de incremento de la presión portal lo que puede provocar ruptura de varices esofágicas, descompensación hidrópica con aparición de ascitis y encefalopatía. Aunque con menos frecuencia, el trombo puede afectar a las venas suprahepáticas y llegar a aurícula derecha con el consecuente desarrollo de metástasis pulmonares. Rara vez se produce invasión de ramas biliares y aparición de hemobilia.

La incidencia de invasión de la vena porta, vena hepática y vía biliar en el momento del diagnóstico es de 15, 5 y 3%, respectivamente. Durante la evolución natural del tumor, aproximadamente uno de cada tres pacientes desarrollará un trombo a nivel portal. Las metástasis suelen localizarse a nivel de pulmones. Otras localizaciones en orden de frecuencia decreciente son: adrenales, hueso, nódulos linfáticos, meninges, páncreas, cerebro y riñón. La afectación bilobar, el tamaño tumoral y la pobre diferenciación son factores que influyen en el desarrollo de metástasis.

1. 2. EXPRESIÓN CLÍNICA DEL CHC

1.2.1.- EPIDEMIOLOGÍA

El CHC es de presentación universal, pero la incidencia tiene variaciones geográficas. Ya establecimos al principio del texto que existen regiones de alta incidencia geográfica (15-100 casos por 100.000 habitantes/año) localizadas en el extremo oriente y el África subsahariana. Son regiones de mediana incidencia (5-10 casos por 100.000 habitantes/año) los países del área mediterránea y se consideran regiones de baja incidencia (3-5 casos por 100.000 habitantes/año) los países del norte de Europa, Australia y América (19). Estas variaciones geográficas van en paralelo a factores raciales o genéticos y a factores ambientales. En aquellos países cuya incidencia va ligada etiopatogénicamente al VHC y la esteatohepatitis no alcohólica, la incidencia parece ir en aumento. La alta incidencia de infección por VHC entre los años 1960 y 1990 (20, 21) hace prever un aumento de la incidencia del CHC en los próximos años, sobre todo atendiendo al periodo de latencia comprendido entre 20 a 30 años que transcurre entre la infección por virus y el desarrollo de cirrosis y HCC. En nuestro entorno social se ha calculado que el VHC infecta a entre un 1-2,64% de la población general. De ellos, entre el 20-30% desarrollará cirrosis y entre el 3-5% evolucionará a CHC de forma que más del 70% de los CHC en nuestro país se asocian a la infección por VHC. La edad de presentación más frecuente es entre la sexta y la séptima décadas de la vida, salvo en las zonas de alta incidencia donde la edad de presentación es más temprana, en la tercera y la cuarta décadas de la vida.

Es más frecuente en varones con una proporción de entre 2:1 y 6:1, dependiendo del área geográfica. En España en el año 2007 se registraron 7.500 ingresos hospitalarios por cáncer hepático o de vías biliares, y según los registros de mortalidad, se produjeron un total de 2.437 defunciones por CHC (637 mujeres y 1.800 varones). (22,23). En Cataluña los ingresos hospitalarios fueron 1.543 y las defunciones 493 (139 mujeres y 354 varones). En el Hospital Vall d'Hebrón un total de 165 pacientes ingresaron en el año 2007 por CHC, pero solo 24 pacientes (14,5%) fueron sometidos a cirugía.

1.2.2.- PRESENTACIÓN CLÍNICA

Hay principalmente tres situaciones de diagnóstico:

- Hallazgo casual durante un estudio de rutina.
- Hallazgo casual durante estudio de rutina en pacientes con alteración de la función hepática o con otra condición patológica.
- Presentación mediante síntomas relacionados con el tumor: la severidad de los síntomas está relacionada con el estadio del tumor y con la función hepática del hígado sano.

Habitualmente el CHC en estadios iniciales no presenta síntomas. Puesto que la mayoría de ellos se desarrollan sobre un hígado cirrótico, el paciente puede padecer los síntomas propios de la cirrosis. La descompensación de un cirrótico debe hacer pensar en la aparición de un CHC entre otras causas de descompensación (24). Un porcentaje mínimo de pacientes, cuyo CHC se desarrolla sobre un hígado sano, puede presentar síntomas inespecíficos del tipo dolor, pérdida de peso, masa palpable, etc (25). Existen series en las cuales, de los pacientes sometidos a HP el 74% tenían una cirrosis de base

(66% Child-Pugh A y 8% Child-Pugh B); el 20% presentaban diferentes grados de hepatopatía crónica y el 6% un hígado sano. Entre los pacientes sometidos a TH el 96,5% tenían cirrosis de base (48% Child-Pugh A, 40% Child-Pugh B, 8,5% Child-Pugh C), el 2% un CHC sobre hepatopatía crónica y el 1,5% tenían un hígado sano. Todos, excepto los casos presentados sobre hígado sano, fueron diagnosticados en el transcurso de controles rutinarios de la hepatopatía de base (26). Han sido descritas en la literatura otras presentaciones más raras, como son ictericia obstructiva cuando la tumoración comprime la vía biliar, hemobilia si la tumoración se rompe hacia el conducto biliar, hemoperitoneo si se rompe hacia el peritoneo (5-15%), dolor óseo o disnea si la presentación es metastásica, fiebre si el CHC es grande y presenta necrosis central tumoral, etc. Algunos pacientes pueden presentar síntomas diversos secundarios a síndrome paraneoplásico. Los más frecuentemente descritos son hipoglucemia producida por gran metabolismo energético del tumor y secreción de sustancias semejantes a la insulina, eritrocitosis por secreción de eritropoyetina, hipercalcemia por secreción de proteínas relacionadas con la paratohormona, diarrea acuosa por secreción de péptidos intestinales vasoactivos del tipo de prostaglandinas, y síntomas cutáneos diversos (dermatomiositis, pénfigo, queratosis seborreica, pitiriasis, porfiria cutánea tarda, etc.). En ocasiones puede presentar síntomas propios de los lugares a los que metastatiza más frecuentemente (pulmón, ganglios linfáticos, huesos, suprarrenal y cerebro).

1.3.- DIAGNÓSTICO

1.3.1.- PRUEBAS DE IMAGEN

El diagnóstico de sospecha se realiza habitualmente mediante las pruebas de imagen. El objetivo de estas pruebas es el cribado de pacientes de alto riesgo, la identificación de pequeñas lesiones, el diagnóstico diferencial entre las lesiones ocupantes de espacio (LOEs) y la selección del tratamiento adecuado para cada paciente (27).

El número de lesiones, el tamaño y su extensión, la presencia de nódulos satélites, invasión vascular, afectación extrahepática y enfermedad subyacente del hígado, son factores importantes a la hora de elegir el mejor tratamiento.

- *Ecografía*

La imagen ecográfica puede ser hipoecoica, isoecoica o hiperecoica. Se le atribuye una sensibilidad del 60% (disminuye considerablemente en la cirrosis avanzada) y una especificidad del 97%. Identifica el 85- 95% de las lesiones de 3-5 cm y el 60-80% de los tumores de 1 cm aunque esto puede estar influenciado por la localización del tumor.

Los tumores pequeños, suelen aparecer como imágenes hipoecoicas y homogéneas que a veces dificultan el diagnóstico diferencial de nódulos displásicos no neoplásicos. A medida que aumentan de tamaño, suelen adquirir un aspecto heterogéneo y pueden ser hipo o hiperecoicos con un anillo hipoecogénico alrededor que corresponde a la cápsula fibrosa.

Su utilidad para el estudio de extensión de la enfermedad es limitada, principalmente por la baja sensibilidad en la detección de las metástasis intrahepáticas menores de 2 cm y por su escasa capacidad para detectar infiltración de estructuras vasculares sobre todo en hígados cirróticos. La aplicación del Doppler puede poner de manifiesto una arteria nutricia o las venas de drenaje. También en la ecografía pueden ponerse de manifiesto, signos indirectos de cirrosis como ascitis, atrofia de algún segmento, esplenomegalia, circulación colateral.

Las nuevas tecnologías ecográficas con contraste son muy prometedoras en la mejoría del diagnóstico sin embargo no parece que aumenten su sensibilidad (28).

- *Tomografía computarizada (TC) abdominal.*

Se le atribuye una sensibilidad del 68% y una especificidad del 93%. La hiperintensidad en fase arterial con hipointensidad en fase portal y venosa permite el diagnóstico en tumores > 2 cm. En CHC menos vascularizados de menos de 2 cm la dificultad diagnóstica puede ser mayor. En ocasiones la hiperintensidad puede estar asociada a depósitos de hierro o a infiltración grasa. Aporta la ventaja de poder valorar la infiltración vascular.

- *Resonancia magnética (RM) abdominal.*

Es la prueba de elección para el diagnóstico diferencial del CHC con otros tumores hepáticos sobre todo mayores de 2 cm. El patrón típico del CHC es un patrón en mosaico y la presencia de cápsula (29).

Tiene la ventaja de no requerir contraste nefrotóxico, por lo que estaría indicada en pacientes con insuficiencia renal o pacientes con alergia a los contrastes. El patrón de captación es hiperintensidad en T2 e hipointensidad en T1 (54%) o hipointenso en T1 e hiperintenso en T2 (16%).

Se le atribuye una sensibilidad de 81% y una especificidad del 85%. Las nuevas técnicas de angiorresonancia trifásica consiguen una alta sensibilidad al detectar nódulos de hasta 10 mm. Se le atribuye una mayor precisión en diferenciar el CHC de los nódulos displásicos, el hemangioma y la esteatosis focal.

La TC y la RM presentan una mayor sensibilidad para determinar la extensión de esta neoplasia; aun así, subestiman el 30-50% de los casos cuando se comparan con el estudio patológico del explante hepático. Recientemente se ha comparado la eficacia diagnóstica de la angiorresonancia magnética y la TC espiral para el estudio de extensión del CHC (30). La angiorresonancia fue superior a la TC para el diagnóstico de tumores de 10-20 mm (el 76 frente al 61%; $p = 0,001$), mientras que no hubo diferencias entre las dos técnicas en cuanto a la detección de tumores con diámetro mayor de 2 cm o menor de 1 cm. Por tanto, se propone la angiorresonancia magnética como la técnica más adecuada para el estudio de extensión del CHC previo a la aplicación de tratamientos con una sensibilidad del 100% para nódulos mayores de 2 cm, 89% para aquellos de 10 a 20 mm y 34% para nódulos de menos de 1 cm.

- *Angiografía*

Es una técnica que ha dejado de utilizarse para el diagnóstico puro. Sigue siendo utilizada para tratamiento en casos de quimioembolización o para

control de un hemoperitoneo secundario a rotura de CHC. Aparecen falsos negativos en casos de tumores necróticos, avasculares o fibróticos.

- *Angiografía combinada con TC o RM abdominal.*

Es muy invasiva y no parece obtener mejores resultados que el TC o la RMN.

- *Gammagrafía con tecnecio-99m marcado con una antialfa-fetoproteína.*

Es una técnica con limitada experiencia.

- *Tomografía por emisión de positrones (PET)-TC.*

El papel de la PET-TC en el diagnóstico del CHC es incierto. El CHC acumula cantidades variables de 18F-fluorodesoxiglucosa lo que limita su sensibilidad al 55-65% con muchos falsos positivos y negativos. En cambio, tiene mejor sensibilidad para detectar metástasis a distancia siempre que sean mayores de 1 cm. Así, en las metástasis pulmonares tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 84%; en las metástasis ganglionares, una sensibilidad del 100% y una especificidad del 94%.

1.3.2.- MARCADORES SEROLÓGICOS

Los marcadores serológicos ayudan a complementar el diagnóstico por la imagen. El más conocido es la α -fetoproteína (Ver apartado de MARCADORES BIOLÓGICOS).

Otros marcadores serológicos, que no han superado a la α -fetoproteína (AFP), son la lecitina, la des- γ -carboxiprotrombina, las isoenzimas de la γ -

glutamiltranspeptidasa, el factor de crecimiento β -1 urinario, las moléculas de adhesión intercelular de tipo 1 y la α -L-fucosidasa sérica.

Cada vez están cobrando más importancia los estudios de biología molecular. Se han estudiado numerosos marcadores para el diagnóstico precoz del CHC mediante las firmas genéticas o patrones diferenciales de expresión proteica. Incluso existen diferentes marcadores moleculares que nos permitirían clasificar los CHC de acuerdo con el mecanismo de activación que utilicen: la vía de la Wnt-catenina, la vía de la proliferación (asociada a alteraciones de los cromosomas), u otras vías. Todo esto se expondrá con más detalle en el apartado de “Marcadores Biológicos”.

1.3.3-. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

La confirmación del diagnóstico se lleva a cabo por citología e histología. La biopsia no está indicada de rutina en pacientes cirróticos sobre todo por el riesgo de hemorragia, aparición de dolor y posibilidad de siembre tumoral en el trayecto de la aguja (1-5%) o extensión vascular. Con PAAF se han publicado hasta 30-40% de falsos negativos.

1.3.4-. ALGORITMO DIAGNÓSTICO DEL CHC

Como hemos visto, para el diagnóstico de CHC disponemos de técnicas radiológicas, determinación de valores de AFP y de otros biomarcadores y biopsia. La secuencia en la utilización de éstas depende del tamaño de la lesión en la ecografía abdominal (tabla 2) (31):

- Si se aprecia un nódulo mayor de 2 cm (sobre hígado cirrótico) en la ecografía abdominal, con características radiológicas (lesión hipervascular en fase arterial que se lava en fase venosa) de CHC en una prueba dinámica (TC o RM con contraste) o con AFP superior a 200 ng/ml, no es precisa la biopsia. Sin embargo, aquéllos con un aspecto radiológico atípico o que se detectan en un paciente sin cirrosis deben someterse a biopsia. Posteriormente expondremos el seguimiento de los pacientes cirróticos en el cribaje de CHC.
- Los nódulos de 1-2 cm de diámetro deben estudiarse con 2 pruebas dinámicas. Si el aspecto radiológico en 2 técnicas es típico de CHC, debe tratarse como si lo fuera; si los hallazgos en las 2 pruebas no son coincidentes o no muestran características típicas de CHC, debe realizarse biopsia de la lesión.
- Las lesiones menores de 1 cm deben someterse a ecografías periódicas cada 3-6 meses; si en un período de 2 años la lesión no ha aumentado de tamaño, se continuará con el esquema de detección previo.

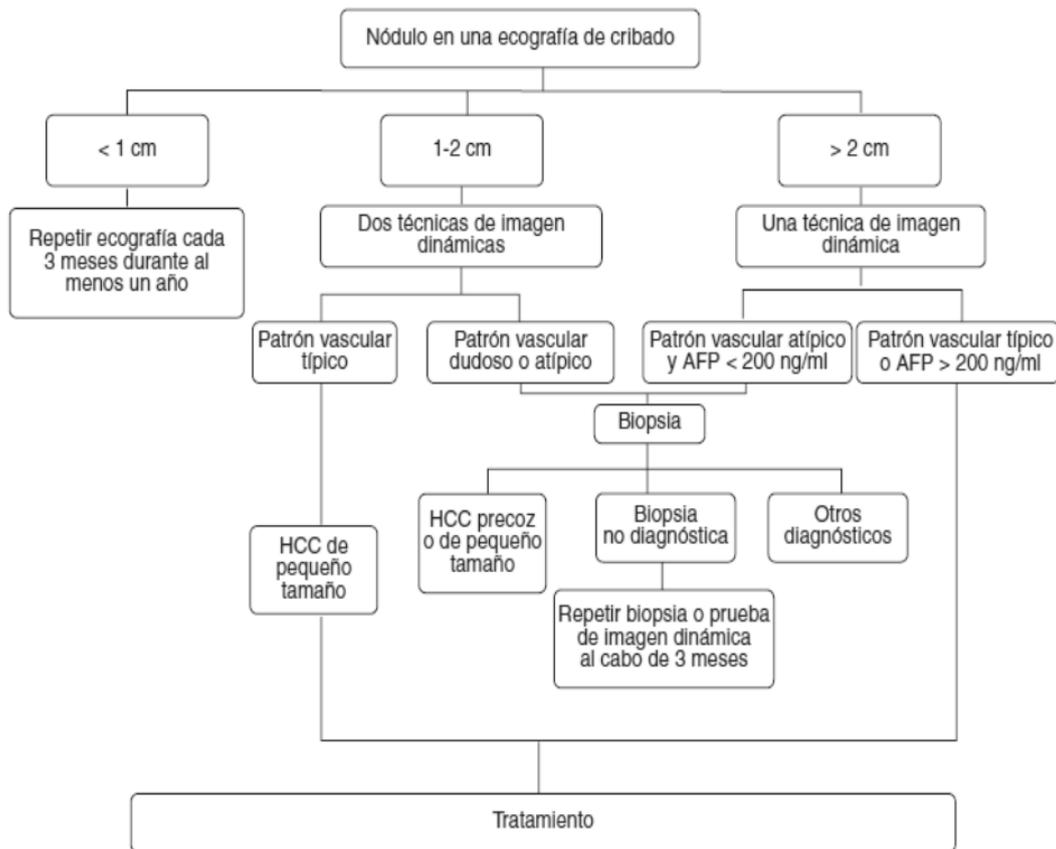


Tabla 2. Algoritmo diagnóstico del HCC

1.4.- EVOLUCIÓN NATURAL Y SISTEMAS DE ESTADIFICACIÓN

Tradicionalmente, la historia natural del CHC es la de un tumor de pronóstico infausto de manera que la esperanza de vida se expresa habitualmente en semanas. En un análisis reciente de los resultados de grupos controles de estudios controlados y aleatorizados, la media de supervivencia en pacientes con enfermedad avanzada y síntomas asociados al tumor es de 6 meses (32). En un 50-60% de estos casos la mortalidad está relacionada con el propio tumor, mientras que el sangrado y el fallo hepático son responsables del resto de los fallecimientos (30-10%). En el caso de pacientes no tratados y con

enfermedad no terminal en el momento del diagnóstico el pronóstico es mejor de lo esperado, llegando a supervivencias de 2 (40-56%) y 3 años (13-28%).

En pacientes asintomáticos y sin invasión tumoral la supervivencia puede llegar a 3 años en el 50% de los pacientes. Estos datos se basan en el diagnóstico de la enfermedad en estadios precoces donde aún la función hepática está conservada, dado que esta última condiciona por sí misma la indicación, la aplicabilidad y el éxito del posible tratamiento.

El objetivo principal de los sistemas de estadificación es predecir la evolución de estos pacientes. También permite anticiparnos al pronóstico de la enfermedad y ayuda en el momento de elegir el tratamiento. La supervivencia de estos pacientes viene influenciada sobre todo por la extensión local del tumor, la presencia y la gravedad de los síntomas asociados a la enfermedad y al grado de severidad y evolución de la cirrosis subyacente (33).

No obstante, en el caso del CHC no ha sido posible elaborar un sistema de clasificación pronóstica y estadificación aceptado de forma universal y podemos encontrar más de 8 clasificaciones pronósticas (34). Esto se debe a que el CHC es una enfermedad muy heterogénea según las distintas zonas del mundo (35), lo que refleja los diferentes factores de riesgo y epidemiológicos existentes. Los factores pronósticos claves se conocen sólo parcialmente y varían en cada estadio evolutivo de la enfermedad.

Los sistemas de estadificación más recientes intentan incluir los tres parámetros más importantes:

- Aunque la estadificación inicial se ha basado en la clasificación TNM (Tabla 3) las particularidades fisiopatológicas de este tumor han obligado a la implementación de ciertas modificaciones en países de oriente

(Liver Cancer Study Group of Japan) y occidente (American Joint Committee on Cancer, International Union against Cancer). En estos casos se analiza el número de tumores, tamaño y la presencia de invasión vascular. Una limitación de esta clasificación es que está basada en hallazgos patológicos y por tanto solo puede ser aplicada con precisión en pacientes operados.

- Los síntomas relacionados con la enfermedad tienen un impacto negativo en la evolución del paciente, siendo el dolor el que indica un peor pronóstico.
- La clasificación de Child Pugh (Tabla 4) ha sido un buen indicador del daño hepático. Esto permite establecer la reserva funcional hepática en pacientes cirróticos que van a ser sometidos a cirugía de la hipertensión portal sin embargo no es apropiada para pacientes cuyas opciones terapéuticas incluyen el trasplante hepático o la resección quirúrgica.

Tabla 3. Clasificación TNM

TUMOUR	
TX	unable to assess primary tumour
T0	no evidence of primary tumour
Tis	carcinoma in situ
T1	solitary tumour without vascular invasion
T2	solitary tumour with vascular invasion OR multiple tumours <5cm in size
T3a	multiple tumours, at least one of which is >5cm in size
T3b	tumour(s) of any size involving a major portal or hepatic vein branch
T4a	tumour(s) of any size invading adjacent organs other than the gallbladder OR invading through the visceral peritoneum
NODES	
NX	unable to assess regional lymph nodes
N0	no regional lymph node involvement
N1	regional lymph node involvement
METASTASIS	
M0	no distant metastasis
M1	distant metastasis

stage	TNM classification
0	Tis, N0, M0
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
IIIA	T3a, N0, M0
IIIB	T3b, N0, M0
IIIC	T4, N0, M0
IVA	T1/2/3/4, N1, M0
IVB	T1/2/3/4, N0/1, M1

Tabla 4. Clasificación de Child Pugh

CLASIFICACIÓN DE CHILD PUGH

	1	2	3
Ascitis	NO	LEVE	SEVERA
Encefalopatía	0	I-II	III-IV
TP	< 4	4-9	10 y mas
Albúmina Serica (g%)	> 3.5	2.8-3.5	<2.8
Bilirrubina Total (mg%)	1-2	2-3	> 3

5-6 puntos Child-Pugh A
 7-9 puntos Child-Pugh B
 10 o más puntos Child- Pugh C⁽¹⁶⁾

En 2001 el panel de expertos de la European Association for the Study of the Liver (EASL) (36) elaboró un documento en el que se concluye que los

principales factores pronósticos del CHC son el estadio tumoral, el grado de disfunción hepática, el estado general del paciente y la eficacia del tratamiento.

A partir de entonces se han desarrollado diversos sistemas multidimensionales como el sistema Okuda (37), el Cancer Liver Italian Program (CLIP) (38), el Chinese University Prognostic Index (CUPI) (39), el Japan Integrated Staging score (JIS) (40), el Groupe d'Étude et de Traitement du Carcinoma Hepatocellulaire (GRETCH) (41) y el BCLC (42). Todos estos sistemas de estadificación se han elaborado a partir de la evaluación de cohortes de pacientes que analizan la relación de varias características con la supervivencia y no tiene validez externa.

Tabla 5. Japan Integrated Staging Score

Variables	Scores			
	0	1	2	3
Child-Pugh stage	A	B	C	
TNM stage by LCSGJ	I	II	III	IV
LCSGJ, Liver Cancer Study Group of Japan.				

Las variables incluidas en cada clasificación son diferentes, lo que revela la heterogeneidad del método y de la población utilizada para elaborar los modelos. Recientemente la American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) (43) ha publicado las guías clínicas para el manejo del CHC, en las que aconseja utilizar el sistema pronóstico BCLC por ser el único que ha probado clasificar adecuadamente a pacientes en todos los estadios evolutivos y por ser el único también que vincula cada estadio de enfermedad con el tratamiento.

1.4.1- SISTEMA BCLC

En 1999 el grupo de Oncología Hepática del Hospital Clínic de Barcelona publicó una clasificación pronóstica del CHC que identificaba cada estadio tumoral (inicial, intermedio, avanzado y terminal) con el tratamiento indicado y la supervivencia estimada. El BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) comprende los siguientes parámetros:

- El estado general del paciente (performance status del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (Tabla 6), la extensión tumoral (tumor único frente a múltiple con/sin invasión vascular) y la función hepática, estimada mediante el gradiente de presión portal hepática (< 10 mmHg), la bilirrubina sérica y la clasificación de Child-Pugh. La clasificación pronóstica del CHC del BCLC, (Tabla 7) (44) es la siguiente:
 - Estadio muy inicial (BCLC 0). Para tumores menores de 2 cm se ha establecido recientemente el concepto de carcinoma *in situ*. Se trata de un tipo de CHC muy bien diferenciado, que contiene ductos biliares y vasos portales, con poca apariencia de nódulo y que por definición no es invasivo. En los estudios radiológicos el carcinoma *in situ* se manifiesta característicamente como lesiones hipovasculares, mientras que el resto son hipervasculares. Estos pacientes serían los candidatos óptimos para realizar una ablación. En Japón estos pacientes presentan la mejor supervivencia tras la resección (supervivencia a los 5 años del 89-93%) o con tratamientos

percutáneos (supervivencia a los 5 años del 71%). Asimismo, la probabilidad de recidiva a los 3 años es significativamente menor que en tumores también de diámetro inferior a 2 cm pero que no se comportan como la entidad carcinoma *in situ* (el 8 frente al 74%).

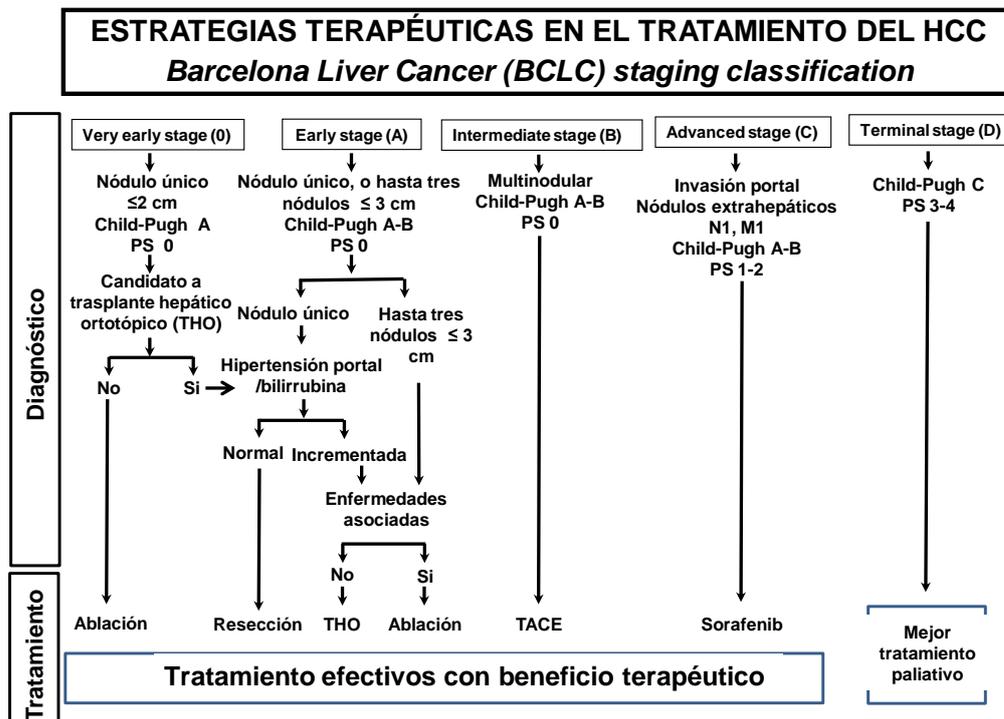
- Estadio temprano (BCLC A). Incluye a pacientes con tumor único o 3 nódulos de 3 cm o menos, que están asintomáticos y que son adecuados para recibir tratamientos radicales: resección, TH o ablación percutánea. Si el tumor es único y menor de 5 cm, y el paciente presenta un excelente estado clínico, con cifras normales de bilirrubina sérica y sin hipertensión portal significativa, el tratamiento ideal sería la resección quirúrgica, con la que se obtiene una supervivencia superior al 70% a los 5 años. En los casos de tumor múltiple (3 o menos nódulos ≤ 3 cm) en que no hay comorbilidad significativa, o bien si el paciente no es candidato a resección quirúrgica por mala función hepática, se recomienda el TH. En las situaciones en que la cirugía esté contraindicada, el tratamiento percutáneo es una buena alternativa y ofrece una supervivencia superior al 50% a los 5 años.
- Estadio intermedio (BCLC B). Engloba a pacientes asintomáticos con tumores multifocales sin invasión vascular, con buen estado general y buena función hepática. Estos pacientes serían candidatos a quimioembolización intraarterial hepática, con una supervivencia media del 50% a los 3 años.

- Estadio avanzado (BCLC C). Corresponde a pacientes con tumores sintomáticos, estado general 1 o 2 del ECOG y/o invasión vascular o metástasis extrahepáticas. En este estadio no hay consenso, dado que ningún tratamiento ha mejorado significativamente la supervivencia. Estos pacientes serían candidatos para entrar en ensayos clínicos aleatorizados y controlados que valoren la eficacia de nuevos tratamientos. La supervivencia media estimada es de 6 meses.
- Estadio terminal (BCLC D). Define a pacientes con estado general 3 o 4 del ECOG y/o Child-Pugh C. La supervivencia media es de 3 meses y el único tratamiento recomendado es el sintomático paliativo.

Tabla 6: Eastern Cooperative Oncology Group

E.C.O.G.	
0	Asintomático. Totalmente activo.
1	Restricción actividad intensa. Capaz de trabajo ordinario
2	Ambulatorio y capaz de autocuidados. Incapaz para trabajar. Levantado más del 50% del tiempo despierto.
3	Capaz de algún autocuidado. Vida cama-sillón más del 50% del tiempo despierto.
4	Incapacidad total. Silla-cama el 100% del tiempo despierto.
5	Muerto

Tabla 7: estadiaje y tratamiento. BCLC 2016



Una conferencia de consenso entre la AJCC y la Asociación Americana de hepato-bilio-pancreática estableció en el 2002 que los pacientes considerados para cirugía (resección o trasplante) debían estadiarse de acuerdo al sistema TNM y BCLC (45), mientras que los demás podían estadiarse usando el sistema CLIP.

El pronóstico está marcado por las recurrencias hepáticas, que alcanzan hasta el 60% tras 5 años de seguimiento, y que sobre todo en los tumores grandes se producen en los primeros 2 años tras la resección. Además, el 80% de la mortalidad tardía también se debe a la recidiva hepática lo que resalta la importancia del diagnóstico temprano, tanto del tumor primario como de las recidivas, para conseguir unos resultados óptimos.

1.5. TRATAMIENTO

Al analizar los tratamientos disponibles para el CHC hay que tener en cuenta que en la actualidad no hay ensayos clínicos de gran tamaño ni metaanálisis de datos individuales, por lo que los niveles de evidencia en esta área se derivan de metaanálisis de datos agrupados, de ensayos clínicos aleatorizados de pequeño tamaño o de estudios de cohortes.

Los tratamientos curativos únicamente pueden aplicarse a los pacientes diagnosticados en fases tempranas de la enfermedad. Por este motivo, las principales guías de consenso recomiendan la creación de programas de vigilancia mediante ecografía y determinación de AFP.

Como hemos señalado previamente, el pronóstico de los pacientes con CHC depende no sólo de la extensión tumoral, sino también de la función hepática, ya que ésta condiciona en muchos casos la supervivencia y la aplicabilidad de los tratamientos.

En el caso de HCC complicados con sangrado, no está contraindicado administrar tratamiento. Si el tumor sangra de forma activa y no es tratado, la mortalidad es del 100%. Las diferentes opciones van desde packing, ligadura de arteria hepática, puntos hemostáticos o resección del tumor.

1.5.1-. RESECCIÓN

No existe un acuerdo sobre una estrategia común de tratamiento para los pacientes con CHC por lo que se han publicados múltiples guías (46-48). Las tres intervenciones terapéuticas curativas principales (resección, TH y

tratamientos percutáneos) compiten por ser la primera opción terapéutica en aquellos pacientes con HCC de pequeño tamaño y con función hepática conservada.

Se ha demostrado que tanto la resección hepática como el TH aportan las mejores cifras de supervivencia en pacientes bien seleccionados (supervivencia a 5 años del 60-70%) (49). Los autores japoneses utilizan la indocianina para identificar los mejores candidatos, mientras que la presión portal y bilirrubina son los parámetros utilizados en Europa.

La resección hepática es la primera opción terapéutica curativa para el HCC. El hecho de que en nuestro medio el CHC se desarrolle sobre hígado cirrótico reduce las posibilidades de resección quirúrgica, sin embargo, el hígado sano permite resecciones hepáticas muy amplias, de hasta un 70% únicamente limitadas por aspectos técnicos.

La resección hepática está indicada en:

- Tumores únicos hepáticos (en general no hay límite de tamaño como criterio de selección).
- Sin invasión vascular.
- Sin hipertensión portal.
- Con buena función hepática y bilirrubina normal.

Según el estadiaje TNM, correspondería a los pacientes en los estadios I, II, IIIA, incluyendo los casos de rotura peritoneal. La cirrosis es el factor más determinante a la hora de valorar la resecabilidad del CHC, puesto que de la gravedad de la cirrosis depende la reserva funcional hepática y la capacidad de

regeneración del parénquima remanente, de manera que solo podría llevarse a cabo la resección en pacientes con Child-Pugh A y en casos controvertidos algunos Child-Pugh B. La resección en pacientes con estadios B y C de Child-Pugh o de tumores múltiples presenta una morbimortalidad muy alta y malos resultados a largo plazo (50).

La cirugía del CHC debe ser oncológica (margen de resección mayor de 1 cm) y preservar parénquima suficiente para evitar la insuficiencia hepática. La técnica habitual consiste en movilización del hígado, seguida de control vascular y seguida de la resección.

Las nuevas armas instrumentales han revolucionado la estrategia técnica, de manera que algunos autores preconizan en primer lugar la transección hepática hasta llegar a la vena cava inferior; en segundo lugar, la ligadura de los vasos del hilio hepático y de la vena suprahepática y, en tercer lugar, la movilización del hígado. No hay estudios que demuestren la ventaja de una u otra estrategia para reducir la recurrencia de la enfermedad y mejorar la supervivencia. Un aspecto importante en la resección es la cantidad y calidad de hígado remanente que debe ser suficiente para mantener las funciones vitales del individuo. Como estrategia para aumentar este hígado, algunos autores utilizan la embolización portal previa a la resección (51). Así, pacientes que inicialmente no son candidatos a cirugía, pueden serlo tras la embolización. Y viceversa, pacientes inicialmente resecables no lo serán por progresión de la enfermedad en el intervalo de espera existente entre los dos tiempos de esta estrategia (52). Se ha demostrado que la embolización portal preoperatoria provoca una disminución de la tasa de complicaciones de hasta 50% con la disminución por tanto de la estancia hospitalaria. Si tras la

embolización el porcentaje de hígado remanente no crece más de un 10% se debería contraindicar la resección ya que además este es un marcador indirecto de la capacidad de regeneración hepática.

Para evitar el crecimiento tumoral acelerado de nódulos existentes en el hígado remanente en casos de CHC bilobar, algunos autores asocian la quimioembolización arterial de los nódulos del hígado remanente con la embolización portal del hígado que se va a reseccionar. En general, la embolización portal debe ser considerada en casos de volumen remanente inferior al 20% en hígado sano y < 40% en hígado cirrótico.

La morbilidad es variable, del 13 al 60% según las series, y la mortalidad perioperatoria a 30 días tras la resección varía del 1 al 24%. Las tasas son más altas para los cirróticos (entre el 14 y el 24%) que para los no cirróticos (entre el 1 y el 7%). Las principales causas de muerte de esta cirugía suelen ser la insuficiencia hepática que está íntimamente relacionada con las pérdidas sanguíneas superiores a 1.500 ml y las infecciones postoperatorias. En los grupos orientales se utiliza el test de aclaramiento de verde de indocianina para estimar la cuantía de resección tolerable, mientras que la medición de la presión portal y los valores de bilirrubina sérica son los parámetros utilizados en Occidente (53).

Se han descrito supervivencias libres de enfermedad de entre el 32% y el 62% de los casos y supervivencia del 10 al 90% a 5 años. Esta gran variabilidad depende de factores relacionados con el tumor (tamaño, margen de resección, invasión vascular, presencia de cápsula, grado histológico, actividad de α -fetoproteína, etc.) y de factores relacionados con la enfermedad

de base (estadio Child-Pugh, comorbilidades asociadas, etc.), que son los más preponderantes (54).

Respecto a la recurrencia del tumor, hay series que reflejan hasta una tasa de recurrencia del 70% a los 5 años, más elevada en cirróticos, que se debe a diseminación del tumor primario o por aparición de tumores *de novo*, sin apreciarse resultados favorables con ninguna terapia adyuvante sobre este hecho mientras que se considera que la transfusión intraoperatoria de sangre favorece la aparición. En la mayoría de las ocasiones la recurrencia se produce por diseminación del tumor primario y aparece en el primer año (40%), tercer año (60%) y a los 5 años (80%). La realización de una nueva resección es factible en aproximadamente la cuarta parte de los pacientes, pero la recidiva tras esta segunda resección es más precoz y, cuando aparece, lo habitual es que no se pueda resear ni pueda ofrecerse el TH como opción terapéutica (55) ya que suele ser multifocal en más de un 50% y se asocia a un 15% de metástasis a distancia.

Se ha demostrado que la supervivencia también está influenciada por los márgenes de resección de manera que un margen menor de 1 cm se asocia a una supervivencia a los 5 años del 49% mientras que si se amplía a 2 cm la supervivencia puede alcanzar cifras de 75% tras 5 años.

1.5.2-. TRASPLANTE HEPÁTICO

El TH es la segunda opción terapéutica curativa para el CHC. Debe considerarse como la primera opción para aquellos pacientes con enfermedad

hepática avanzada (Child-Plug B y C) (56) ya que, en teoría, puede curar la cirrosis subyacente y la enfermedad tumoral.

En el caso de pacientes con estadio A de Child-Pugh y tumor resecable, la indicación es controvertida (57). Actualmente no se dispone de estudios prospectivos y controlados que comparen estas 2 opciones, pero los estudios retrospectivos favorecen el TH frente a la resección. En estos pacientes, la supervivencia a largo plazo con TH es mejor que con resección (supervivencia a los 5 años del 75%), además de presentar una menor tasa de recidiva.

El CHC supone una de las principales indicaciones de TH en nuestro medio. Asimismo, es la única neoplasia sólida que puede ser tributaria de curación mediante trasplante del órgano afectado (58). En la época inicial del TH, los pacientes afectados de CHC no subsidiario de resección quirúrgica presentaban un pésimo pronóstico a corto plazo y no disponían de un tratamiento alternativo eficaz. Por tal motivo, se planteó la posibilidad de realizar un TH como opción terapéutica. La inclusión de pacientes con enfermedad avanzada determinó unos resultados subóptimos, con una tasa de recidiva inadmisibles que hizo cuestionar a algunos grupos de investigadores la indicación de TH en estos pacientes.

La experiencia y los conocimientos acumulados durante años por los pioneros en trasplante permitieron sentar las bases para un uso racional de los órganos disponibles y evitar la indicación de un tratamiento quirúrgico altamente complejo, costoso e invasivo a pacientes que no se beneficiarían de él, consolidando esta opción como un tratamiento válido en la práctica clínica convencional.

La decisión de qué pacientes deben considerarse para TH y dónde se deben establecer los límites para indicarlo ha de estar basada en estudios científicos sólidos, de manera que la política sanitaria se ajuste al concepto de medicina basada en la evidencia y no en ideas bien intencionadas con escasa base racional y dirigida a casos anecdóticos.

La limitación del trasplante es la escasez de donantes y, por tanto, el tiempo en lista de espera, lo que puede hacer progresar la enfermedad (59).

Los diferentes sistemas de priorización de órganos según la gravedad de la hepatopatía (sistema MELD) pueden favorecer o penalizar el CHC en razón de la puntuación ponderada que se le adjudique. En Cataluña, donde está implantado el sistema MELD, los CHC únicos con un tamaño mayor de 3 cm o más de un nódulo (ninguno mayor de 3 cm), están priorizados con un MELD ponderado de 19 puntos, y se les asigna un punto adicional cada tres meses en lista de espera (documento de consenso de la OCATT-2007 sobre los criterios de priorización de pacientes adultos en lista de espera de TH).

El TH también ha sido utilizado como estrategia de rescate en pacientes con recidiva del HCC tras la resección quirúrgica o el deterioro de la función hepática de reserva. Algunos autores afirman que los resultados son similares si se comparan con los sometidos a resección quirúrgica. Otros, en cambio, afirman que esta estrategia conlleva mayor mortalidad operatoria, mayor incidencia de recidiva tumoral y peor supervivencia a los cinco años que si los pacientes fueran considerados de entrada para trasplante (no todos los pacientes reseçados cumplen los criterios de trasplante tras la recidiva). La utilización del TACE (quimioembolización transarterial) para reducir el estadiaje del CHC y así cumplir los criterios de TH es otra estrategia usada. La

supervivencia actual tras el TH con los criterios de Mazzaferro alcanza cifras de entre el 75 y el 85% a los cuatro años, similares a otras indicaciones no neoplásicas de TH, con una tasa de recurrencia inferior al 15%.

Además, estas cifras van en constante aumento en series recientes, lo que indica una mejor selección de los candidatos a trasplante con CHC. No obstante, estas cifras hay que interpretarlas con cautela, ya que no corresponden a la supervivencia por intención de tratamiento. La supervivencia postrasplante no tiene en cuenta los pacientes en lista de espera que han muerto o han salido de la lista por progresión de la enfermedad. Cuando se compara la supervivencia del trasplante con la resección (la mejor opción de tratamiento existente hasta la fecha), ajustada por gravedad de la enfermedad, las supervivencias son semejantes.

Los factores de mal pronóstico (asociados a menor supervivencia) tras el TH son el tipo de enfermedad de base (VHC peor pronóstico que el VHB) y el grado de inmunosupresión postrasplante. La tendencia actual es usar en estos pacientes inmunosupresores con propiedades antitumorales como los inhibidores del mTOR (rapamicina y everolimus) frente a inmunosupresores prooncogénicos como los anticalcineurínicos (ciclosporina y tacrolimus). Se está investigando sobre factores pronósticos basados en datos de biología molecular (60).

BASE RACIONAL PARA LA BONDAD DE LOS CRITERIOS DE MILÁN

La publicación de Mazzaferro y cols. (61) (Tabla 8) en 1996 representa un punto de inflexión en la selección de candidatos. Previamente, la realización

de TH en pacientes con un CHC avanzado determinaba unos pobres resultados en términos de tasa de recidiva y supervivencia, lo que determinó que muchos grupos cuestionaran la indicación de TH. Sin embargo, la experiencia acumulada por grupos líderes en París, Londres, Berlín o Pittsburgh mostraba que los pacientes trasplantados por una hepatopatía terminal con CHC incidental en el explante presentaban una tasa de supervivencia similar a los pacientes sin CHC, lo que correlacionaba la recidiva y supervivencia postrasplante directamente con la carga tumoral.

Con esta hipótesis inicial, su estudio demostró que si la selección se ajustaba a sus criterios (Criterios de Milán) y se restringía el TH a pacientes con tumores únicos de un tamaño menor de 5 cm o con un máximo de 3 nódulos menores de 3 cm, sin invasión vascular y sin metástasis ganglionares ni a distancia, la supervivencia a los 5 años podía superar el 70% y ser indistinguible de la que pueden alcanzar los pacientes sin CHC.

La importancia del tamaño tiene su base racional en su estrecha relación con la probabilidad de invasión vascular. Se dispone de estudios antiguos y modernos en los que se constata que, a partir de 2 cm de diámetro, la presencia de invasión vascular microscópica supera el 30-40% y que a partir de 3 cm la mitad de pacientes presenta una invasión vascular macroscópica reconocible si se explora de manera intencionada. Por último, el porcentaje es casi universal cuando se superan los 5 cm.

Tabla 8. Criterios de TH según Mazzaferro (1996) (61).

<p>Ausencia de invasión vascular Ausencia de enfermedad tumoral a distancia Lesión única < 5 cm de diámetro 2-3 lesiones tumorales < 3 cm</p>

Es relevante distinguir entre invasión vascular macroscópica y microscópica. La invasión vascular macroscópica evidente se asocia con una recidiva neoplásica prácticamente universal. Por el contrario, la invasión microscópica registrada focalmente después de un estudio exhaustivo de la pieza quirúrgica, determina un riesgo de recidiva significativamente superior al de los tumores sin esta característica, pero no alcanza en absoluto a todos los pacientes.

Dado que la invasión macroscópica evidente es fácilmente detectable si las técnicas de imagen se aplican adecuadamente, su detección debe considerarse una contraindicación absoluta de trasplante. Sin embargo, la invasión microscópica no es detectable por técnicas de imagen, por lo que la única forma de predecir su presencia es mediante su estrecha asociación con el tamaño de la lesión.

El segundo parámetro relevante para definir el riesgo de recidiva es la multifocalidad, que es un marcador clínico-radiológico de tumor avanzado, asociado frecuentemente a la invasión vascular. Por tanto, los tumores multifocales fácilmente identificables por su tamaño y vascularización se asocian con una elevada tasa de recidiva. Pero ni el tamaño, la multifocalidad ni la invasión vascular son parámetros independientes.

La progresión del CHC conlleva un aumento de diámetro y una infiltración venosa con focos metastásicos alrededor o a distancia, lo que condiciona la multifocalidad. De hecho, la probabilidad de que un tumor progrese más allá de 5 cm y se mantenga como un tumor único o sin invasión vascular una vez explorado mediante TC o RM es escasa. Los criterios de Milán aceptan la multifocalidad de manera muy limitada, de modo que se intenta capturar los tumores sincrónicos de pequeño tamaño aparecidos en el seno del hígado cirrótico y los tumores en que la diseminación es muy limitada y potencialmente confinada al hígado, por lo que el riesgo de recidiva neoplásica aumenta pero no alcanza unas cifras extremas.

Los focos tumorales debidos a la diseminación son fácilmente reconocibles por un patrón vascular caracterizado por una irrigación arterial intensa. No obstante, por debajo de 1 cm pueden observarse como focos de hipercaptación arterial inespecíficos y, por ello, su caracterización inequívoca es imposible. Al mismo tiempo, los focos tumorales debidos a una transformación sincrónica o metacrónica que se hallen en fase inicial (por debajo de 2 cm) raramente son hipervasculares y, por tanto, también son de muy difícil catalogación (62). Los criterios de Milán se aplican registrando únicamente los focos con patrón inequívoco de malignidad, mientras que los catalogados como sospechosos no pueden contabilizarse a la hora de establecer el diagnóstico de extensión. Estas consideraciones explican la bondad de los criterios de Milán si se aplican adecuadamente y son fundamentales para analizar las propuestas de expansión de criterio (63).

EXPANSIÓN DE CRITERIOS

La aplicación de los criterios de Milán se estableció para lograr restringir la indicación de TH a pacientes con óptimos resultados (64). Aunque esto se ha conseguido satisfactoriamente, diversos autores sugieren que los límites deberían expandirse, puesto que algunos pacientes con extensión tumoral excesiva podrían presentar quizás buenos resultados. Asimismo, a pesar de aplicar los criterios de Milán, es relativamente frecuente que la extensión de la enfermedad se haya infravalorado y, a pesar de ello, los resultados no se deterioren significativamente y la supervivencia pueda superar el 50% a los 5 años. Por tanto, habría que plantearse cómo evaluar estos nuevos criterios y analizar si se dispone de una validación externa (65).

EVALUACIÓN DE NUEVOS CRITERIOS

La indicación de trasplante y el diagnóstico de extensión deben basarse en los hallazgos de las técnicas de imagen. El registro de estos datos debe efectuarse de forma prospectiva y el intervalo de tiempo entre imagen y trasplante debe ser lo más corto posible, preferiblemente menos de un mes. Obviamente, los datos deben registrarse antes del análisis del explante y sin conocimiento de sus resultados. Los criterios utilizados para registrar los hallazgos deben estar correctamente definidos de antemano. Sin duda, los criterios expandidos no deben incluir a los pacientes que cumplen los criterios de Milán; en caso contrario, se evaluarían los criterios de Milán en algunos pacientes incluidos con criterios expandidos y los resultados tendrían una difícil

interpretación. Asimismo, debe correlacionarse la estadificación mediante técnicas de imagen con los resultados del seguimiento, el cual debe ser de duración suficiente en un número adecuado de casos. El análisis debe basarse en la supervivencia y en la probabilidad de recidiva. La supervivencia libre de CHC por sí sola no es un parámetro fiable, dado que puede modificarse por eventos no relacionados con la neoplasia.

METODOLOGÍA APLICADA PARA PROPONER CRITERIOS EXPANDIDOS

En la mayor parte de los casos se ha analizado meramente el resultado de los hallazgos de anatomía patológica. La correlación con las técnicas de imagen es con frecuencia inexistente y, si se reporta, se ha efectuado de forma retrospectiva y sin criterios preestablecidos. Por último, es habitual que se unan en una única serie los pacientes que cumplen los criterios de Milán con los que corresponderían a criterios expandidos. Este último grupo es escaso y el seguimiento corto. En algunas propuestas no se menciona la supervivencia y se desconoce la duración del seguimiento.

A pesar de esta falta de rigor, la propuesta de Yao et al (66) (Tabla 9, 67) se presenta como validada y algunos centros y/o países se disponen a adoptarla. Por ello, es necesario dedicarle una atención especial. Ya que además de basarse en datos obtenidos del explante, de no ser una propuesta evaluada prospectivamente y de no describir en absoluto los criterios radiológicos, el número de casos es reducido, se desconoce cuántos pacientes han sido tratados previamente al trasplante y si dicho tratamiento durante el período de espera en lista (por ejemplo, con radiofrecuencia) se ha basado en

imágenes poco valorables y, por tanto, es imposible establecer la fiabilidad de la evaluación de la carga tumoral.

Además de estas limitaciones, debe señalarse que la ampliación de criterios que se propone es mínima y, tal como se expone en sus trabajos, debería basarse en la correcta catalogación de nódulos infracentimétricos en el seno de un hígado cirrótico. Dado que estos nódulos diminutos no se pueden catalogar de forma fiable mediante radiología, basar una ampliación de criterios en definiciones no disponibles debe considerarse arriesgado, cuando no erróneo de buen principio.

Tabla 9: Criterios de Milán frente a los criterios de California

CRITERIOS DE MILÁN	CRITERIOS DE CALIFORNIA
Nódulo único menor o igual a 5 cm	Nódulo único menor o igual a 6,5 cm
Hasta 3 nódulos, ninguno superior a 3 cm	Hasta 3 nódulos, ninguno superior a 4,5 cm y suma menor o igual a 8 cm
Sin invasión vascular macroscópica	Sin invasión vascular macroscópica
Estudio de extensión negativo	Estudio de extensión negativo

Algunos autores proponen ampliar criterios y, al mismo tiempo, excluir a los pacientes en los que se registre una característica potencialmente relacionada con un peor pronóstico postrasplante. Los valores elevados de AFP se relacionan con una progresión de la enfermedad debida a la demora en lista de espera y una recidiva tras el TH. No obstante, contraindicar el trasplante en pacientes con unos valores elevados de AFP no se ha

contemplado en ningún programa y no hay estudios que puedan sugerir el valor que debería utilizarse como corte.

Dado que hay una relación entre el grado de diferenciación y la prevalencia de invasión vascular microscópica, algunos autores proponen excluir a los pacientes en los que la punción del tumor demuestre la presencia de células con una pobre diferenciación. Esta estrategia es poco fiable. El grado de diferenciación se pierde con la progresión tumoral y, por tanto, se puede correlacionar con el tamaño y la invasión vascular. No obstante, se sabe que los nódulos tumorales no poseen una diferenciación celular homogénea, sino que coexisten áreas de buena, moderada y pobre diferenciación. Por tanto, la punción obtendría una muestra aleatoria, y basar la decisión en una herramienta no reproducible es desaconsejable. Además, su uso requeriría puncionar todos los nódulos, y ello no siempre es posible, debido a las contraindicaciones, el deterioro de la coagulación o la localización del tumor. Por último, el riesgo de diseminación iatrogénica se podría ver incrementado.

VALIDACIÓN DE CRITERIOS

Los criterios de Milán se han validado repetidamente en diferentes centros, tanto en donante cadáver como en donante vivo. El cumplimiento de los criterios de Milán permite una supervivencia del 70% a los 5 años y exceder los límites implica un deterioro que fácilmente lleva a menos del 50% a los 5 años. Un estudio multicéntrico efectuado en Francia con criterios de imagen y datos del explante demuestra de manera inequívoca esta realidad, y lo mismo ocurre cuando se analiza la base de datos de la UNOS (United Network for

Organ sharing) o cualquier registro de trasplante con un número suficiente de pacientes trasplantados por CHC. De hecho, en el artículo inicial donde se describen los criterios de Milán, se expone que los pacientes que exceden los criterios en el explante presentan una supervivencia inferior. Todos estos datos muestran que el número de estudios que validan los criterios de Milán (68-70) y que evidencian el impacto negativo de expandir los límites superan ampliamente los estudios de signo contrario, y cualquier análisis de la evidencia indica que es deletéreo modificar la política actual.

EXPANSIÓN DE CANDIDATOS, LISTA DE ESPERA Y REPERCUSIONES SEGÚN LA INTENCIÓN DE TRATAMIENTO

Como se ha comentado previamente, hay un gran déficit de donantes para los pacientes que cumplen los criterios actuales de TH. Durante el tiempo de espera, la enfermedad puede progresar, y entre un 15 y un 25% de los pacientes con CHC en los que se indica un trasplante son excluidos cuando la demora supera los 9 meses. Esta circunstancia reduce la aplicabilidad del trasplante y la supervivencia según la intención de tratamiento. Por tanto, el problema actual no reside en cuántos más pacientes pueden beneficiarse del trasplante, sino cómo se distribuyen los escasos órganos disponibles de manera más efectiva.

Para evitar la progresión del CHC en lista de espera algunos autores defienden la TACE o la radiofrecuencia (RFA), aunque no hay estudios controlados sobre sus ventajas. El uso de neoadyuvancia en lista de espera y la opción de donante vivo son otros aspectos controvertidos del TH. A favor del

donante vivo está la ausencia de la lista de espera y la posibilidad de planificar la estrategia. Los detractores de esta alternativa aducen motivos éticos como el riesgo vital sufrido por el donante y la necesidad de un donante cadáver como estrategia en caso de fallo del donante vivo. Otros autores van más allá, aduciendo una mayor recurrencia de la enfermedad al eliminar la selección natural que lleva implícita la lista de espera. Son necesarios estudios comparativos prospectivos para dilucidar los mejores resultados.

Se puede argumentar que algunos de los candidatos no tumorales presentan una expectativa de vida inferior a la que tendrían los pacientes con criterio ampliado, pero lo sensato es mejorar los resultados en todas las entidades y no disminuir la exigencia de hacer el mejor uso posible de los órganos disponibles. Posiblemente, si hay pacientes con malas expectativas, se debería considerar su exclusión del programa, tal como ocurre actualmente en pacientes con CHC avanzado. Algunos autores argumentan que a los pacientes se les debe ofrecer la posibilidad de sobrevivir, aunque sea por debajo del 50% a los 5 años y que no es ético excluirlos de la lista de espera por exceder los criterios de Milán. Este argumento es adecuado desde el punto de vista del paciente excluido, pero no si se considera la población en su conjunto. Al haber un número finito de órganos, la utilización de uno de ellos en un paciente infraóptimo evita que se destine a un candidato adecuado y, por tanto, se hace un mal servicio a la sociedad.

En resumen, los criterios de Milán deben seguir siendo el instrumento para seleccionar a los pacientes con CHC que deben incluirse en lista para TH. No se dispone de datos que demuestren la bondad de expandir los límites, sino que hay evidencias que demuestran que los resultados al exceder los criterios

de Milán dan lugar a cifras de supervivencia a largo plazo que no pueden considerarse aceptables. Debido a la escasez de órganos para trasplante, el problema que se debe resolver es cómo distribuir los escasos órganos de que se dispone y trasladar el nivel de exigencia existente en los enfermos con CHC a las otras categorías de pacientes. De este modo, se rentabilizará al máximo la utilidad de los órganos y se evitará su uso indebido en los pacientes en quienes las expectativas de supervivencia no son las exigibles.

Como en otras áreas de la medicina, las decisiones clínicas deben basarse en un análisis racional de la evidencia científica y no en impulsos aparentemente bienintencionados que, en realidad, resultan contraproducentes para el conjunto de los pacientes y la sociedad de la que forman parte.

1.5.3- QUIMIOEMBOLIZACIÓN TRANSARTERIAL

La embolización arterial es la técnica de elección en el tratamiento de la CHC no resecable (71) sin que esté indicada en las primeras etapas de la enfermedad.

La TACE (72) consiste en la aplicación intra-arterial de un agente quimioterápico (doxorubicina sola o combinada con cisplatino y mitomicina C), con o sin lipiodol y material procoagulante (73). El lipiodol es un aceite de contraste que tiene afinidad por las células tumorales y agentes quimioterápicos y por tanto marca el tumor y retiene las drogas fijadas. Es aclarado por el parénquima hepático normal sin embargo es retenido por el tejido tumoral durante semanas o incluso hasta un año. El material procoagulante se utiliza para producir oclusión y trombosis de la rama arterial

correspondiente al tumor. Previamente a la aplicación de la técnica y cinco días después hay que administrar antibióticos, antieméticos y analgésicos. No existe evidencia sobre los mejores agentes quimioterápicos ni la estrategia de tratamiento. Con esta técnica se consiguen respuestas parciales en 15-55% de los pacientes (74) y retrasos significativos en la progresión tumoral y e invasión vascular (75).

El TACE está indicado en: a) CHC de gran tamaño no candidatos a cirugía; b) como tratamiento puente en pacientes a la espera de un TH; c) para reducir la estadificación del CHC y cumplir los criterios de TH, y d) previamente a la resección o la RFA, para aumentar la supervivencia.

Son contraindicaciones absolutas del TACE la trombosis portal, la encefalopatía y la obstrucción biliar. Serían contraindicaciones relativas la bilirrubina total > 2 mg/dl, una masa tumoral > 50% del volumen hepático, la presencia de ascitis y la existencia de insuficiencia renal o cardíaca.

Debe indicarse cuidadosamente en pacientes con descompensación de su insuficiencia hepática o hepática (Child-Pugh C), por las potenciales complicaciones relacionadas con la isquemia.

La heterogeneidad en la selección de los "candidatos ideales" puede ofrecer resultados opuestos, y por lo tanto debería ser tenido en cuenta a la hora de diseñar y analizar estudios controlados aleatorizados.

Las complicaciones más frecuentemente descritas son el síndrome postembolización que inicialmente parecía relacionado con la necrosis del tumor pero que actualmente se relaciona más con la necrosis del parénquima sano. Suele cursar con dolor, fiebre, elevación transitoria de las transaminasas, abscesos hepáticos (0-3% con mortalidad cercana al 50%), rotura tumoral,

fístula biliar, insuficiencia hepática, embolización de lipiodol al pulmón e insuficiencia renal.

Hay otras complicaciones consideradas raras, pero potencialmente mortales cuya fisiopatología está relacionada con la migración del trombo a la arteria cística (colecistitis isquémica) y arteria gastroduodenal o gástrica (perforación gástrica o duodenal). La mortalidad relacionada con el tratamiento es de 0 a 2% en estadios A de Child-Pugh y del 8 al 27% en Child-Pugh B y C.

El TACE comparado con otras técnicas o con el manejo sintomático no ha demostrado aumento de la supervivencia. Como medida para mejorar los resultados, algunos autores repiten las sesiones de quimioembolización recomendando espaciar un mes como mínimo dos sesiones. La dificultad principal es medir la respuesta del tumor a la técnica, ya que la mayoría de los tumores no disminuyen de tamaño. Es necesario medir marcadores indirectos como falta de captación de contraste o de lipiodol en la TC o RM.

1.5.4-. RADIOFRECUENCIA

La RFA consiste en la aplicación de ondas alternantes de alta frecuencia que produce ionización de los componentes celulares con fricción y calentamiento de los tejidos por encima de 60°. Está indicado en pacientes no candidatos a cirugía con tumores < 3-4 cm y Child-Pugh A o B. También estaría indicado en pacientes con recidiva de la enfermedad tras haber sido sometidos a resección o TH (76). En casos de tumores mayores de 2 cm se ha especulado que la capacidad de difusión del alcohol se bloquea por la existencia de septos, disminuyendo así su capacidad curativa. Está

contraindicado en tumores subcapsulares o en la periferia hepática por miedo a lesiones diafragmáticas o asas intestinales cercanas. Las nuevas técnicas que permiten marcar una zona de aislamiento térmico, podrían utilizarse en estos casos (77); además la energía generada induce necrosis coagulativa en forma de "anillo de seguridad" de tejido no tumoral, que podría eliminar los pequeños satélites detectados.

Las contraindicaciones relativas serían la trombosis portal, la enfermedad extrahepática y la coagulopatía severa o plaquetopenia < 40.000/ml.

En comparación con otras técnicas, se han objetivado mayor número de efectos adversos (10%) entre los que destacan el dolor y la irritación peritoneal. Menos frecuentemente se han descrito: insuficiencia hepática, perforación de colon, trombosis portal, fístula biliar, abscesos hepáticos, derrame pleural, quemaduras cutáneas, hipoxia, neumotórax, hematoma, insuficiencia renal, hemoperitoneo, siembra tumoral en el trayecto de la aguja, dolor, fiebre, etc.

La recurrencia local varía de 0-28%, y la supervivencia a uno, tres y cinco años es del 92, 62 y 38%, respectivamente. Para mejorar estos resultados, algunos autores aplican una dosis única de doxorubicina liposomal. Otros autores combinan la TACE con la RFA o la alcoholización, con la intención de aumentar la supervivencia (78).

En comparación con las técnicas de ablación percutánea se ha demostrado que la recidiva local es significativamente menor y se han publicado tasas de respuesta completa de hasta 96-100% para RF vs 86-89% de técnicas percutáneas.

Otras técnicas actuales como la crioablación, la ablación por láser y la ablación con microondas de calor no han adquirido la indicación ni aplicabilidad de la RFA.

1.5.5.- RADIOTERAPIA

El HCC es un tumor radiorresistente alojado en un órgano extremadamente radiosensible, que en su totalidad solo tolera entre 2500 y 3000 Gy, con un riesgo importante de hepatitis secundaria a radiación, asociada con una mortalidad del 50%. Las nuevas técnicas de radioterapia esteroatáctica (79), en las que los rayos no paralelos convergen en un punto, permiten administrar altas dosis de radiación en un punto sin lesionar el tejido normal circundante. Con esta técnica se podrían tratar tumores de pequeños a moderados. Otras técnicas de radioembolización administran isótopos radiactivos (yodo-131 [131I]) vía intra-arterial, vehiculizados en lipiodol o ítrio-90 en microesferas (80). La radioterapia no ha mostrado beneficios en la supervivencia. Se necesita estudios a más largo plazo para valorar sus resultados.

1.5.6 ALCOHOLIZACIÓN PERCUTÁNEA

La PEI (*percutaneous ethanol injection*) produce una deshidratación citoplasmática con necrosis celular y fibrosis. Además, el alcohol afecta a las células endoteliales atrayendo plaquetas y causando trombosis e isquemia.

También se ha utilizado el ácido acético por sus menores efectos adversos. En ocasiones esta sustancia se acompaña de una fuente de energía que puede consistir en una de alta temperatura o justo lo contrario, actuando por un mecanismo de crioablación.

Esta técnica consigue respuesta completa hasta en el 90-100% en tumores únicos menores de 2 cm (81). Por el contrario, en tumores de 3-5 cm de tamaño la necrosis completa se consigue en la mitad de los casos, y no se considera indicada en tumores de mayor tamaño ya que su eficacia se encuentra limitada por la existencia de septos intratumorales, que dificultan la difusión del alcohol, o por la presencia de lesiones satélite, que no son eliminadas por el procedimiento convencional. Por tanto, los mejores resultados se obtienen en pacientes con Child-Pugh A y con tumores únicos de menos de 2 cm (82).

La supervivencia a uno, tres y cinco años para pacientes Child-Pugh A con tumores menores de 3 cm es de 98%, 79% y 47%, respectivamente y disminuye mucho a medida que aumenta el tamaño tumoral. Por el contrario, no hay evidencias de que el tratamiento consiga modificar la esperanza de vida en los pacientes con estadio Child-Pugh B o C.

Otros predictores de supervivencia independientes son el estadio Child-Pugh, el número y tamaño de los nódulos, los niveles de AFP y la recidiva tumoral, que puede afectar a la mitad de los pacientes a los 3 años.

Su principal ventaja es su bajo coste y la escasa sofisticación de la técnica (solo requiere la ayuda de un ecógrafo) y en la actualidad está siendo suplantado por la RFA.

La mejor manera de evaluar la eficacia antitumoral es mediante la TC al mes de tratamiento. La ausencia de captación intratumoral tras la administración de contraste indica la ausencia de tumor residual y se interpreta como respuesta completa. Las indicaciones, contraindicaciones y complicaciones son superponibles a la RFA. Aunque ofrece buenos resultados, éstos no son comparables con los obtenidos con la resección quirúrgica.

1.5.7.- ANÁLOGOS DE HORMONAS

La hormonoterapia basada en el tamoxifen, megestrol, octeótride y lanreótide tiene su base en la existencia de receptores hormonales en algunos CHC, pero no se ha podido demostrar su eficacia (83). En un meta-análisis en el cual se compara el tamoxifeno frente al tratamiento conservador, no se observó efecto antitumoral ni aumento de la supervivencia. La falta de eficacia del tamoxifeno puede deberse a la baja expresión de receptores estrogénicos que presenta el CHC, o bien a que expresen receptores mutados (84).

En cambio, en otros ensayos clínicos se obtuvieron resultados alentadores con octreótide, pero éstos no se han reproducido en estudios posteriores. Se han publicado respuestas de hasta el 40% en tumores con receptores positivos para somastostina (85).

Se han publicado otros fármacos como el ^{131}I vehiculizado en lipiodol, el ácido poliprenoico, el α - o β -interferón, la inmunoterapia con linfocitos autólogos activados, las vacunas con células tumorales autólogas, el cetuximab y el bevacizumab, sunitinib, etc., están siendo utilizados en diversos ensayos clínicos con resultados más o menos prometedores (86).

Con la mejora en el conocimiento de la patogénesis molecular del CHC, los nuevos fármacos dirigidos a vías de señalización moleculares han saltado al ámbito clínico. Los beneficios obtenidos con estos fármacos en pacientes con cáncer de pulmón (erlotinib y bevacizumab), el cáncer de mama (trastuzumab y bevacizumab), tumores del estroma gastrointestinal (imatinib) y metástasis hepáticas (cetuximab y bevacizumab) ofrece una esperanza para los pacientes que sufren CHC (87). Actualmente se están llevando a cabo diversos estudios de fases II y III que evalúan la eficacia del tratamiento dirigido en el CHC (88). Entre ellos cabe destacar los inhibidores de EGFR (erlotinib), PDGFR (sorafenib e imatinib) o anticuerpos dirigidos contra el VEGF (bevacizumab), que ya han demostrado eficacia antitumoral en otros tumores sólidos. Incluso se está aplicando genoterapia en pacientes con CHC avanzados (89).

1.5.8-. QUIMIOTERAPIA Y OTROS TRATAMIENTOS SISTÉMICOS

El HCC es poco sensible a la quimioterapia, probablemente por la alta expresión de genes resistentes. Por otra parte, el paciente, por lo general añoso, es poco tolerante a las drogas quimioterápicas debido a la hepatopatía de base y a toda la comorbilidad asociada que conlleva la hepatopatía crónica.

La quimioterapia está indicada en el CHC avanzado sin embargo no hay evidencia de que en casos de tumor no resecable, aporte beneficios terapéuticos. Los agentes utilizados en los diferentes ensayos clínicos son: la doxorrubicina sola o combinada con tamoxifen o cisplatino; el 5-fluorouracilo combinado con leucovorin; la capecitabina sola o combinada con oxaliplatino;

la gemcitabina; el irinotecan; la talidomina o diversas combinaciones de todos los anteriores. En el caso de la doxorubicina sistémica los resultados no han sido alentadores siendo la tasa de respuesta parcial inferior al 10% de los casos.

En un estudio publicado por autores japoneses se compara la eficacia de la quimioterapia combinada (cisplatino/interferón- α 2b/doxorubicina/fluorouracil (PIAF)) frente a la de agente único (doxorubicina) (90). Las tasas de respuesta fueron del 20,9 % para el régimen de PIAF y 10,5 % para la doxorubicina. La supervivencia fue similar en ambos grupos. Los pacientes tratados con PIAF presentaron una mayor tasa de mielotoxicidad en comparación con la doxorubicina.

Existe un ensayo clínico fase III de doxorubicina vs nolatrexato en CHC irresecable que demostró una supervivencia mayor (mediana de supervivencia de 5,6 meses) en el grupo de doxorubicina sistémica (91). La supervivencia demostrada es interesante para futuros estudios de doxorubicina en primera línea en CHC avanzado, pero hoy en día no está claro que pueda ser el fármaco de primera línea para el tratamiento del HCC avanzado (92). Ha sido utilizado también tras el TH pero la inmunosupresión requerida facilita el crecimiento tumoral. Así el tiempo que el tumor requiere para doblar su volumen es más corto tras el trasplante que tras la resección. En este sentido, el agente más utilizado ha sido la doxorubicina aunque con malos resultados por la recurrencia del VHC de base (93).

Actualmente podemos decir que el papel de la quimioterapia como tratamiento neoadyuvante o adyuvante tras la resección o el TH no está

establecido, aunque se siguen creando nuevas líneas de investigación en este sentido (94).

Un fármaco aparecido en el año 1995 y que hasta la fecha ha demostrado los mejores resultados, es el sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar) (95,96). Sorafenib es un inhibidor multiquinasa que reduce la proliferación celular tumoral *in vitro* además de inhibir el crecimiento tumoral y reducir la angiogénesis (97). Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de los receptores de proliferación dependientes de la actividad tirosina quinasa, así como quinasas serina-treonina intracelulares.

Las dos las indicaciones para las que está aprobado su uso son el cáncer renal avanzado en pacientes en los que ha fracasado la terapia previa con interferón- α o interleuquina-2 o que se consideran inapropiados para dicha terapia, y el CHC en estadio avanzado y con buena función hepática (98).

Actualmente Sorafenib es la primera y única molécula aprobada para HCC que inhibe la proliferación y promueve la apoptosis de las células tumorales (99). La indicación deriva de un ensayo clínico en fase III desarrollado por Llovet y cols. (100, 101) en el que se puso de manifiesto una ventaja estadísticamente significativa de Sorafenib frente a placebo para supervivencia global con una diferencia de medianas de supervivencia de 11,9 semanas a favor de Sorafenib siendo más eficaz en pacientes con función hepática preservada (Child-Pugh A) y en aquellos VHC positivos (102) Respecto a otros parámetros estudiados (estado ECOG, presencia o ausencia de invasión macroscópica vascular y/o diseminación extrahepática del tumor) la razón de riesgo favoreció sistemáticamente a Sorafenib frente a placebo. Sorafenib presenta múltiples toxicidades debido a la efectividad del tratamiento

que obliga en ocasiones a suprimir el tratamiento por lo que se trata de encontrar agentes coadyuvantes que permitan disminuir la dosis.

En un artículo reciente de Kong y cols. (103), se estudió el efecto de la combinación de sorafenib y un activador de la guanilato ciclasa soluble (sGC) o YC-1 en ratas. Los efectos observados demostraron que existe una supresión mayor del crecimiento del tumor cuando se combinan ambos agentes que cuando se administra solo una de las drogas y además no se observó toxicidad cardíaca, pulmonar, hepática o renal, así como no afectación al estado nutricional del animal. Sí se observó una disminución en el tamaño del bazo. También se ha visto que puede usarse con seguridad *in vivo*. Estos resultados se ampliarán a continuación.

Otro estudio recientemente publicado es un ensayo clínico Fase I (104) que analiza en términos de posología la eficacia de la administración conjunta de Sorafenib y cisplatino en pacientes con CHC avanzado. Se observó una supervivencia media aumentada y sin progresión de enfermedad en los pacientes que recibieron 800 mg/día y cisplatino 65 mg/m/ciclo. Este estudio se está completando con otro randomizado fase II de Sorafenib solo vs Sorafenib y cisplatino.

Son necesarios nuevos estudios y ensayos clínicos para encontrar sinergismos entre Sorafenib y otros fármacos, así como estudiar los mecanismos moleculares de acción del Sorafenib (105-108)

En términos más concretos y en su aplicación a la clínica la decisión de tratamiento y la discusión y seguimiento de cada caso debe realizarse de manera multidisciplinar y cabe destacar tres consideraciones importantes para una utilización adecuada del fármaco (109-111):

- Pendiente de datos en pacientes Child-Pugh B.
- Necesidad de factores predictivos.
- Coste elevado para un aumento de Supervivencia Global que en términos absolutos es de 7,9 a 10,7 meses.

¿CUÁL ES EL MECANISMO DE ACCIÓN DEL SORAFENIB Y QUÉ EFECTOS TIENE SOBRE LA CÉLULA TUMORAL?

Sorafenib inhibe la actividad tirosina quinasa de los receptores de proliferación celular como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), Flt3 y c-kit los cuales son promotores de la angiogénesis. Asimismo, inhibe quinasas intracelulares dependientes de serina-treonina como RAF que transduce la señal a través de la ruta dependiente de MEK/ERK. El bloqueo de estas vías de proliferación afecta a los procesos de angiogénesis que conlleva una reducción del flujo sanguíneo al área tumoral que como consecuencia producen la muerte celular (112-115).

Por otra parte, Sorafenib promueve la muerte celular mediada por TRAIL que actúa en sinergia con una reducción de la expresión de proteínas antiapoptóticas (Mcl-1, leucemia mieloide 1), y oncogénicas (survivina y ciclina D1) (116-119). La inducción de muerte celular por Sorafenib es debida por activación de la vía intrínseca e extrínseca de la apoptosis (120-124).

Sin embargo existen casos en los que la enfermedad progresa a pesar de la administración del Sorafenib (125, 126) hecho que parece relacionado con la regulación positiva de vías de supervivencia celular con la administración de este fármaco por lo que es necesario un mejor conocimiento de todas esas

rutas celulares para aumentar los efectos beneficiosos del Sorafenib (127-130). Uno de estos procesos de resistencia es la inducción de autofagia (131).

La autofagia es un sistema de degradación que recicla los componentes celulares dañados o inútiles, (proteínas u orgánulos) para el mantenimiento de la homeostasis celular con el fin de promover la adaptación y la supervivencia celular (132, 133). Sin embargo, una estimulación excesiva puede conducir a la muerte celular programada en lugar de la supervivencia (134-136). De hecho, su desregulación se ha asociado con algunas enfermedades neurodegenerativas (138), diabetes, fibrosis quística, enfermedad de Crohn, miopatías, la deficiencia de α -1 antitripsina y la hipertrofia cardíaca. Se puede considerar que la autofagia actúa como una espada de doble filo en las células cancerosas, ya que elimina células mutadas y mitocondrias dañadas en la etapa temprana de la enfermedad, pero a su vez induce la supervivencia en condiciones de hipoxia e isquemia y promueve la resistencia contra algunos fármacos quimioterapéuticos y la progresión tumoral en las fases posteriores. En este sentido, se ha demostrado que Sorafenib induce autofagia en diferentes modelos *in vitro* y en modelos experimentales *in vivo* utilizando diversas estirpes celulares (139-141). Existen datos contradictorios en relación con el papel de la autofagia en el tratamiento con Sorafenib. Algunos estudios han analizado cambios en la regulación de la autofagia en células tratadas con combinaciones de drogas que incluyen Sorafenib. A continuación, exponemos algunos ejemplos.

La administración de Sorafenib junto con Vorinostat (142, 143) en cultivos celulares de CHC ha demostrado una disminución de la viabilidad de las células más acusada que cuando el tratamiento es llevado a cabo con los

fármacos por separado. Pemetrexed (144, 145) también produce una acción sinérgica sobre la autofagia cuando se administra en conjunto con Sorafenib como se ha observado en líneas celulares MCF7. Lapatinib (146, 147, 148) junto con Sorafenib ha demostrado apoptosis en líneas celulares de glioblastoma. Sildenafil (149) también potencia la acción antiproliferativa del Sorafenib. Incluso la administración conjunta con antioxidantes y preparados herbales como PHY906 (150, 151) han demostrado un aumento de autofagia y eficacia antitumoral en células del glioblastoma (152).

1.5.9- PERSPECTIVAS FUTURAS

Con la mejora en el conocimiento de la patogénesis molecular del CHC, los nuevos fármacos dirigidos a vías de señalización moleculares han saltado al ámbito clínico (153-155). Los beneficios obtenidos con estos fármacos en pacientes con cáncer de pulmón (erlotinib y bevacizumab), el cáncer de mama (trastuzumab y bevacizumab), tumores del estroma gastrointestinal (imatinib) y metástasis hepáticas (cetuximab y bevacizumab) ofrece una esperanza para los pacientes que sufren CHC.

Actualmente se están llevando a cabo diversos estudios de fases II (156-159) y III que evalúan la eficacia del tratamiento dirigido en el CHC tanto con Sorafenib como sus derivados. Entre ellos cabe destacar los distintos inhibidores de los receptores de proliferación y sus agonistas que han demostrado efectividad en el CHC y tumores sólidos. Incluso se está aplicando genoterapia en pacientes con CHC avanzados.

Están siendo estudiadas otras indicaciones para el Sorafenib en otros tumores como el cáncer de mama (160-163), ovario (164), próstata (165-167), colorrectal (168, 169), esófago (170), renal (171-174) para el cual ya está aprobado, pulmón (175), estómago (176, 177), tiroides (178, 179), leucemia y mieloma (180-183) y páncreas (184).

1.6. CRIBADO Y SEGUIMIENTO

El objetivo de los programas de detección es realizar el diagnóstico de CHC en una fase temprana en que el paciente sea susceptible de recibir un tratamiento eficaz. Hoy día, gracias a la introducción en la práctica clínica de métodos de diagnóstico precoz, el diagnóstico de CHC puede realizarse antes de que éste dé lugar a manifestaciones. Para conseguir este objetivo, es necesaria la identificación de la población de riesgo para CHC (185).

Todos los pacientes con enfermedad hepática crónica, independientemente de su etiología, tienen un riesgo aumentado de desarrollar CHC, lo que da lugar a una incidencia anual del tumor del 3-4% para los pacientes con cirrosis y del 1% para aquéllos con hepatitis crónica (186). A fin de que este programa tenga una buena relación coste-eficacia debe realizarse en poblaciones con riesgo elevado de CHC (ver factores de riesgo en el apartado de Etiopatogenia).

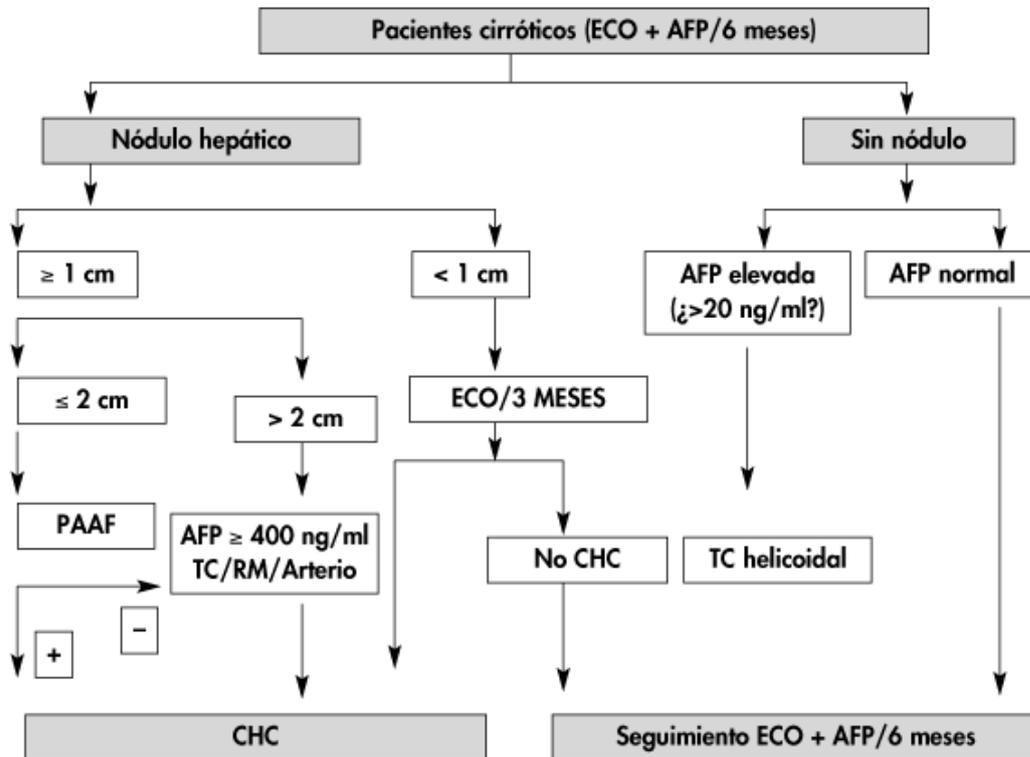
Se aconseja el seguimiento mediante prueba de imagen y AFP de la siguiente manera (Tabla 10) (187):

- Los nódulos menores de 1 cm deben ser seguidos con ecografía cada 3-6 meses. Si no hay crecimiento en dos años, se debe volver al seguimiento habitual.
- Los nódulos entre 1 y 2 cm por ecografía, deben ser estudiados con otras dos pruebas: TC, RM o ecografía con contraste. Si las pruebas son típicas de CHC (hipervascular en fase arterial y lavado en las fases portal y venosa) en dos pruebas, el nódulo debe ser considerado CHC. Si las pruebas no son concluyentes deben ser biopsiados.
- Los nódulos > 2 cm con estudio de imagen sugestivo de CHC o una AFP > 200 ng/ml no necesitan ser biopsiados. En caso contrario o en nódulos que aparecen sobre hígado sano, sí se requiere biopsia.
- Cuando las biopsias no son diagnósticas, los nódulos deben ser seguidos con ecografía o TC cada 3-6 meses. Si el nódulo crece y no es característico de HCC, es necesario repetir la biopsia.

La duración de los intervalos viene dada por los datos de la literatura médica sobre cinética tumoral que demuestran que el tiempo que transcurre desde que un tumor es indetectable hasta que adquiere un tamaño de 2 cm es de aproximadamente 4-12 meses, por lo que el intervalo adecuado es de 6 meses.

Las perspectivas para limitar la incidencia de HCC son: profilaxis contra los virus de la hepatitis (vacunas) y un mejor conocimiento del diagnóstico molecular para ajustar e iniciar precozmente la intervención terapéutica, aunque de todas maneras son necesarios nuevos modelos experimentales para obtener una mejor comprensión de la interacción entre el

virus, los factores ambientales y el huésped. Tabla 10: Algoritmo diagnóstico y seguimiento CHC



1.8. MARCADORES BIOLÓGICOS

1.7.1. α-FETOPROTEÍNA

Dado que el 80% de la mortalidad tardía se debe a la recidiva hepática, es de vital importancia el diagnóstico temprano, tanto del tumor primario como de las recidivas, para conseguir unos resultados óptimos.

Uno de los métodos diagnósticos más eficientes es la determinación de un marcador serológico altamente sensible y específico. Los marcadores serológicos ayudan a complementar el diagnóstico por la imagen.

La AFP es el marcador de elección en el diagnóstico del CHC (188), siendo el más utilizado también para el control de la evolución clínica el diagnóstico temprano de las recidivas y la monitorización del tratamiento. Se trata de una glucoproteína de semivida plasmática de 5 a 7 días, sintetizada en el saco vitelino y en el hígado fetal, a partir de la décima semana de gestación. Tras el nacimiento disminuye progresivamente hasta alcanzar concentraciones muy bajas en el segundo mes de vida, y se mantiene así en la vida adulta, durante la que se consideran normales valores inferiores aquellos comprendidos entre 0 y 20 µg/L.

La AFP puede encontrarse elevada en otras enfermedades tumorales (hepatoblastomas, tumores de células germinales y algunos tumores gastrointestinales), (189) en enfermedades hepáticas benignas y en procesos de regeneración hepática (hepatitis virales y cirrosis) donde se encuentra elevada de manera constante y estas cifras persistentemente elevadas de AFP indican un factor de riesgo para desarrollar CHC.

Niveles por encima de 400 µg/l son diagnósticos de CHC con una fiabilidad del 95% y tiene un papel en el diagnóstico de CHC ante un paciente cirrótico que presenta una masa en el hígado y una AFP mayor de 200 ng/ml. Hasta en un 5-10% de los tumores, pueden verse cifras de AFP por encima de 10000 ng/ml.

Sin embargo, no todos los CHC secretan AFP, como ocurre en el caso del CHC fibrolamelar y se ha observado que incluso más del 40% de los tumores pequeños pueden presentar cifras normales de AFP (190).

Estas cifras no se correlacionan con el tamaño (otros autores encuentran una relación directa), el estadio o la prognosis tumoral. Muchos estudios en los

que la prevalencia es del 5%, confieren a la AFP una sensibilidad de entre el 41-65%, una especificidad de entre un 80-94%, un valor predictivo positivo de 25% y un valor predictivo negativo del 98%.

En los grupos de riesgo, su sensibilidad es superior al 70% y su especificidad alcanza el 100%, habiéndose descrito además una sensibilidad mayor en el diagnóstico temprano cuando el HPC tiene un origen no viral.

Los valores pretratamiento de AFP también tienen un valor pronóstico para los pacientes con CHC. Así, los rangos de supervivencia en pacientes con valores normales de AFP (< 21,8 µg/l) y moderadamente elevados (21,8-327 µg/l) son significativamente superiores que en pacientes con valores marcadamente elevados (> 436 µg/l).

Tras la resección hepática, la determinación de AFP se considera un indicador del grado de resección del tumor. Así, una disminución de los valores de AFP menor de la esperada o valores estables después de 1 semana de la resección se asocian a resecciones incompletas y a un peor pronóstico.

En el seguimiento de los pacientes, la AFP es útil para el diagnóstico temprano de las recidivas tumorales, de forma que ante un paciente con historia de tumor productor de AFP, su elevación es suficiente para establecer el diagnóstico de recidiva. Además, la determinación de la AFP, junto con las características patológicas del tumor, aporta información útil en la identificación de pacientes con riesgo de desarrollar una recurrencia difusa intrahepática, que es un patrón de recidiva temprana y con peor pronóstico.

Los valores elevados de AFP también tienen una implicación en la terapéutica, puesto que se ha propuesto como uno de los criterios (junto con el CHC invasivo nodular, la invasión vascular, las metástasis intrahepáticas y las

roturas capsulares) que aconsejan el tratamiento adyuvante o el trasplante hepático debido al alto riesgo de recurrencia que presentan los pacientes con 3 o más de estos criterios.

Dentro de la determinación de los niveles de AFP en sangre también pueden determinarse diferentes fracciones de la proteína con otra interpretación clínica:

* ARNm de la AFP: su presencia en sangre periférica se ha propuesto como marcador predictivo de diseminación metastásica, pero su utilidad práctica no está bien establecida (191). Los pacientes cuyos valores se negativizan tras el tratamiento adyuvante tienen mejores cifras de supervivencia y de tiempo libre de enfermedad que aquellos con valores positivos permanentes. Por otra parte, la persistencia en sangre periférica tras la resección quirúrgica se considera un factor pronóstico de la recurrencia temprana intrahepática.

* Fracción L3 de la AFP (L3-AFP): los pacientes con valores positivos de L3-AFP tienen peor función hepática, tumores de mayor tamaño, y tumores más avanzados y con histologías de peor pronóstico que aquellos con valores negativos, y con mayor frecuencia presentan metástasis a distancia (192).

* Fracción reactiva fitohemaglutinina eritroaglutinante de la AFP (AFP-P4) (193) y fracción monosializada de la AFP (msAFP): es útil cuando la AFP tiene valores bajos y pierde su especificidad. Tanto los valores elevados de msAFP como su porcentaje respecto a la AFP total se consideran diagnósticos (194).

1.7.2 OTROS MARCADORES BIOLÓGICOS

Existen otros marcadores biológicos que surgen de la necesidad arrojada por las limitaciones de la AFP. Se están realizando estudios sobre estos marcadores usados solos o en combinación con la AFP, como la desgammacarboxiprotombina (PIVKAII), las fracciones de AFP (L3) (195), la α -fucosidasa y el glipicano 319 (196). Ninguno ha demostrado ser útil como herramienta de diagnóstico temprano y, por tanto, no se recomienda su utilización en la práctica clínica.

A continuación, se exponen los más importantes:

* Antígeno polipeptídico específico tisular (TPS): es un marcador de proliferación celular. Sus valores se correlacionan con el número de células tumorales, el carácter invasivo, el estadio tumoral y la supervivencia. El valor de TPS es un factor independiente de recidiva tumoral en pacientes previamente resecados (197). Los pacientes que presentan valores superiores de TPS tienen recidivas más tempranas que aquellos con valores bajos. Si se consideran los valores de TPS junto con el tamaño tumoral y la afección de los márgenes, el valor predictivo de estos 2 últimos factores se incrementa de 72% a 80%.

* Proteínas inducidas por la ausencia de vitamina K o antagonistas II (PIVKA): es un marcador de baja especificidad, particularmente en la enfermedad

colestásica, que produce una disminución de la vitamina K. Sus valores preoperatorios tienen valor pronóstico tras la resección del CHC (198).

* Des- γ carboxiprotrombina (DCP): es más sensible y específica que la AFP para diferenciar a pacientes con HPC de aquellos con enfermedades crónicas hepáticas no malignas. En algunos estudios ha mostrado ser mejor que la AFP en la predicción de tumores con patrón invasivo, aunque sin significación estadística; también ha sido útil en el diagnóstico de recurrencias (199).

* Dipeptidil aminopeptidasa (GPDA-F): es una glucoproteína sérica rica en ácido siálico (200). Se trata de un nuevo marcador que puede resultar útil en el diagnóstico del CHC en los pacientes en que la AFP no está elevada.

* ARNm de la transcriptasa inversa de la telomerasa (hTERT): es detectable en el suero de pacientes con diversos tipos de cáncer, entre ellos el de pulmón y el CHC. Su positividad se relaciona de manera independiente con los valores de AFP, el tamaño tumoral y el grado de diferenciación, por lo que se podría utilizar para el diagnóstico temprano del CHC (201).

Tabla 11: principales marcadores biológicos

<i>Marcador de cáncer</i>	<i>Usos sugeridos</i>	<i>Fase de desarrollo</i>
<i>Marcadores séricos</i>		
Proteómica	Detección temprana y control de CHC	En proceso de evaluación
Proteasoma en plasma	Marcador de transformación maligna en pacientes cirróticos incluyendo aquellos con masa tumoral baja	En proceso de evaluación
<i>Marcadores de células tumorales</i>		
Células circulantes tumorales en sangre periférica detectado por RT-PCR de ARNm de AFP	Evaluación de pronóstico pre y post operatorio; predicción de recurrencia temprana y metástasis distante después de cirugía; asiste en decisiones terapéuticas; la utilidad clínica es controvertida y los hallazgos de estudios publicados inconsistentes	En proceso de evaluación
<i>Marcadores genéticos</i>		
Glutamato carboxipeptidasa del plasma, fosfolipasas A2 G13 y G7 y otras proteínas codificadas derivadas del microarreglo de ADNc	Evaluación de CHC temprano en pacientes con CHC con hepatitis viral crónica; evaluación de potencial metastático del CHC	En proceso de evaluación
Gen de antígeno de melanoma 1, 3; sarcoma sinovial en X cromosoma 1, 2, 4, 5; proteína sarcoplásmica de unión del calcio 1; carcinoma de células escamosas esofágicas New York 1	Complementario de AFP en control de recurrencia; antígenos candidatos para inmunoterapia	En proceso de evaluación
ADN metilado circulante (familia de dominio de asociación a ras 1A)	Detección y cuantificación de familia de dominio de asociación a ras 1A metilada circulante útil para <i>screening</i> , detección y pronóstico de CHC	En proceso de evaluación

1.7.3.- MARCADORES GENÉTICOS

Se conoce que la progresión tumoral es el resultado del bloqueo del control del ciclo celular y la apoptosis que en condiciones normales es llevado a cabo por los genes supresores de tumores, así como la activación de protooncogenes.

Los factores de transcripción más estudiados en la actualidad son p53, p63 y p73. Esta reciente identificación ha abierto un nuevo capítulo en la investigación del cáncer (202). Como iremos desarrollando a lo largo de este apartado, p63 y p73 juega un papel importante en el desarrollo normal, aunque también está clara su implicación en la tumorigénesis humana y en la respuesta del tumor a la terapia (203-205).

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso regulado genéticamente que participa en el remodelado tisular, así como en el mantenimiento de la homeostasis fisiológica en el organismo adulto. La resistencia a los procesos apoptóticos es un evento clave en los procesos tumorales. De hecho, 4 genes supresores de tumores y un oncogén directamente relacionados con la expresión de las subunidades de los receptores de muerte celular se incluyen entre los 125 genes inductores de cáncer con mutaciones puntuales detectados en el rastreo genómico de 3284 tumores.

La inducción de la apoptosis celular se lleva a cabo bien a través de la estimulación de receptores celulares y la activación directa de la maquinaria pro-apoptótica celular (células tipo I, vía extrínseca), o mediante la participación de la mitocondria (células tipo II, vía intrínseca). De este modo los receptores de muerte celular que se han relacionado con la muerte hepatocelular son TNF-R1, CD95 y TRAIL-R1 de los que hablaremos a continuación. La expresión de estos receptores y sus ligandos se encuentran incrementados en las enfermedades agudas y crónicas hepáticas, así como reducida en el CHC. La alteración de la señal dependiente de p53 es una de las mutaciones más prevalentes (20-50%) en el CHC. La inducción de muerte celular durante el

tratamiento anti-tumoral requiere la actividad funcional de p53. Asimismo, otros genes de la familia de p53 como p63 y p73 se han relacionado con la actividad anti-tumoral en líneas celulares de CHC. De hecho, una isoforma de p73 se ha relacionado con un mal pronóstico del CHC.

I. p53

El gen p53 humano está compuesto de 19.200 pares de bases, que ocupan más de más de 11 exones en el cromosoma 17p13.1 (Fig. 1). Es una proteína modular con un dominio de transactivación N-terminal (AT), un dominio rico en prolina (PRD) adyacente al TA, un dominio de unión al ADN (DBD), un dominio de tetramerización (4D) y un dominio C-terminal (CTD).

La secuencia de aminoácidos de p53 contiene serina, treonina y lisina que tienen un papel importante en su estabilización (206, 207).

Se conoce que la transcripción del gen p53 puede ser llevada a cabo a partir de dos sitios distintos localizados respectivamente a nivel del exón 1 o en un promotor interno localizado en el intrón 4.

Cuando la transcripción es llevada a cabo a partir de ese promotor alternativo, el resultado conduce a la expresión de una proteína p53 con una alteración a nivel del grupo amino-terminal iniciado en el codón 133 ($\Delta 133p53$). Cuando se producen fenómenos de *splicing* en el intrón 9, se generan tres isoformas: p53, p53 β y p53 γ , estas dos últimas carecen de dominio de oligomerización.

Es sabido también que el gen p53 humano puede codificar al menos nueve isoformas de la proteína p53, p53 β y p53 γ , $\Delta 133p53$, $\Delta 133p53\beta$, $\Delta 133p53Y$, debido al *splicing* alternativo del intrón 9 (Fig. 2).

El uso del promotor localizado en el intrón 4, puede dar lugar también a múltiples isoformas: $\Delta 40p53$, $\Delta 40p53\beta$, $\Delta 40p53\gamma$ (208, 209).

Estas isoformas de p53, pueden ejercer distintas actividades bioquímicas. $p53\beta$ preferentemente se une a los promotores que responden a p53 p21 y Bax en lugar de MDM2, mientras que p53 se une preferentemente a MDM2 y p21 en lugar de promotores Bax.

Esto sugiere que la relación o balance entre las distintas isoformas de p53 puede regular la respuesta de la célula a la activación de p53.

La relevancia clínica de estas diferentes isoformas de p53 está pendiente de dilucidar, pero será esencial para analizar su expresión en diferentes tumores humanos.

Figura 1: Estructura p53 humano

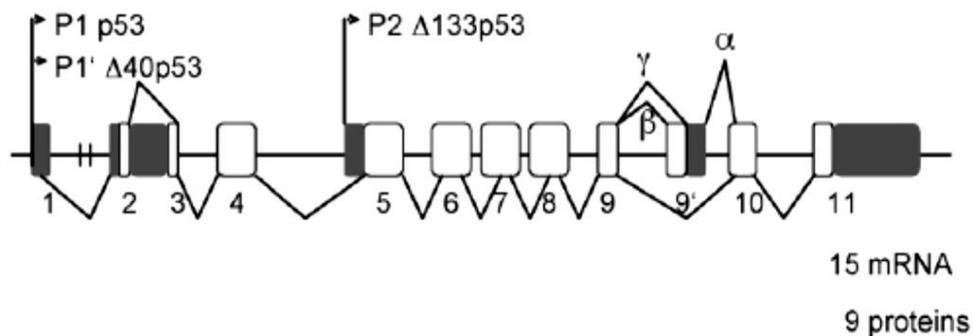
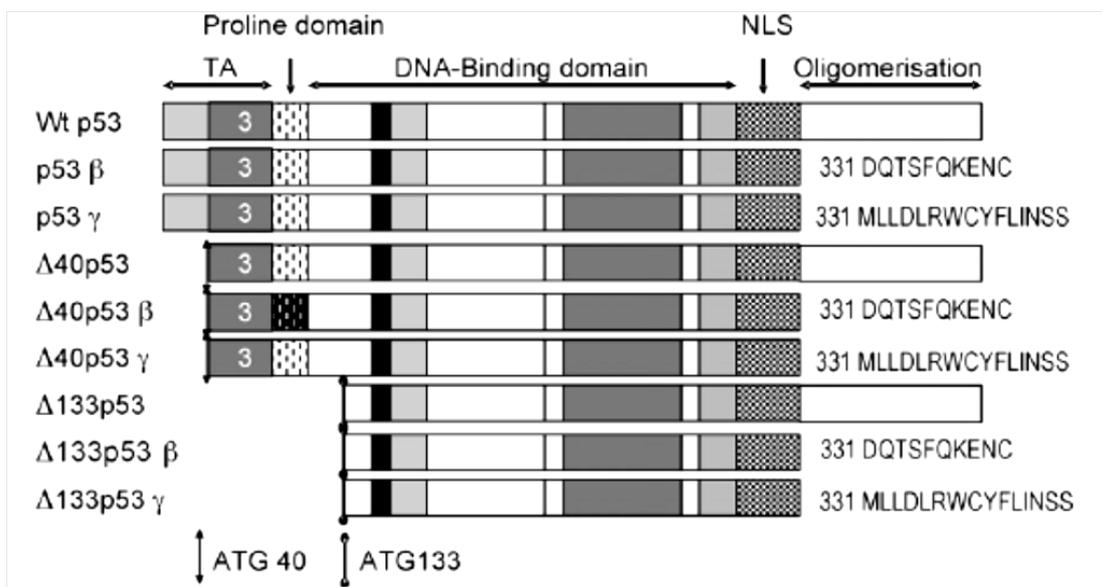


Figura 2: isoformas p53



I.a. *p53 en el cáncer*

TP53 es el prototipo de gen supresor de tumores. Su acción antitumoral se basa en su función proapoptótica y antiproliferativa en respuesta al estrés oncogénico (210-212). p53 activa la transcripción de varios genes encargados de la apoptosis o de la reparación del ADN dañado. Algunos de estos genes han sido identificados (creatinina quinasa del músculo, GADD45, waf-1/cip-1, Bcl-2/Bax, ciclina G, MDM2, TGF- α , IGF-binding protein y CD95L).

Esta actividad se inactiva en la mayoría de los tumores malignos humanos (213, 214) y se produce a su vez un aumento de los niveles de sus reguladores negativos (MDM2 y MDM4).

La participación de p63 y p73 en la apoptosis mediada por p53 es objeto de controversia (215). Un ejemplo de cooperatividad entre los tres miembros de

la familia p53 ha sido a nivel de los fibroblastos de embrión de ratón y en cultivos primarios de neuronas. En otros modelos celulares p63 y p73 son necesarios para inducir la apoptosis mediada por p53 en respuesta a doxorubicina, cisplatino y radiación gamma. Sin embargo, los resultados de otro estudio, indican, que al menos en timocitos, la apoptosis dependiente de p53, no requiere de la expresión de p63 y p73 (216).

En un estudio publicado recientemente se ha demostrado que la introducción de p53 en líneas celulares humanas de tumores aumentan la expresión del receptor CD95. Se ha demostrado que existe un elemento sensible a p53 en el primer intrón del gen de CD95 así como otros tres elementos en la parte promotora de dicho gen lo que explica que su expresión aumente en presencia de p53.

La activación de CD95 por la unión al CD95L (ligando) induce la apoptosis de células sensibles. CD95 es un receptor transmembrana tipo 1 que pertenece a la superfamilia de receptores de TNF- α , factor de crecimiento neuronal y el CD95L es una proteína transmembrana tipo 2 que pertenece a la familia del TNF- α .

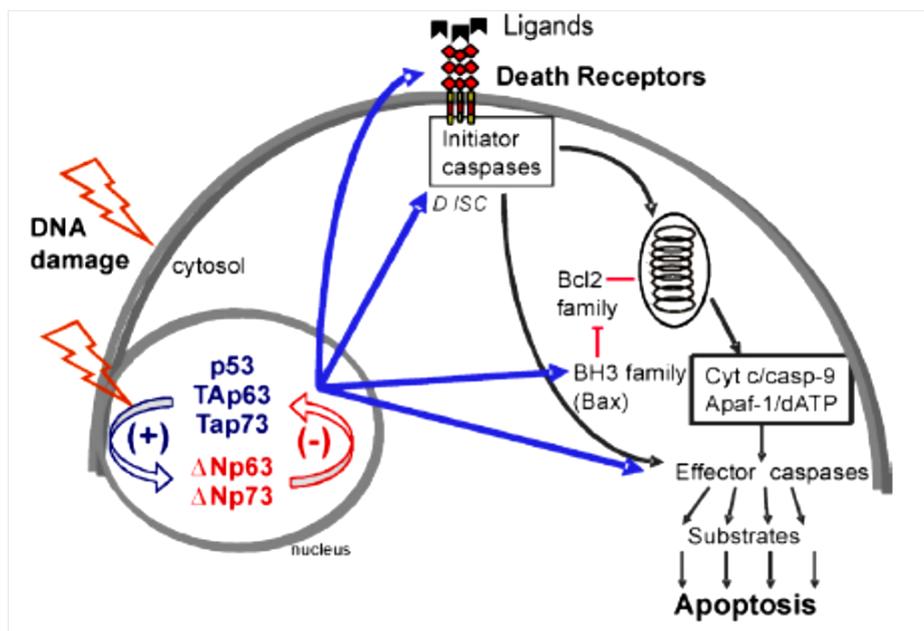
CD95 es sintetizado en una gran cantidad de tejidos, entre los que se encuentra el hígado que además es muy sensible a la apoptosis mediada por CD95. En este estudio se concluye que las drogas antineoplásicas inducen apoptosis en los hepatomas que tienen la forma nativa de p53 (p53 sin mutaciones) mediante el aumento de la expresión de CD95 y CD95L (Fig. 3).

Se ha observado que durante el tratamiento con bleomicina se produce una acumulación transitoria de wild-type de p53 y una expresión aumentada de

receptores de superficie para CD95. Lo mismo puede aplicarse a otras drogas como el cisplatino y metotrexate.

No se produce este aumento de CD95 con la bleomicina en las células que tienen el p53 mutado (Huh7) o en otra variedad de p53 (Hep3B).

Figura 3: Modelo de apoptosis regulada por la familia p53



I.b. p53 y quimiosensibilidad

Comprender la regulación de p53 sigue siendo un objetivo crucial en el diseño de estrategias contra el cáncer. La reactivación de esta vía p53 en los tumores es una de las estrategias más actuales en la terapia contra el cáncer.

Se han utilizado vectores de adenovirus para llevar TP53 intacto a células tumorales con resultados alentadores en un subgrupo de pacientes (217-219).

Otra molécula, denominada RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis), fue descrita como inductora de la apoptosis y por tanto con potencial actividad antitumoral (220).

Otra molécula de descubrimiento reciente, PRIMA-1, induce la apoptosis en las células tumorales que expresan isoformas mutadas de p53 (221). Estos estudios y otros demuestran que es posible restaurar la actividad de p53 en las células cancerosas.

II. p63

El gen del p63 humano está compuesto por 15 exones, con más de 270.000 pares de bases en el cromosoma 3q27. La transcripción de la forma TAp63 se inicia a partir del promotor a nivel del exón 1. Existen otras isoformas de la proteína p63: TAp63 α , TAp63 β , TAp63 γ , Δ Np63 α , Δ Np63 β , Δ Np63 γ . TAp63 se une al ADN a través de los mismos sitios de unión de p53 por eso se consideran *p53 like* y producen una acción similar a la del p53 (Figuras 3 y 4).

Figura 3: p63 humano

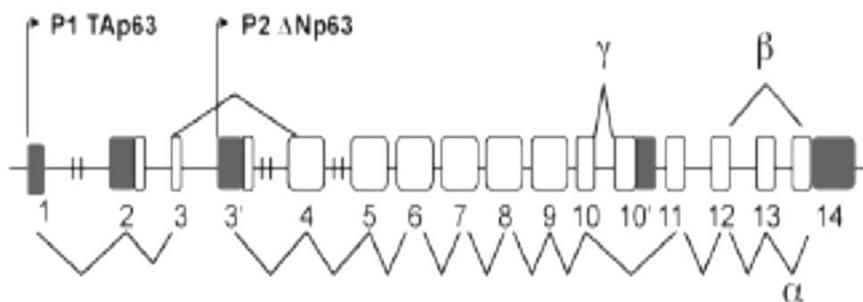
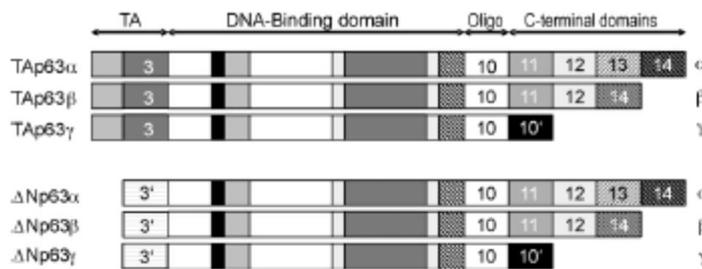


Figura 4: isoformas p63



II.a. *p63* y apoptosis

TAp63 activa genes que ejercen funciones en diferentes pasos del proceso de apoptosis. Tiene la capacidad, igual que p53 de activar genes que codifican receptores de muerte celular como CD95, TNF-R1 y TRAIL-R1 y -R2, así como genes que codifican otras proteínas (Bax, BCL2L11, Rad9, DAP3 y APAF1 (222).

ΔNp63 regula negativamente la apoptosis por lo que está considerado como un gen con papel oncogénico (223).

II.b. *p63* en el cáncer

A diferencia de p53, p63 rara vez se encuentra mutado en los cánceres humanos. En la mayoría de los tumores incluso se detecta una sobreexpresión de p63 lo que correlaciona este hallazgo con un papel pro-proliferativa u oncogénico (224).

Se ha observado expresión en más del 80% de las células de carcinomas de células escamosas del cuello (CECC), así como otras neoplasias epiteliales (225,226).

Las diferencias entre p63 y p53 fueron reveladas en estudios en ratones: los ratones sin p63, presentaban anomalías en el desarrollo como envejecimiento precoz, ausencia completa de la piel (227), falta de extremidades, así como de otras estructuras epiteliales (228) y la displasia severa craneofacial (229), pero sin más tendencia al desarrollo de tumores (230, 231). La razón de estas deficiencias radica en la falta de células madre que son necesarias para el desarrollo y la diferenciación de estas estructuras epiteliales. p63 es el único gen conocido por ser de importancia esencial para la supervivencia de las células madre epiteliales (232). En el caso de los ratones sin p53 aparece aumentado el riesgo de desarrollar tumores malignos (233).

El conocimiento del papel de p63 en la tumorigénesis es preliminar. Son necesarios más estudios para el entendimiento de la compleja red de interacciones entre las diferentes isoformas de p63, además de determinar cómo éstas influyen en otras proteínas de la familia p53.

II.c. p63 y quimiosensibilidad

Se ha demostrado recientemente que muchos agentes quimioterápicos inducen la síntesis de TAp63 α . El bloqueo a su vez de la síntesis de TAp63 endógeno confiere quimiorresistencia mediante la inhibición de la apoptosis (234). (Fig. 5)

Existen resultados *in vitro* que confirman que la expresión de Δ Np63 α está directamente relacionada con la respuesta al cisplatino en los tumores de cabeza y cuello (235) considerándose esta isoforma como un factor pronóstico de supervivencia.

Figura 5: Efecto de los agentes quimioterápicos en p63

Treatment	Isoform	Chemosensitivity	Organ/tissue/cell line
Bleomycin, doxorubicin, mitoxantrone	TAp63 α	↓↓	Hepatocellular carcinoma cell lines
Bleomycin, doxorubicin, cisplatin, mitoxantrone	TAp63 α	↑↑	Hepatocellular carcinoma cell lines

III. p73

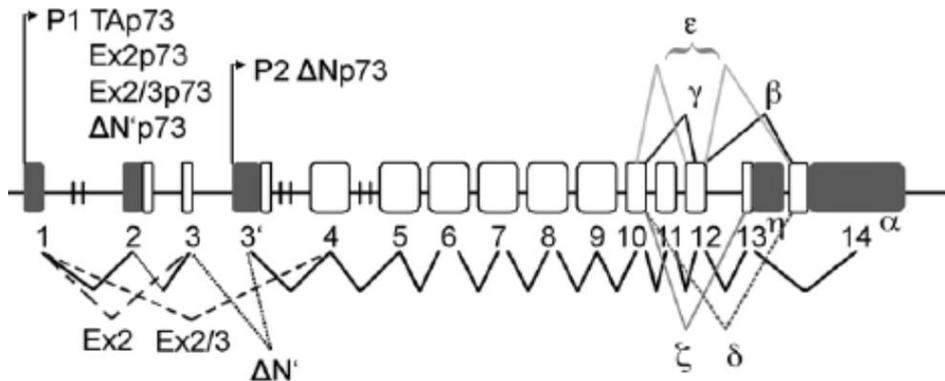
El gen p73 en el ser humano está compuesto por más de 80.000 pares de bases constituidos por 15 exones en el cromosoma 1p36.3 (236).

La expresión del gen TP73 se complica por la presencia de al menos siete isoformas derivadas de alteraciones a nivel del grupo C-terminal (p73 α - η) (237, 238) y de al menos otras cuatro derivadas de cambios a nivel del grupo N-terminal (239) (Fig. 6).

Al igual que p63, el gen p73 puede ser transcrito a partir de dos promotores diferentes con dos resultados: la proteína con dominio de transactivación (TAp73) a partir del exón 1 y las proteínas de inhibidoras carentes del dominio de transactivación (Δ TAp73) a partir del promotor alternativo del intrón 3. En total se han descrito hasta 29 isoformas.

Estas isoformas son capaces de unirse específicamente al ADN a través del sitio de unión del p53 y activar la transcripción de genes diana, provocando resultados similares como la detención del ciclo celular o apoptosis. Δ Np73 actúa como un potente inhibidor de la TAp63, de TAp73 y de la forma nativa de p53 (240). Así, el locus TP73 codifica tanto un supresor de tumores (TAp73) como un oncogen (Δ Np73) (241).

Figura 6: p73 humano



III.a. *p73 y la apoptosis*

TAp73 está implicado en la activación de la apoptosis tanto por la vía de las mitocondrias como por la vía intrínseca celular. TAp73 aumenta su expresión endógena en respuesta al daño del ADN provocado por las drogas quimioterápicas. Por el contrario, $\Delta Np73$ confiere resistencia a dichos fármacos antitumorales y lo lleva a cabo inactivando la expresión del gen CD95.

III. b. *p73 en el cáncer*

TP73, a pesar de su similitud con p53 no responde al prototipo clásico de gen supresor de tumores (242). Los ratones deficientes para TP73 no presenta una incidencia más alta de tumores y es extremadamente raro el hallazgo de mutaciones que inactivan al TAp73 en las células tumorales humanas.

En un porcentaje significativo de tumores aparece expresión aumentada de la isoforma dominante negativa, lo que va a favor de su papel oncogénico (243). $\Delta Np73$ coopera con el gen Ras en la transformación primaria de fibroblastos de embrión de ratón (MEFs) in vitro induciendo fibrosarcomas (244).

La sobreexpresión de $\Delta Np73$ en tumores crea un balance a favor de la actividad oncogénica en contra de la función proapoptótica de wild-type p53, TAp63 and TAp73.

Se ha visto una acción aumentada de $\Delta Np73$ en el gran número de tumores humanos. En el neuroblastoma, cuyas células expresan casi exclusivamente la forma nativa de p53, se ha visto una correlación de $\Delta Np73$ con el resultado clínico. También en la leucemia linfoblástica aguda infantil (LLA) se encontró un aumento de la expresión de $\Delta TAp73$, que puede contribuir a una quimiorresistencia.

Se ha demostrado también que una sobreexpresión de $\Delta Np73$ en el CHC se correlaciona con mal pronóstico. Este es un hallazgo importante y clínicamente relevante ya que sugiere que el uso de $\Delta Np73$ como un marcador pronóstico de los pacientes (245).

En un estudio reciente se ha determinado que DeltaEx2p73 (isoforma de p73) se expresa en hígados cirróticos y en otros sanos que albergan tumores primarios. También se ha demostrado que la activación del EGFR por su ligando, anfiregulina, cuya expresión se encuentra aumentada en el CHC activa la expresión de deltaEx2p73 que se encuentra en las células del CHC y en los hepatocitos normales. Sin embargo, aún más convincente fue el hallazgo de la expresión DeltaEx2p73 en casi el 100% de los tejidos normales del hígado de

los pacientes que habían desarrollado CHC y estaban libres de cualquier factor de riesgo conocido para el cáncer de hígado.

El aumento de la expresión de DeltaEx2p73 regulado por anfiregulina en los hepatocitos normales, actúa como un potente protector del daño hepático de manera que puede ser considerada como una nueva diana terapéutica en CHC y otros tumores y en vista de la asociación de deltaEx2p73 con la mala progresión de la enfermedad hepática, el análisis de estas variantes mediante una biopsia hepática podría tener un valor pronóstico.

III.c. p73 y quimiosensibilidad

En varios estudios se pone de manifiesto que p73 es esencial para la apoptosis inducida por agentes citotóxicos (Tabla 7) y que la inactivación de p73 por una mutación dominante negativa lleva a la resistencia de las células a la apoptosis inducida por agentes genotóxicos (246, 247).

TAp73 endógeno se activa en respuesta a una variedad de fármacos quimioterapéuticos y de radiaciones gamma mediante la activación de una vía dependiente de la tirosina quinasa c-Abl (248,249). Además, un estudio reciente indica que c-Abl es la responsable, mediante vías independientes de la p73, de la apoptosis inducida por gemcitabina (250).

Diversas variantes de p53 mutado pueden inhibir la acción de TAp73 (251). Los pacientes cuyo tejido tumoral expresa formas mutadas de p53 en el loci 72 de arginina (72R) han derivado en una peor respuesta a la terapia (252), que aquellos que expresan mutantes de p53 que codifica prolina en la posición 72 (72P).

La identificación de la vía de degradación específica es de importancia clínica ya que es una diana farmacológica ideal.

Figura 7: Efectos de los quimoterápicos en p73 endógeno

Treatment	Isoform	Organ/tissue/cell line
Adriamycin, cisplatin, taxol, etoposide, doxorubicin, camptothecin	TAp73 α ↑, TAp73 β ↑	Different tumor cell lines (colon cancer, squamous carcinoma cell lines, Saos2, a.o.)
Bleomycin, doxorubicin, mitoxantrone	TAp73↑, Δ Np73↑	Hepatocellular carcinoma cell lines
Cisplatin	TAp73 α ↑	Neuroblastoma and astrocytoma cell lines
Cisplatin, taxol	TAp73 β ↑	Saos2, Cos7 cells
Cisplatin	TAp73 α ↑	Primary pancreatic acinar cells
Cisplatin	TAp73	Colorectal cancer cell lines
Gemcitabine T-ara-C	TAp73↑	Colorectal cancer cell lines
Adriamycin	TAp73↑	Breast cancer cell lines
Cisplatin	TAp73 α ↑, TAp73 β ↑	HeLa cells

Objetivos

- 1) Determinar la asociación existente entre la expresión de los receptores de muerte celular y las isoformas TA y Δ N de p63 y p73 en el tejido tumoral y la supervivencia de los pacientes con HCC

- 2) Identificar el papel de las isoformas TA y Δ N de p63 y p73 en la expresión de los receptores de muerte y apoptosis en células tumorales hepáticas. Efecto del fármaco antitumoral Sorafenib.

- 3) Efecto de Sorafenib en la inducción de muerte celular, angiogénesis, fibrogénesis y dediferenciación celular en tumores derivados de células tumorales hepáticas implantadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes.

Materiales y método

Reactivos

Sorafenib (Nexavar®, Bayer, Suiza) se disuelve en dimetil sulfoxido (DMSO):H₂O (9:1). La actinomicina D (A9415, Sigma-Aldrich) es preparada en DMSO. La cicloheximida (C7698, Sigma-Aldrich) se prepara en H₂O bi-destilada. La epoxomicina (Ref 324801, Calbiochem, Darmstadt, Germany) (1 µM) y acetil-leucil-leucil-norleucinal (ALLN, Ref 208750, Calbiochem) (30 µM) también fueron preparadas en DMSO.

Estudio descriptivo en pacientes

Se estudiaron muestras de HCC procedentes de 35 pacientes con infección por VHC (51%), VHB (26%) y alcohol (23%). Las secciones (4 µ) procedentes de tejido tumoral hepático fijado con 4% paraformaldehido e incluido en parafina se utilizaron para medir la expresión de los receptores de muerte celular y los genes de p53 mediante inmunohistoquímica.

Estudios *in vitro*

Todas las líneas incluidas en los estudios *in vitro* son células tumorales diferenciadas de HCC de origen humano con diferente patrón de expresión de p53: Hep G2 (expresión nativa de p53), Huh 7 (expresión de una forma mutada de p53) y Hep 3b (no expresión de p53) (6). Las líneas celulares de HepG2 y Hep3b fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). La línea celular de Huh 7 se obtuvo de Apath, LLC (Nueva

York, USA). Las líneas celulares se han utilizado en un rango concreto de pasajes celulares para evitar la progresiva desdiferenciación y/o acumulación de nuevas mutaciones (10-20 ciclos). Ninguna de las líneas presenta contaminación en micoplasma. Las células fueron cultivadas (100,000 células/cm²) en medio de cultivo MEM con sales de Earl suplementado con L-glutamina (2 mM), suero bovino fetal (FBS) no des-complementado (10 %), piruvato sódico (1 mM), aminoácidos no esenciales (L-alanina 890 mg/l, L-asparagina 1500 mg/l, L-aspartico 1330 mg/l, L-glutámico 1470 mg/l, L-glicina 750 mg/l, L-prolina 1150 mg/l, L-serina 1050 mg/l), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), a 37°C en un incubador humidificado con 5% CO₂. El agente antitumoral Sorafenib (Nexavar®, Bayer, Suiza) se administró a la dosis de 10 µM a las 24 horas de la puesta en cultivo. Los inhibidores de la transcripción celular (actinomicina D, 2 µg/ml) y de la síntesis proteica (cicloheximida, 5 µg/ml) se añadieron 1 hora tras la adición de sorafenib. TNF-α (100 ng/ml) (Catalog# 300-01 A, Prepotech, New Jersey, USA), CD95L (200 ng/ml) (Catalog# 31 0-03H, Prepotech) y Trail (100 ng/ml) (Catalog# 310-04, Prepotech) se añadieron a las 12 horas de sorafenib valorándose el efecto a las 6 horas de la adición del agonista. La activación de caspasa-8, la expresión (mRNA y proteína) de los receptores de muerte celular, y la expresión (proteína) de los genes de la familia de p53 se evaluaron a las 12 horas de la administración de Sorafenib.

Expresión de CD95, TNF-R1, TRAIL-R1, p53, p53BP2, p63TA, p63ΔN, p73TA y p73ΔN

Se evaluó la expresión de RNAm y proteína de las proteínas en estudio. El RNA fue extraído de la muestra mediante el reactivo TRIsure (BIO-38033, Bioline Reagents Ltd., London, UK), y sometido a retrotranscripción (Ref 205311, Quiagen) y amplificación por RT-qPCR (BIO-98002, Bioline Reagents Ltd.). Esa retro-transcripción fue llevada a cabo mediante el sistema Mx3005Tm QPCR con ayuda del programa de análisis MxPro QPCR v. 3.00 (Stratagene, La Jolla, California). Las secuencias cebadoras utilizadas en el ensayo están descritas en la Tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización de la muestra durante 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y un último paso de 72°C durante 10 minutos.

Parámetros	Secuencias
β-actina (sentido)	5'-TGA GGA GCA CCC TGT GCT-3'
β-actina(antisentido)	
CD95 (sentido)	5'- CAAGGGATTGGAATTGAGGA-3'
CD95 (antisentido)	5'- TGGAAGAAAAATGGGCTTTG- 3'
TNF-R1 (sentido)	5'- GTGCCTACCCCAGATTGAGA- 3'
TNF-R1 (antisentido)	5'- TGTCGATTTCCCACAAACAA- 3'
TRAIL-R1 (sentido)	5'- AGAGAGAAGTCCCTGCACCA-
TRAIL-R1 (antisentido)	5'- GTCACTCCAGGGCGTACAAT- 3'

Tabla 1. Secuencias cebadoras utilizadas para la RT-PCR.

La expresión proteica de los receptores de muerte celular (CD95, TNF-R1 y TRAIL-R1) se valoró en las células tratadas con el tampón de lisis total celular (HEPES 50 mM pH. 7.5, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, PMSF 0,5

mM, DTT 1 mM, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM y la solución comercial de inhibidores de proteasa P8340). La expresión de los genes de la familia de p53, p53BP2 (proteína que incrementa en presencia de p53 mutado), p63TA, p63ΔN, p73TA y p73ΔN se determinó en la fracción nuclear obtenida tras el tratamiento de las células con Tampón A (HEPES 10 mM pH. 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, NP-40 0,625 %, PMSF 0,5 mM, DTT 1 mM, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM y la solución comercial de inhibidores de proteasa P8340) mantenido en hielo durante 15 minutos, y el posterior precipitado resultante de la centrifugación a 13000 rpm durante 2 min a 4°C resuspendido en tampón C (HEPES 20 mM pH. 7.9, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM y EGTA 1 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 1 mM, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM y la solución comercial de inhibidores de proteasa P8340). La muestra (100 μg de proteína) fue sometida a electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE al 12%, transfiriéndose las proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), que tras bloquear los sitios inespecíficos con una solución de albúmina bovina sérica (BSA) al 5% durante 1 hora, se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 2) a la dilución de 1/250 durante 12 horas a 4°C, y posteriormente con los anticuerpos secundarios correspondientes marcados con peroxidasa de rábano durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 3). La membrana fue revelada mediante el ensayo quimioluminiscente Pierce ECL Western Blotting Substrate (32106 Thermo Scientific). La β-actina se usó como control de carga de las proteínas.

Anticuerpo	Huéspe	Código	Casa comercial
Anti-CD95	Conejo	sc-715	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-TNF-R1	Conejo	sc-7895	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-TRAIL-R1	Cabra	sc-6823	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-p53	Conejo	sc-6243	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-p53BP2	Cabra	sc-10924	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-p63TA	Cabra	sc-8608	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-p63 ΔN	Ratón	sc-71827	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-p73TA	Ratón	IMG-246	IMGENEX; San Diego, CA, USA
Anti-p73 ΔN	Ratón	IMG-313A	IMGENEX; San Diego, CA, USA
Anti-β-actina	Ratón	sc-7895	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-caspasa-8	Conejo	sc-7890	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en el ensayo de Western-blot.

Anticuerpo	Huéped	Referenci	Casa comercial
Anti-conejo-	Cabra	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-cabra-HRP	Conejo	sc-2768	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-ratón-HRP	Cabra	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados en el ensayo de Western-blot.

La expresión de los receptores de muerte celular en la membrana celular fue analizada por citometría de flujo. Las células se recogen con la solución de disociación no enzimática (C5789, Sigma-Aldrich) y se incuban con los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla 2) (1 µg/100 µl BSA 0.5% con azida sódica 0.05%) durante 30 minutos en hielo, y tras un lavado se le adiciona el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente (Tabla 4) (1 µg/100 µl BSA 0.5% con azida sódica 0.05%) durante 30 minutos en hielo y oscuridad. Las células se lavan con 2 ml de tampón BSA 0.5% con azida sódica 0.05%, y se evalúa el grado de fluorescencia haciendo pasar las células a través del citómetro de flujo FC500-MPL (Beckman-Coulter).

Anticuerpo	Huéspe	Referencia	Casa comercial
Alexa 488 Anti-rabbitt IgG	Cabra	A11008	Invitrogen
Alexa 488 Anti-goat IgG	Conejo	A11078	Invitrogen

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en los ensayos de citometría de flujo.

Medición de la apoptosis celular

La activación de caspasa-8 se evaluó en las muestras tratadas con la solución de lisis total mediante la detección del fragmento activo de caspasa-8 siguiendo el procedimiento de electroforesis SDS-PAGE (15 %) acoplado a análisis de Western-blot similar al descrito previamente con la utilización del correspondiente anticuerpo primario y secundario (Tabla 2 y 3), así como con el ensayo de su actividad específica a través del ensayo comercial Caspase-Glo® 8 Assay Systems (G8201, Promega) basado en la utilización de un sustrato que tras escisión como consecuencia de la actividad de la caspasa-8 de la muestra se emite una señal de quimioluminiscencia que es detectada por un luminómetro. La señal emitida es proporcional a la actividad enzimática con la utilización de una recta de calibración.

Sobreexpresión de p53, TAp63, ΔNp63, TAp73

Los plásmidos para la sobreexpresión de las isoformas de p53 y p63/p73 fueron cedidos por el Dr. Guido Kroemer (INSERM U848, Institut Gustave Roussy, Université Paris-Sud 11, France) y el Dr. Gerry Melino (MRC Toxicology Unit, University of Leicester, UK), respectivamente. La expansión de

los plásmidos se realizó mediante infección de bacterias competentes *E.coli* de la estirpe DH5 α (T3007 Zymo Research). La purificación del plásmido se realizó mediante kit de maxiprep (Ref 12163, Quiagen). La sobreexpresión se llevó a cabo pre-incubando el reactivo de transfección de hepatocitos jetPEITM (Polyplus Transfection) con el plásmido de sobreexpresión (1 μ g ADN) durante 20 minutos a temperatura ambiente, esta mezcla posteriormente fue transferida al medio de cultivo desprovisto de SBF y antibiótico durante 6 horas. Transcurrido este tiempo se cambió el medio de cultivo, permitiendo la expresión de las proteínas en estudio por un periodo de 18 horas previo a la adición de Sorafenib.

Inhibición de la expresión de los genes de la familia de p53 y los receptores de muerte celular

La inhibición de la expresión general de p53, p63 y p73 se realizó mediante las estrategias de interferencia celular siRNA. Los siRNA utilizados fueron los utilizados en la Tabla 5. La expansión de los siRNA se realizó mediante transfección en bacterias competentes *E.coli* de la estirpe DH5 α (T3007 Zymo Research). La purificación del plásmido se realizó mediante kit de maxiprep (Ref 12163, Quiagen). Los ensayos de interferencia siRNA de p53, p63 y p73 se llevaron a cabo pre-incubando el reactivo de transfección oligofectamina (12252-011, Invitrogen) con el medio de transfección (sc-36868, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durante 5 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente añadir las secuencias de siARN (160 pmol) o siRNA control (80 pmol) (Tabla 5) dejando incubar durante 20 minutos a temperatura

ambiente. Las distintas transfecciones indicadas se llevaron a cabo con medio de cultivo desprovisto de SBF y antibiótico durante 6 horas. Transcurrido este tiempo se cambio el medio de cultivo, permitiendo la expresión de las proteínas en estudio por un periodo de 18 horas previo a la adición de Sorafenib.

Los estudios de interferencia por siRNA de los genes de la familia de p53, p63 y p73 no permitieron la discriminación entre las distintas isoformas, por lo que la reducción de la expresión de las isoformas TAp63, TAp73 y Δ Np73 se realizó mediante secuencias shRNA incluidas en el vector de expresión psiHIV-nH1 (Tabla 6). La expansión de los vectores se realizó mediante la transfección de bacterias competentes *E.coli* de la estirpe DH5 α (T3007 Zymo Research). La purificación del plásmido se realizó mediante kit de maxiprep (Ref 12163, Qiagen). La transfección de las células se realizó mediante pre-incubación del reactivo de transfección de hepatocitos jetPEITM (Polyplus Transfection) con el plasmido (1 μ g ADN) durante 20 minutos a temperatura ambiente, esta mezcla posteriormente fue transferida al medio de cultivo desprovisto de SBF y antibiótico durante 6 horas. Transcurrido este tiempo se cambio el medio de cultivo, permitiendo la expresión de las proteínas en estudio por un periodo de 18 h previo a la adición de Sorafenib.

siARN	Referencia	Casa comercial
siARN p53	sc-44218	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA, USA
siARN p63	sc-36161	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA, USA
siARN p73	sc-43730	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA, USA
siRNA-A (control)	sc-37007	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA, USA

Tabla 5. siRNA utilizadas en los estudios de interferencia celular.

shARN	Referencia	Casa comercial
shARN TAp63	CS-SH149J-HIVnH1	GeneCopeia, Rockville, Montgomery, USA
shARN TAp73	CS-SH150J-HIVnH1	GeneCopeia, Rockville, Montgomery, USA
shARN Δ Np73	CS-SH151J-HIVnH1	GeneCopeia, Rockville, Montgomery, USA
shRNA-A	CS-HCTR001-HIVnH1	GeneCopeia, Rockville, Montgomery, USA

Tabla 6. shRNA utilizadas en los estudios de interferencia celular.

Estudio *in vivo*

El efecto de Sorafenib en la progresión tumoral se ha evaluado en el modelo de implante subcutáneo de células tumorales hepáticas en ratones desnudos macho Hsd:Atímicos Nude-Foxn1nu (Harlan Laboratorios, Barcelona, Spain) de 4 semanas de edad (25-30 gr). Cuarenta y cuatro animales se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos en función del implante de células tumorales Hep G2 (n=12), Huh 7 (n=12) o Hep 3b (n=12) o control (n=8). Cada uno de los grupos con implante de células tumorales se dividieron aleatoriamente en dos grupos en función de la administración de Sorafenib o solvente. Las células (6×10^6) resuspendidas en medio de cultivo (100 μ l) se mezclaron con un volumen igual de matrigel (Ref 356231, Becton-Dickinson, Lot. 36821), y se implantaron subcutáneamente en el dorso centro-lateral derecho del animal. Cuando el tumor alcanzó los 5 mm, se inició el tratamiento con Sorafenib (200 mg/kg). Se preparó una solución concentrada de Sorafenib en etanol (0.32 mg/ μ l) que se guardó a -20°C. La solución de trabajo se

preparó diariamente mezclando la solución concentrada de Sorafenib en Koliphor EL (C5135, Sigma) y suero fisiológico a razón de 1:1:6. Los animales recibieron una dosis diaria de Sorafenib o solvente (5 µl/gr de ratón). Los animales se sacrificaron cuando alguno de los tumores de la serie de un mismo implante celular (con o sin Sorafenib) alcanzaba los 15 mm siguiendo las guías para el cuidado de los animales de experimentación en los modelos de cáncer con intención terapéutica (2-4 semanas) (7). Se calculó el volumen tumoral atendiendo a la siguiente fórmula $V=[(longitud)\times(anchura)\times(profundidad)\times\pi]/6$. El tumor fue recuperado, diseccionado y almacenado a -80°C o fijado con paraformaldehído al 4% e incluido en parafina para el procesado y evaluación posterior del grado de apoptosis, proliferación celular, fibrogénesis y angiogénesis, así como la expresión de CD95, TNF-R1, TRAIL-R1, p53, p53BP2, TAp63, ΔNp63, TAp73 and ΔNp73. El protocolo de manejo de los animales de experimentación fue aprobado por el Comité de Bienestar Animal de la Institución.

Estudios histológicos en el tejido tumoral

La expresión de los genes de p53, receptores de muerte, proliferación, angiogénesis y fibrogénesis en las secciones de tejido tumoral procedente de los pacientes con HCC y/o estudios *in vivo* se valoró por inmunohistoquímica. Brevemente, se obtuvieron secciones de 5 µm que eran posteriormente desparafinadas y rehidratadas con una serie de soluciones decrecientes de etanol. Tras la hidratación las secciones se lavaron brevemente en agua, y se bloquearon los sitios inespecíficos a temperatura ambiente en tampón TBSA-

BSAT (Tris 10 mM, NaCl 0.9%, azida sódica 0.02%, BSA 2% y Triton-x100 0.1%). Las secciones se incuban durante toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 7). A la mañana siguiente las secciones se lavan con tampón TBSA-BSAT, y se incuban durante 5 horas con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 8). La tinción nuclear de contraste se realizó con DRAQ-5th (Red Fluorescen Cell-Permeable DNA probe, Biostatus Limited, United Kingdom). La imagen de la inmunofluorescencia fue obtenida con el microscopio de fluorescencia Olympus BX61, y su análisis se realizó mediante los programas Application Suite Advanced Fluorescence e ImageJ.

Anticuerpo	Huéspede	Referenci	Casa comercial
Anti-CD95	Conejo	sc-715	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-TNF-R1	Conejo	sc-7895	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-TRAIL-R1	Cabra	sc-6823	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-Ki67	Ratón	IR626	Dako Diagnósticos, S.A., Sant Just Desvern,
Anti-CD31	Conejo	ab28364	Abcam; Cambridge, England,
Anti- α -sma	Conejo	ab5694	Abcam; Cambridge, England,
Anti-p53	Conejo	sc-6243	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-BP2	Cabra	sc-10924	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-p63TA	Cabra	sc-8608	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-p63 Δ N	Ratón	sc-71827	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Delaware, CA,
Anti-p73TA	Ratón	IMG-246	IMGENEX; San Diego, CA, USA
Anti-p73 Δ N	Ratón	IMG-313 ^a	IMGENEX; San Diego, CA, USA

Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados durante el procesado por inmunohistoquímica del tejido tumoral.

Anticuerpo	Huéspe	Referencia	Casa comercial
Alexa 488 Anti-rabbit IgG	Cabra	A11008	Invitrogen
Alexa 488 Anti-mouse	Cabra	A11001	Invitrogen
Alexa 488 Anti-goat IgG	Conejo	A11078	Invitrogen

Tabla 8. Anticuerpos secundarios utilizados durante el procesado por inmunohistoquímica del tejido tumoral.

Análisis *in situ* de la apoptosis celular

La apoptosis se evaluó mediante el ensayo DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (G3250, Promega) que identifica las roturas del DNA nuclear mediante la incorporación catalítica de fluoresceína-12-dUTP en el extremo 3'-OH del ADN usando la enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferasa (TdT), la cual, forma una cola polimérica usando el principio de los ensayos de TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling). El ADN marcado con fluoresceína-12-dUTP-se visualizó usando el microscopio de fluorescencia Olympus BX61. La cuantificación de la fluorescencia se llevo a cabo usando los programas Leica Application Suite Advanced Fluorescence e ImageJ.

Análisis Estadístico

Los resultados se presentan como media \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó a través del Análisis de la Varianza seguido del test post-hoc LSD. Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics 16.1.15.

Resultados

El incremento de la expresión de la isoformas p63 y p73 Δ N, así como la reducción de la expresión de los receptores de muerte celular son marcadores de mal pronóstico en los pacientes con HCC

En pacientes con HCC diferenciado con infección por VHB se detectó un incremento de la expresión en el tejido tumoral de las isoformas p63TA y p63 Δ N ($p \leq 0,01$), así como de p73TA y p73 Δ N ($p \leq 0,5$) en comparación con el resto de etiologías (VHC y alcohol) entre las que no había diferencias (Figura 1A).

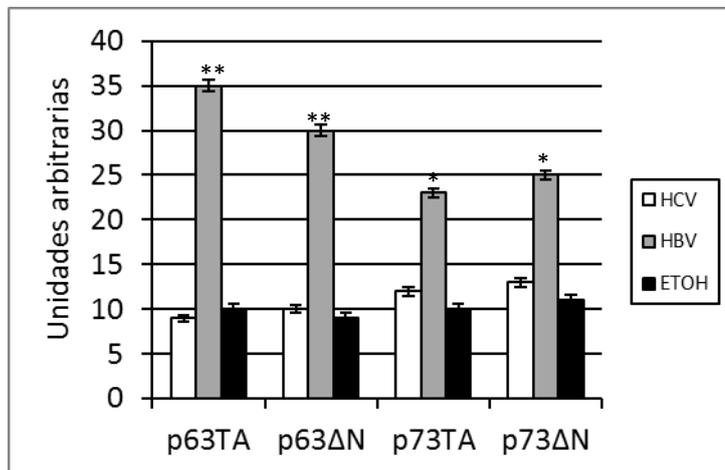


Figura 1A: Expresión de p63TA y p63 Δ N ($p \leq 0,01$), así como de p73TA y p73 Δ N en los tumores diferenciados

Asimismo, la presencia de VHB redujo significativamente la expresión de p63 y p73 en sus formas TA y Δ N en el tejido tumoral procedente de pacientes con CHC moderadamente diferenciado en comparación con el resto de etiologías (HVC y alcohol) entre las que no había diferencias (Figura 1B; $p \leq 0,5$). Estos datos indican que la presencia de VHB modula de forma significativa la expresión de p63 y p73 en sus formas TA y Δ N en el tejido tumoral dependiendo del grado de diferenciación del tumor.

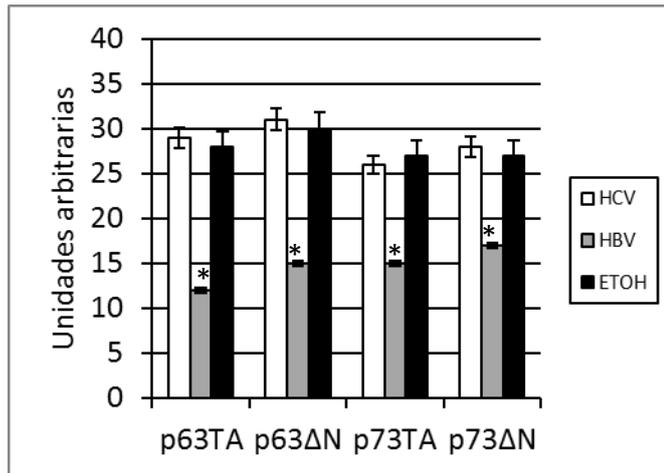


Figura 1B: Expresión de p63TA y p63ΔN ($p \leq 0,01$), así como de p73TA y p73ΔN en los tumores diferenciados.

La expresión de las isoformas p63ΔN y p73ΔN ($p \leq 0,5$, $p \leq 0,01$; respectivamente), pero no las isoformas p63TA y p73TA, se encontraron significativamente incrementadas en los pacientes que fallecieron por recurrencia del CHC (Figura 1C, 1D).

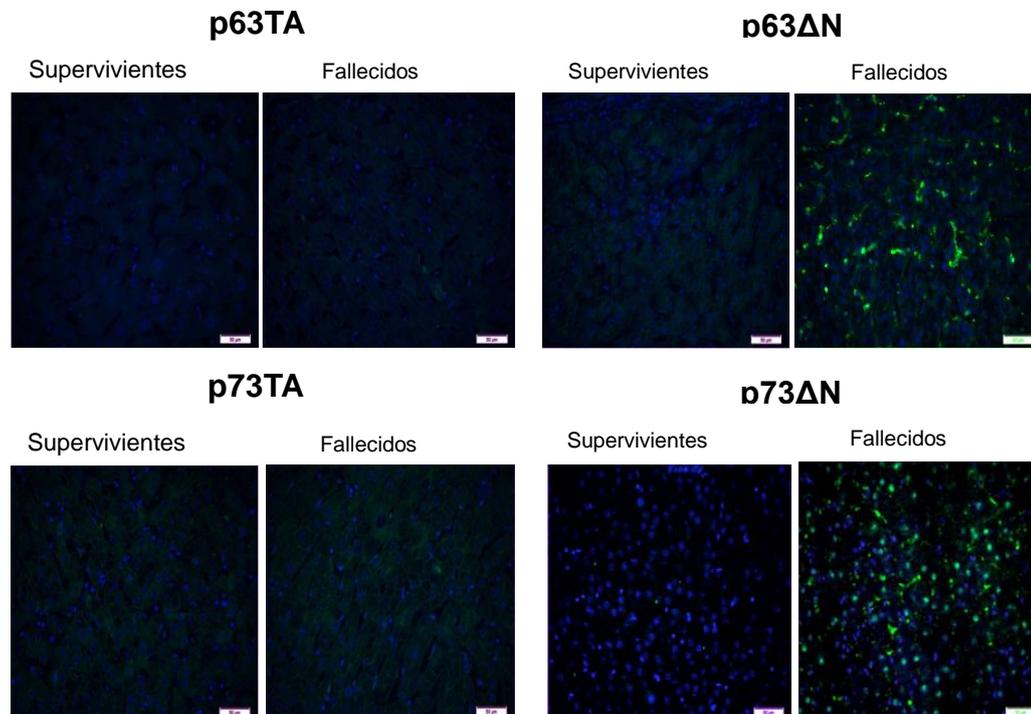


Figura 1C: Expresión de las isoformas p63 y p73 en CHC

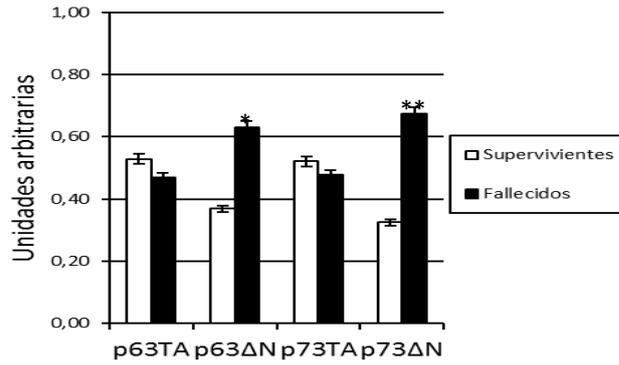


Figura 1D: Expresión de las isoformas p63 y p73 en CHC

Una asociación interesante se observó entre la expresión de p63 y p73 con los receptores de muerte celular en CHC. En este sentido, la expresión de TNF-R1 y TRAIL-R1 en HCC diferenciado procedente de pacientes infectados por VHB estaba significativamente reducida comparada con los pacientes infectados por VHC y alcohol (Figura 1E; $p \leq 0,01$, $p \leq 0,5$; respectivamente).

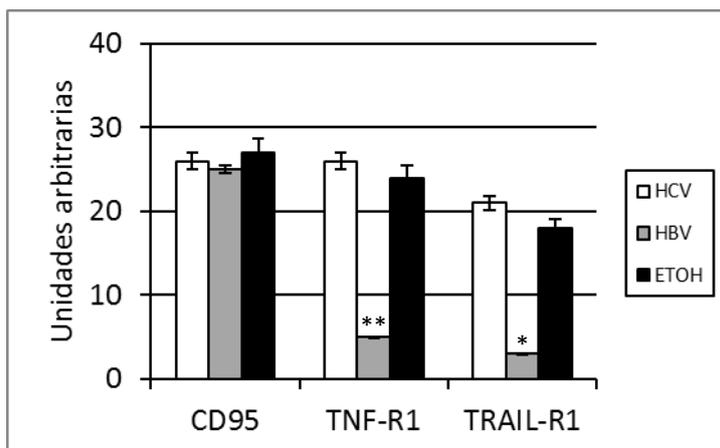


Figura 1E: Expresión de los receptores de muerte en tejido tumoral diferenciado

No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD95, TNF-R1 y TRAIL-R1 en los CHC moderadamente diferenciados (Figura 1F).

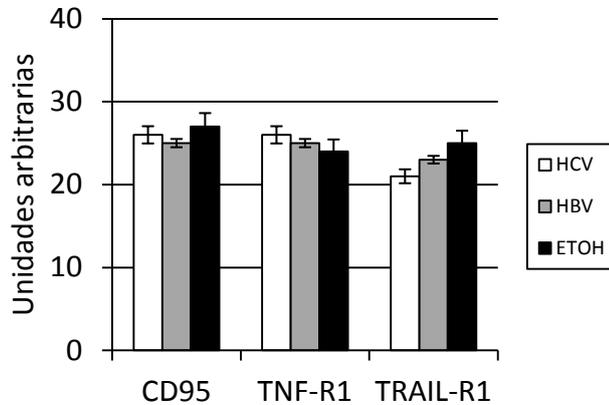


Figura 1F: Expresión de los receptores de muerte en tejido tumoral moderadamente diferenciado

Se observó una drástica reducción de la expresión de CD95 ($p \leq 0,001$), TNF-R1 ($p \leq 0,5$) y TRAIL-R1 ($p \leq 0,5$) en las muestras de HCC que procedían de pacientes que habían fallecido por recurrencia tumoral (Figura 1G, 1H).

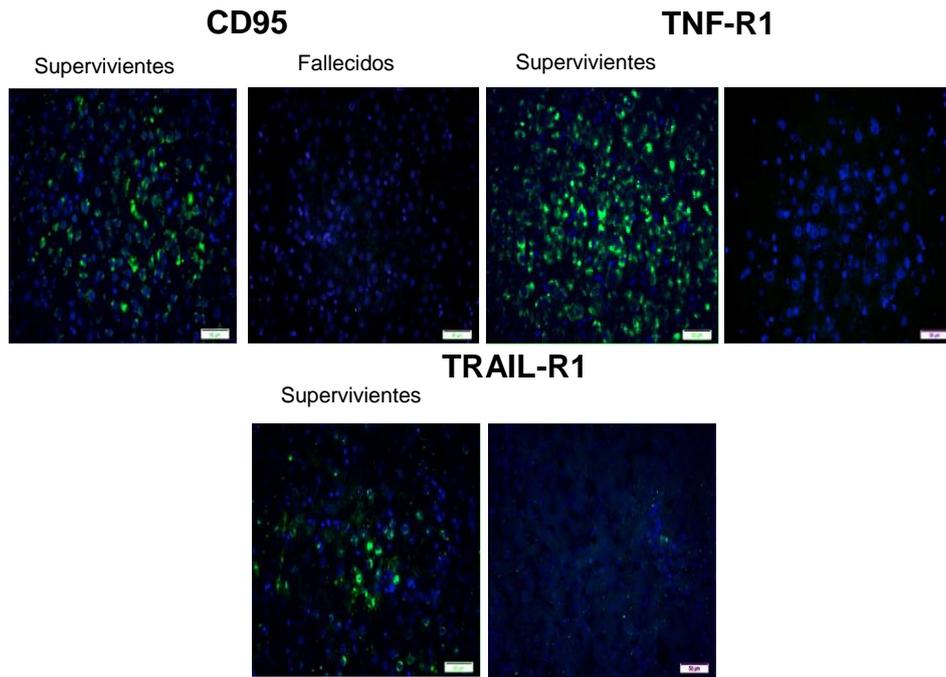


Figura 1G: Expresión de los receptores de muerte en CHC

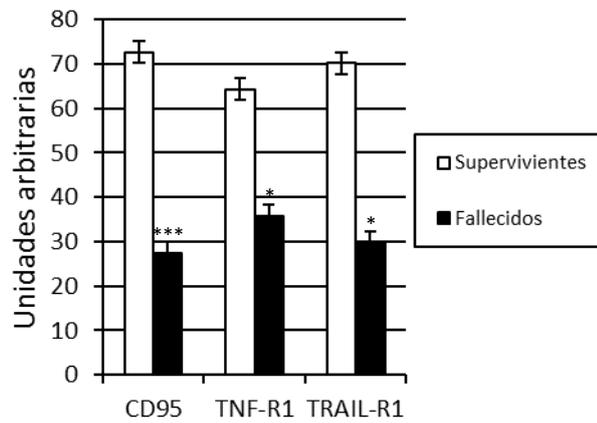


Figura 1H: Expresión de los receptores de muerte en CHC

Sorafenib incrementa la expresión de los receptores de muerte celular e induce muerte celular en células de CHC en cultivo

Sorafenib incrementó la expresión de TNF-R1 en el lisado celular (Figura 2A; $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$; respectivamente), y membrana celular (Figura 2B; $p \leq 0,5$). así como de ARNm (Figura 2C; $p \leq 0,01$) en las tres líneas celulares (HepG2, Huh 7 y Hep 3B).

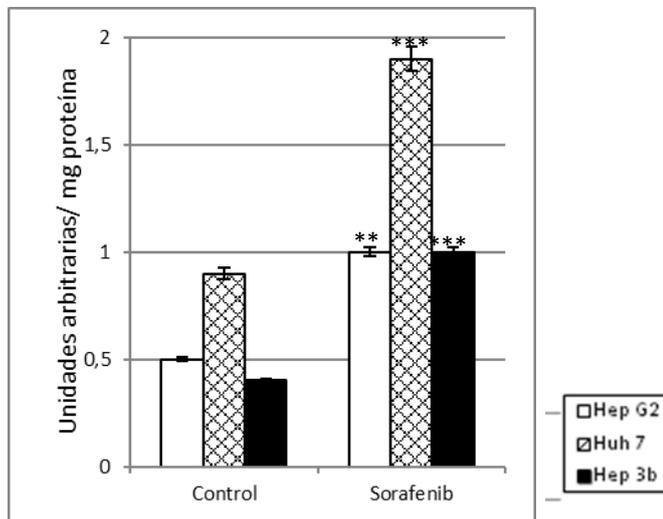


Figura 2A: Efecto de Sorafenib en la expresión proteica de TNF-R1 en lisado celular

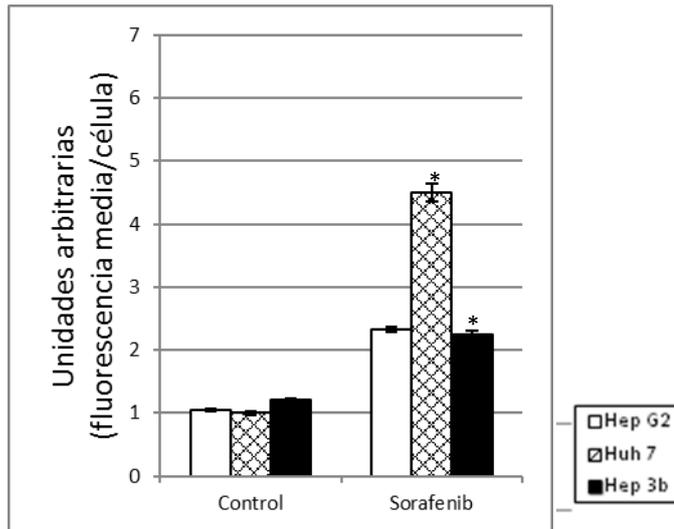


Figura 2B: Efecto de Sorafenib en la expresión proteica de TNF-R1 en membrana celular.

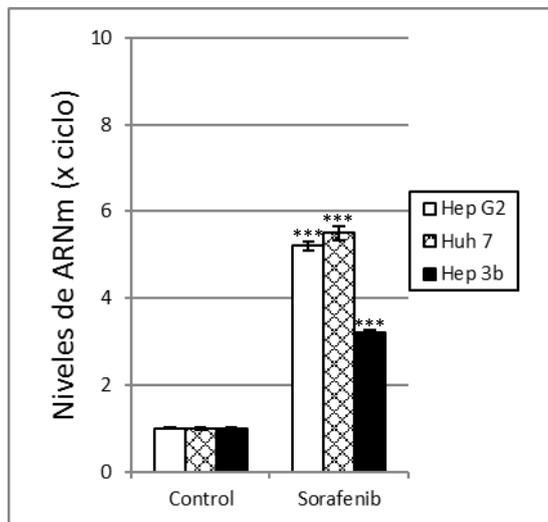


Figura 2C: Efecto de Sorafenib en la expresión mRNA de TNF-R1

Sorafenib incrementó la expresión proteica de CD95 y TRAIL-R1 en el lisado celular (Figura 2D, $p \leq 0,01$; Figura 2G, $p \leq 0,5$; respectivamente) y en membrana celular (Figura 2E, $p \leq 0,5$; Figura 2H, $p \leq 0,01$; respectivamente) en

Huh 7 y Hep 3b. La administración de Sorafenib incrementó significativamente la expresión de ARN_m de CD95 (Figura 2F; $p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,5$; respectivamente) y TRAIL-R1 (Figura 2I; $p \leq 0,5$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,01$; respectivamente) en los tres estirpes celulares.

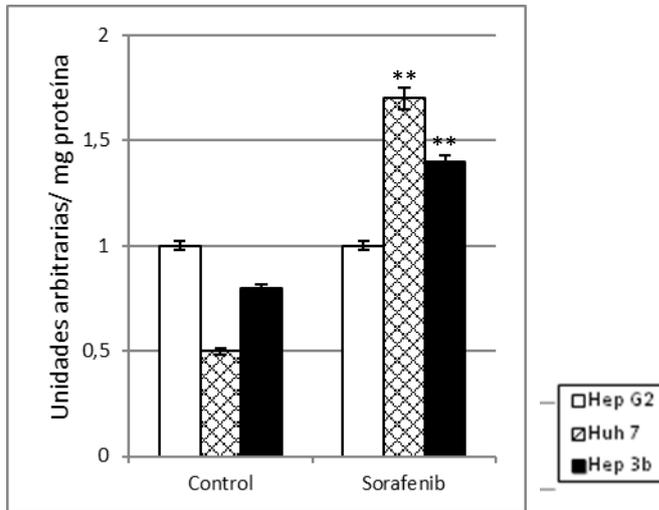


Figura 2D: Efecto de Sorafenib en la expresión proteica de CD95 en el lisado celular

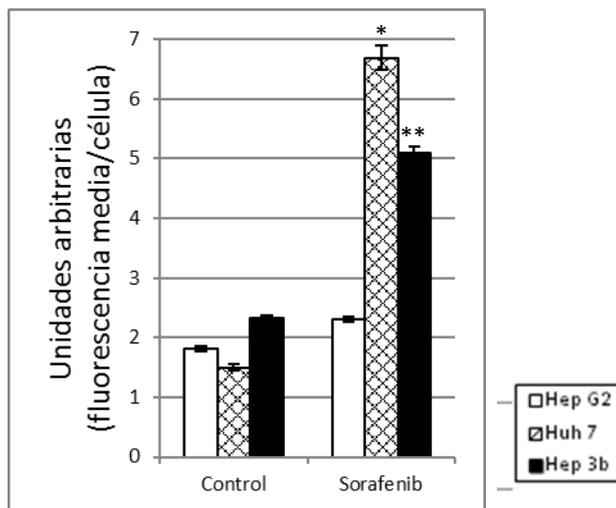


Figura 2E: Efecto de Sorafenib en la expresión proteica de CD95 en la membrana celular

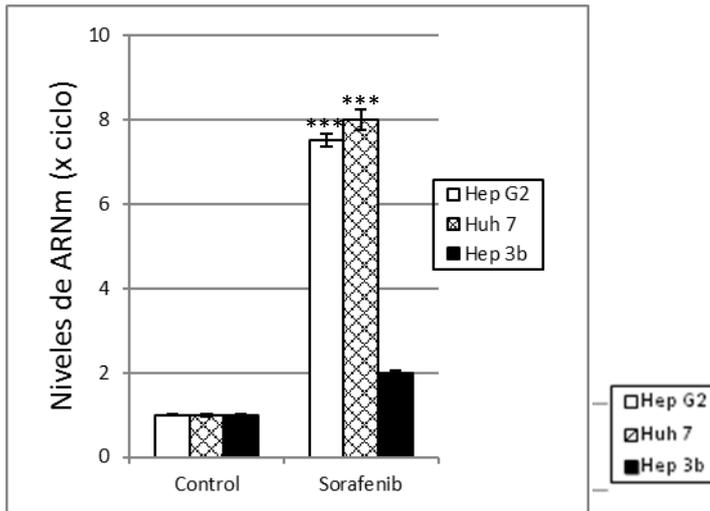


Figura 2F: Efecto de Sorafenib en la expresión mRNA de CD95

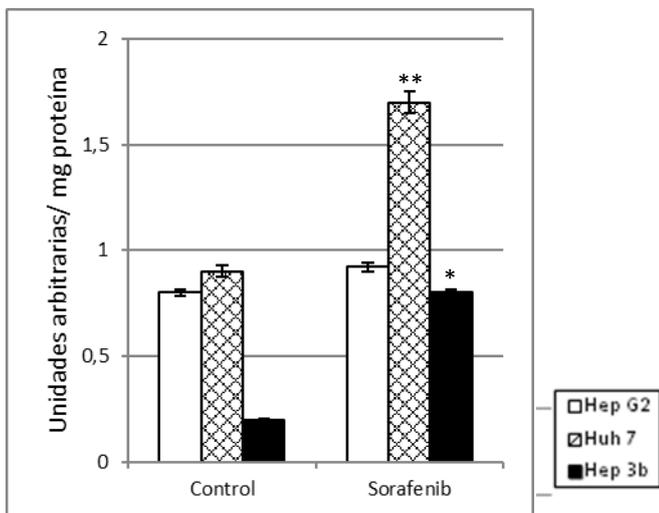


Figura 2G: Efecto de Sorafenib en la expresión proteica de TRAIL-R1 en el lisado celular

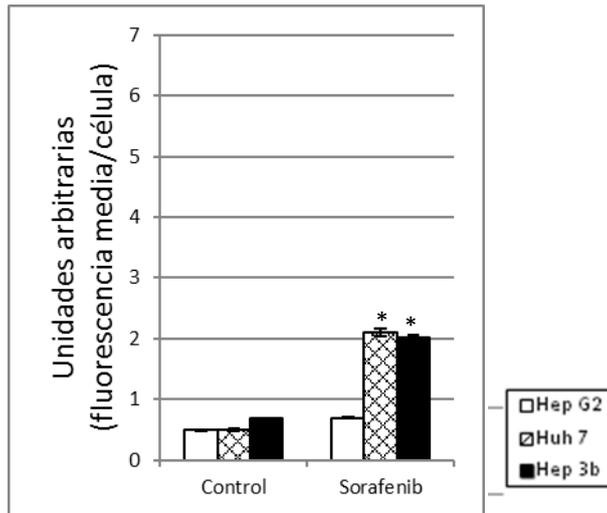


Figura 2H: Efecto de Sorafenib en la expresión proteica de TRAIL-R1 en la membrana celular

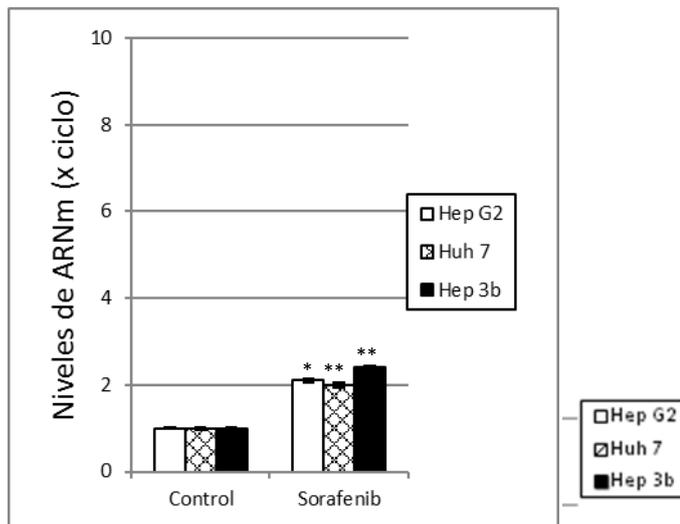


Figura 2I: Efecto de Sorafenib en la expresión mRNA de TRAIL-R1

La participación de los procesos de inducción transcripcional y traduccional fue evaluada mediante la administración de actinomicina D (inhibidor de la transcripción) y cicloheximida (inhibidor de la síntesis de

proteínas) respectivamente. El incremento de expresión de TNF-R1, CD95 y TRAIL-R1 por Sorafenib fue reducida con actinomicina D (Figura 3A, 3C y 3E; $p \leq 0,5$, respectivamente) y cicloheximida (Figure 3B, 3D y 3F; $p \leq 0,5$ respectivamente).

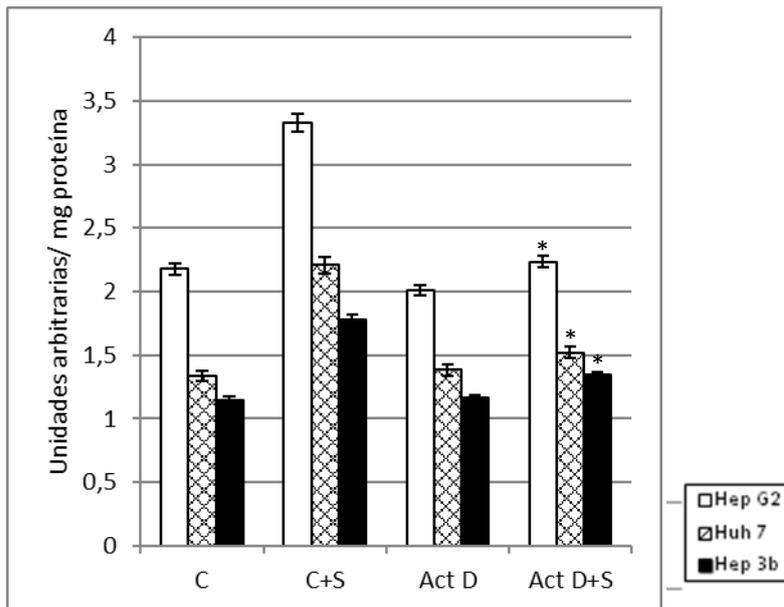


Figura 3A: Efecto de actinomicina D (Act) en el incremento de la expresión de TNF-R1 por Sorafenib

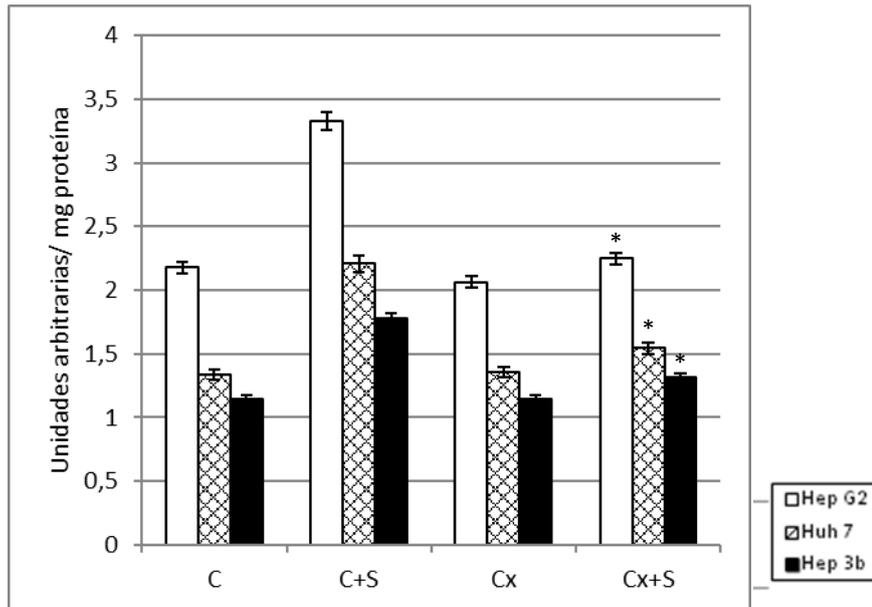


Figura 3B: Efecto de cicloheximida (Cx) en el incremento de la expresión de TNF-R1 por Sorafenib

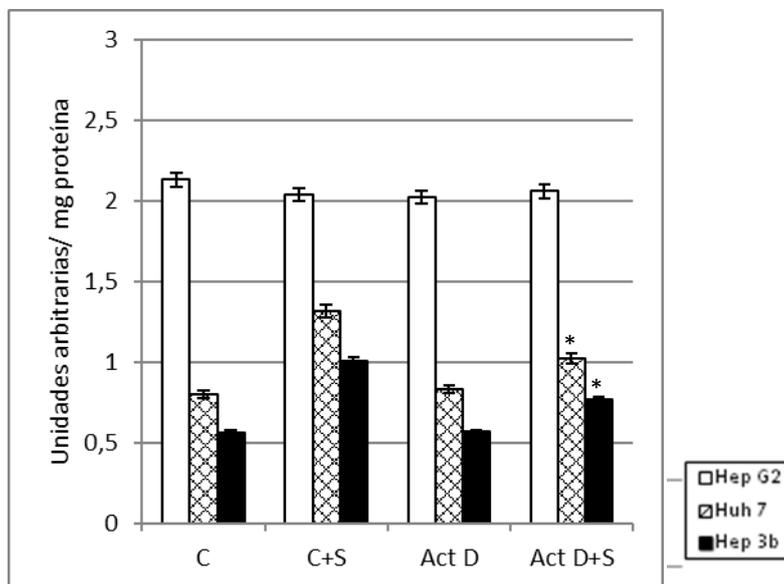


Figura 3C: Efecto de actinomicina D (Act) en el incremento de la expresión de CD95 por Sorafenib

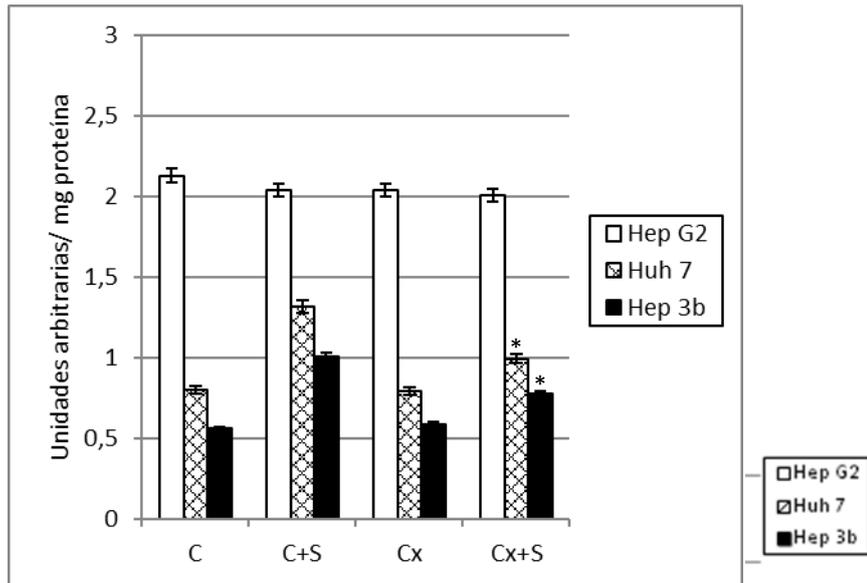


Figura 3D: Efecto de cicloheximida (Cx) en el incremento de la expresión de CD95 por Sorafenib

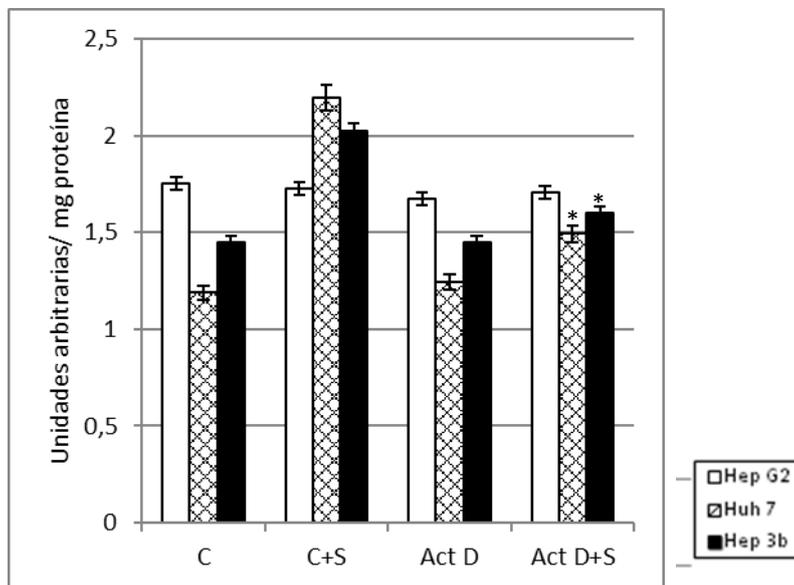


Figura 3E: Efecto de actinomicina D (Act) en el incremento de la expresión de TRAIL-R1 por Sorafenib

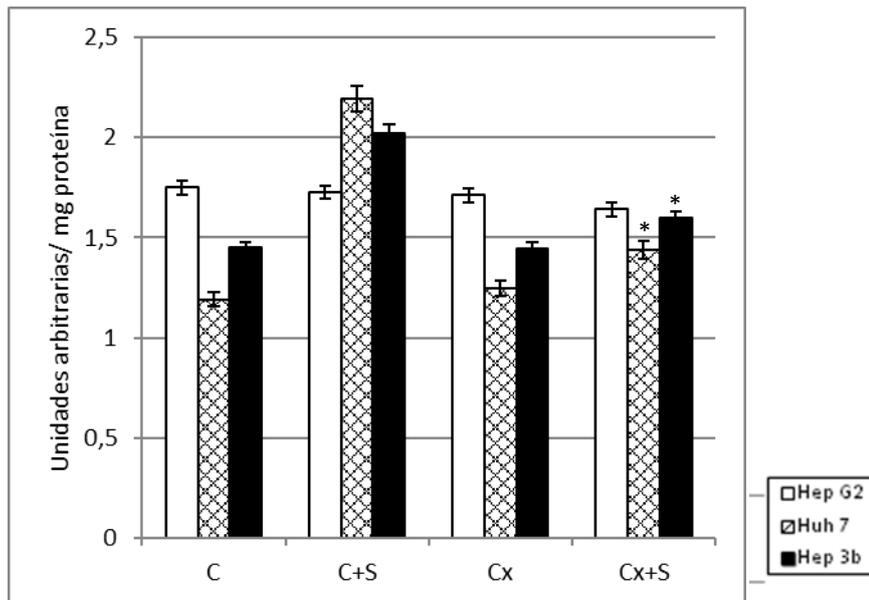


Figura 3F: Efecto de cicloheximida (Cx) en el incremento de la expresión de TRAIL-R1 por Sorafenib

El incremento de expresión de los receptores de muerte celular se correlacionó con una inducción de los procesos de apoptosis. Sorafenib aumentó la actividad caspasa-8 (Figura 4A; $p \leq 0,5$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$; respectivamente) y el procesamiento de su fragmento activo (Figura 4B; $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$; respectivamente) en Hep G2, Huh 7 o Hep 3b.

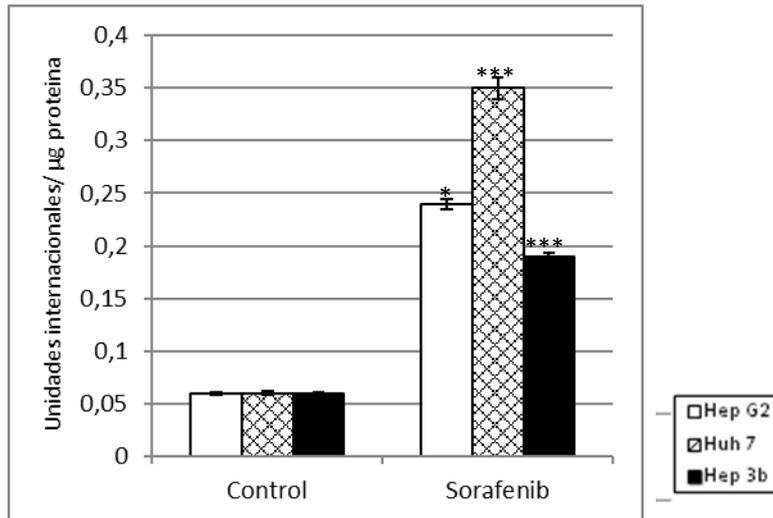


Figura 4A: Efecto de Sorafenib en la actividad caspasa-8

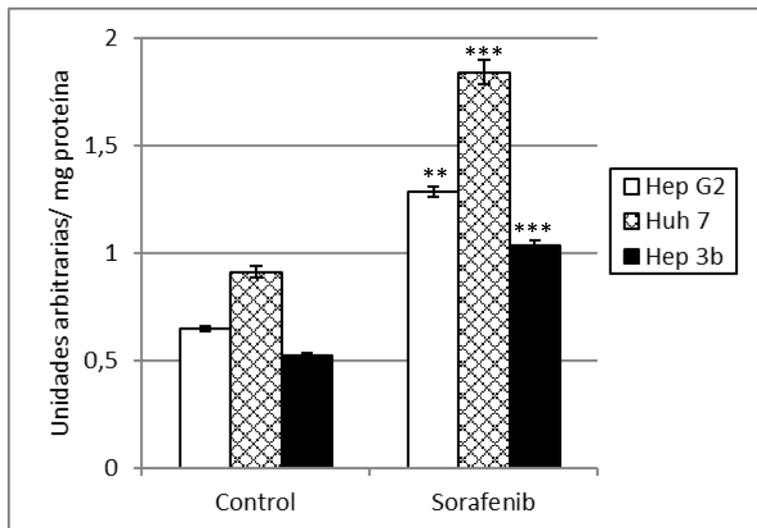


Figura 4B: Efecto de Sorafenib en el procesamiento de caspasa-8

En este sentido, la magnitud de la inducción de la apoptosis por Sorafenib seguía de forma decreciente el orden Huh 7 > Hep G2 > Hep 3b (Figura 4A, 4B). La repercusión funcional del incremento de la expresión de los receptores se validó con la adición de los agonistas según el incremento

específico de cada receptor de muerte celular en las distintas estirpes celulares. En este sentido, a las células Hep G2 se añadió TNF- α , y a Huh7 y Hep 3b se añadieron los tres agonistas (TNF- α , CD95L y Trail). La adición de TNF- α fue capaz de incrementar (130 %, $p \leq 0,001$) la apoptosis por Sorafenib en Hep G2 (Figura 4C, 4D). TNF- α (185 %, $p \leq 0,01$) y Trail (170 %, $p \leq 0,5$), pero no CD95L, produjo un incremento de la apoptosis celular por Sorafenib en Huh 7 (Figura 4C, 4D). De forma diferente, la adición de los tres agonistas indujo un incremento de la muerte asociada a CD95 (147 %, $p \leq 0,01$), TNF-R1 (215 %, $p \leq 0,5$) y TRAIL-R1 (210 %, $p \leq 0,5$) por Sorafenib en Hep 3b que se mide por la actividad de caspasa-8 y el fragmento activo como se observa en las figuras 4C y 4D.

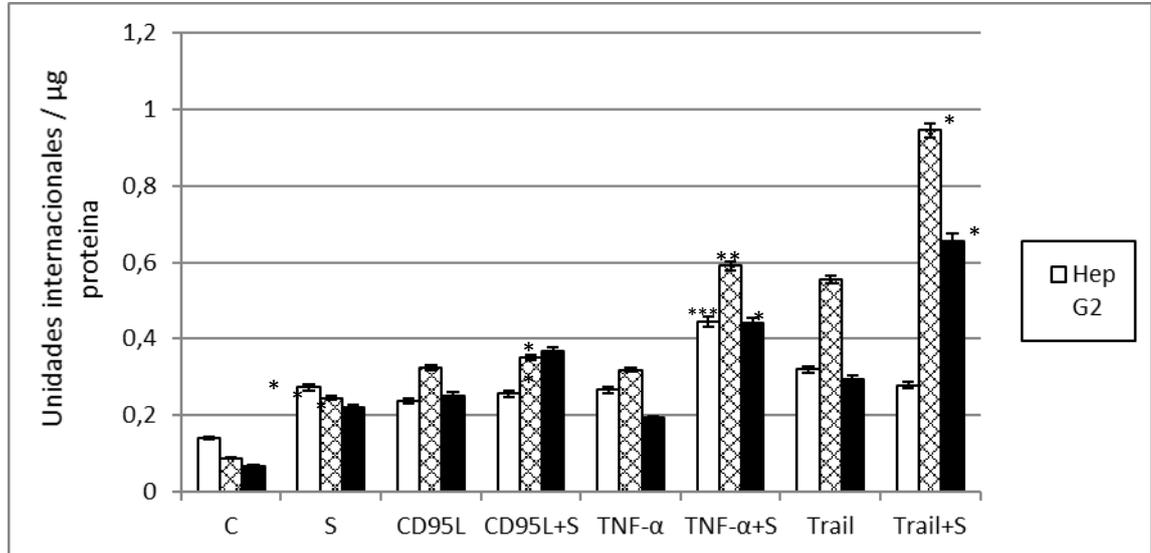


Figura 4C: Efecto de Sorafenib (S) en la actividad caspasa-8 inducida por agonistas

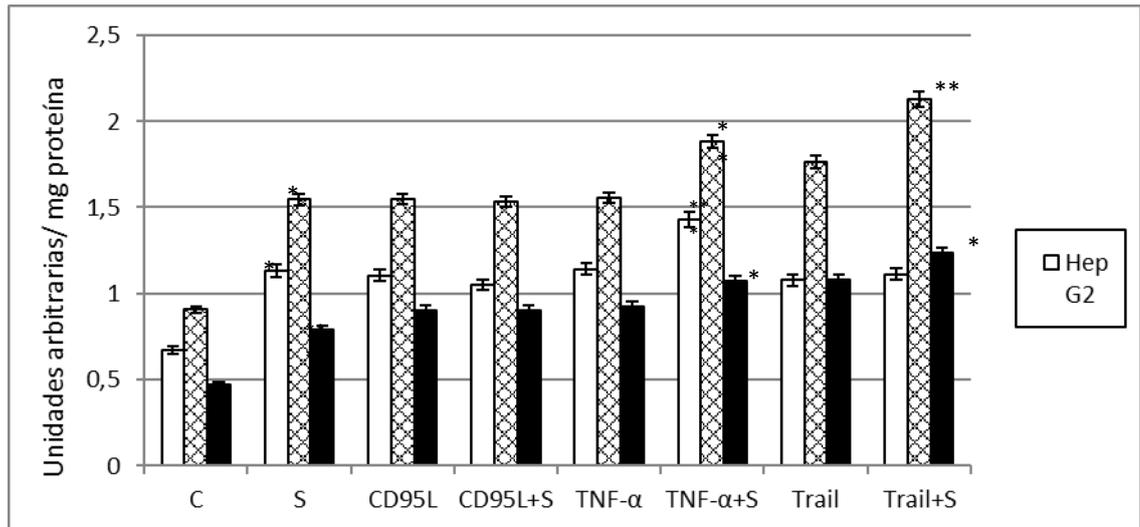


Figura 4D: Efecto de Sorafenib (S) en el procesamiento caspasa-8 inducida por agonistas

Reducción de la expresión de los receptores de muerte celular

La capacidad de los siRNA de reducir la expresión de CD95, TNF-R1 y TRAIL-R1 fue verificada en todas las líneas celulares (Figura 5A).

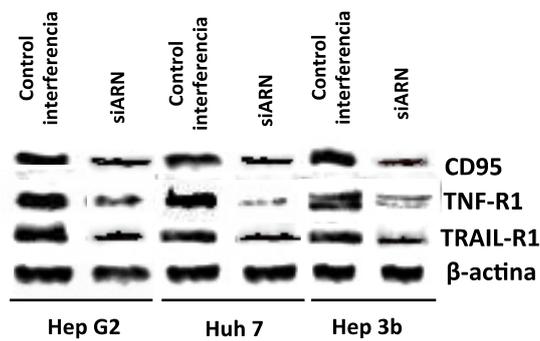


Figura 5A: Control de la expresión de los receptores de muerte celular con los correspondientes siRNA

La interferencia de un receptor no supuso una alteración de la expresión del resto de receptores debido a la especificidad de los siRNA utilizados- En este sentido, la administración de los siRNA previno el efecto estimulador de Sorafenib sobre la expresión de TNF-R1 (Figura 5B), CD95 (Figura 5C) y Trail-R1 (Figura 5D), la actividad caspasa-8 (Figure 5E) y el procesamiento de pro-caspasa-8 (Figura 5F).

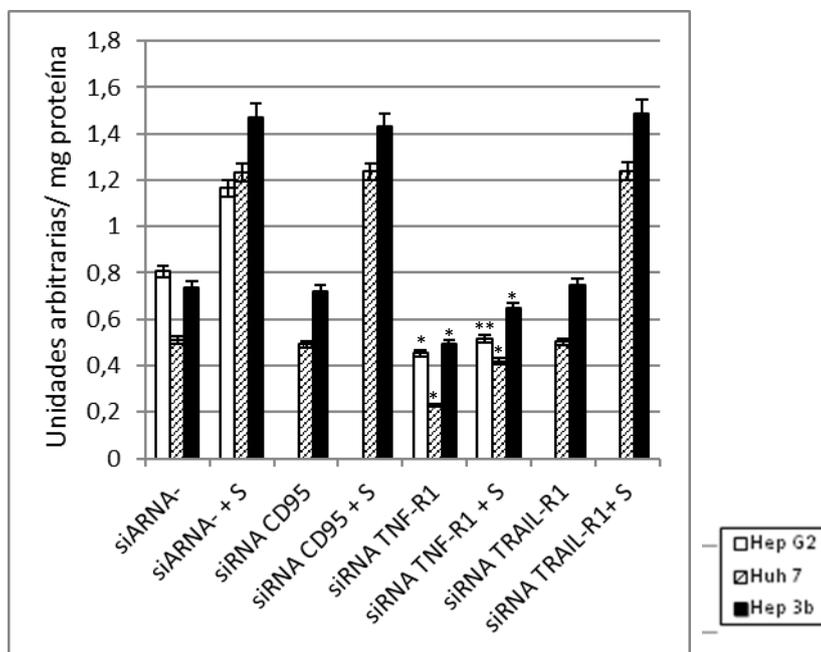


Figura 5B: Efecto de siRNA frente a la inducción de la expresión de TNF-R1 por Sorafenib

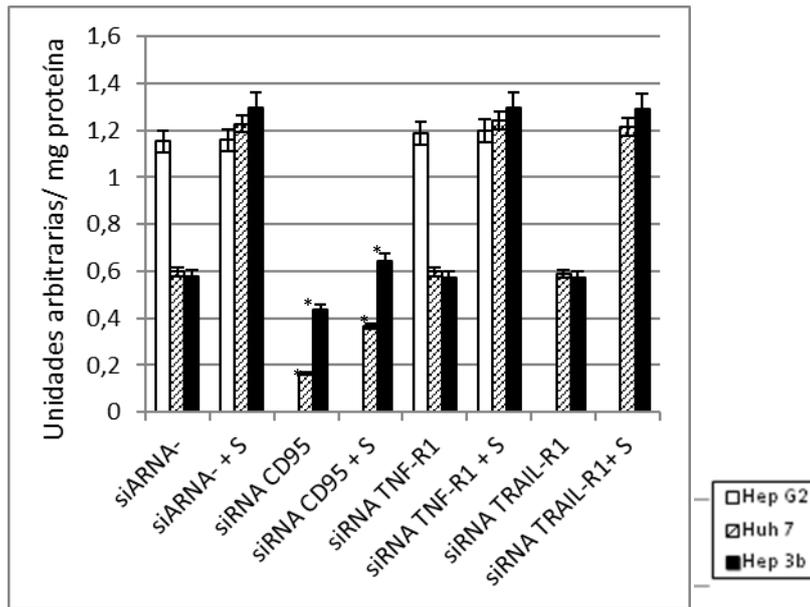


Figura 5C: Efecto de siRNA frente a la inducción de la expresión de CD95 por Sorafenib

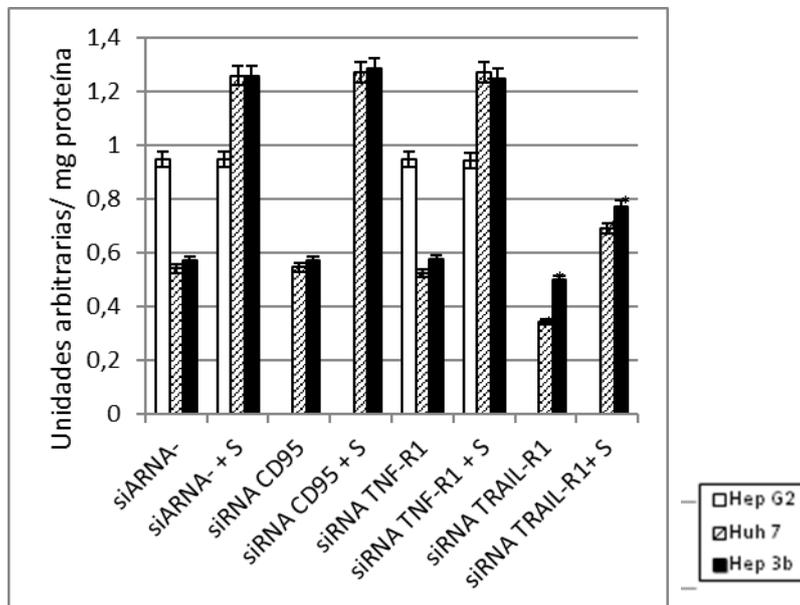


Figura 5D: Efecto de siRNA frente a la inducción de la expresión de TRAIL-R1 por Sorafenib

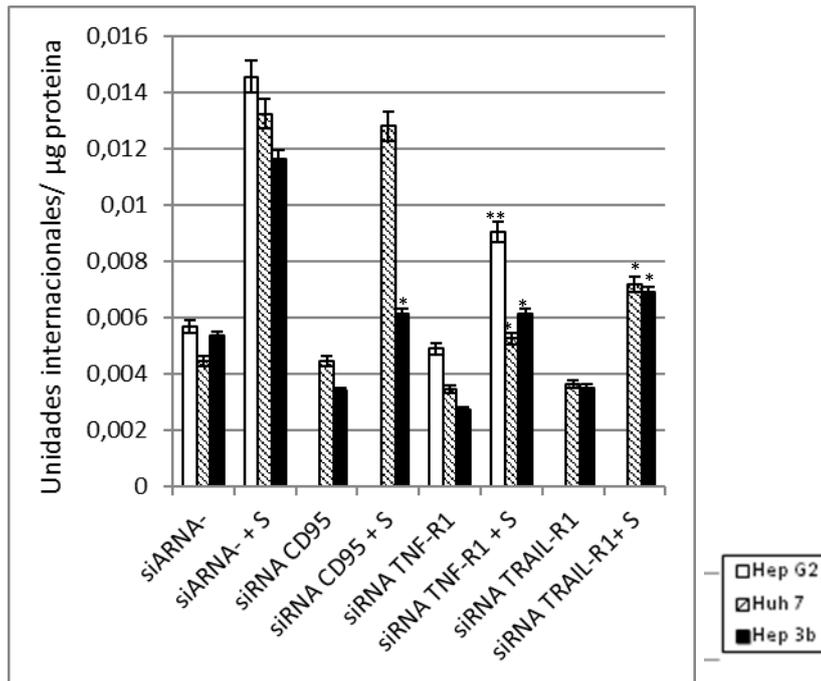


Figura 5E: Efecto de siRNA frente a la inducción de la actividad caspasa-8 por Sorafenib

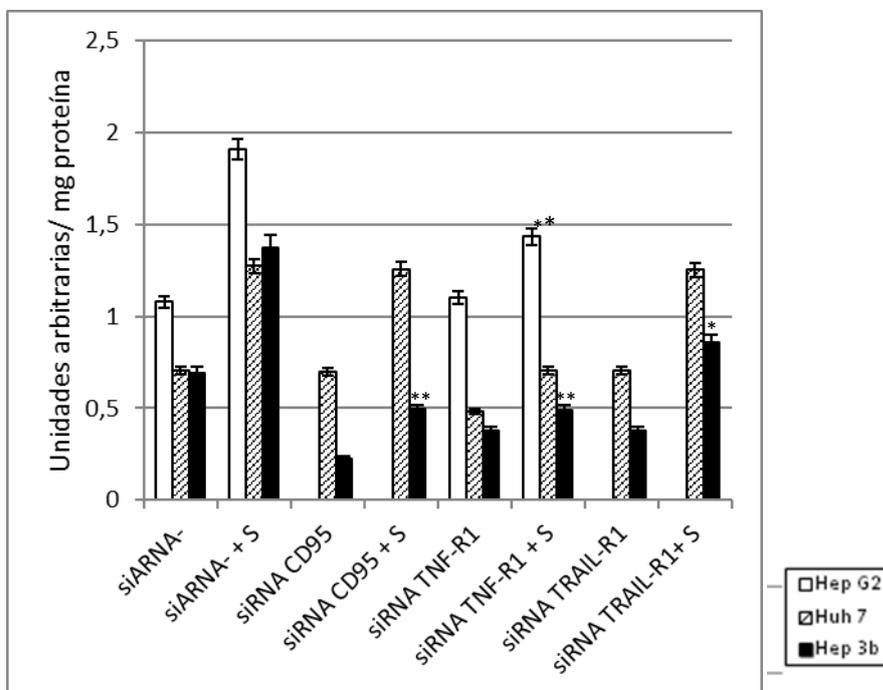


Figura 5F: Efecto de siRNA frente a la inducción del procesamiento de caspasa-8 por Sorafenib

Regulación de la expresión de los genes de p53 por Sorafenib

Se evaluó la alteración de la expresión de p53, p53BP2 (gen de una proteína regulada por la forma mutada de p53), p63TA, p63ΔN, p73TA y p73ΔN como consecuencia de la inducción de muerte celular por Sorafenib. Sorafenib incrementó la expresión nuclear p53 (Figura 6A; $p \leq 0,01$), redujo la expresión de p63ΔN (Figura 6D; $p \leq 0,5$), y no produce cambios en la expresión de p53BP2 (Figura 6B), p63TA (Figura 6C), p73TA (Figura 6E), y p73ΔN (Figura 6F) en Hep G2. Sin embargo, Sorafenib incrementó la expresión de p63TA (Figura 6C; $p \leq 0,5$) y p73TA (Figura 6E; $p \leq 0,5$), y redujo la expresión de p63ΔN (Figura 6D; $p \leq 0,5$) en Huh 7 y Hep 3b.

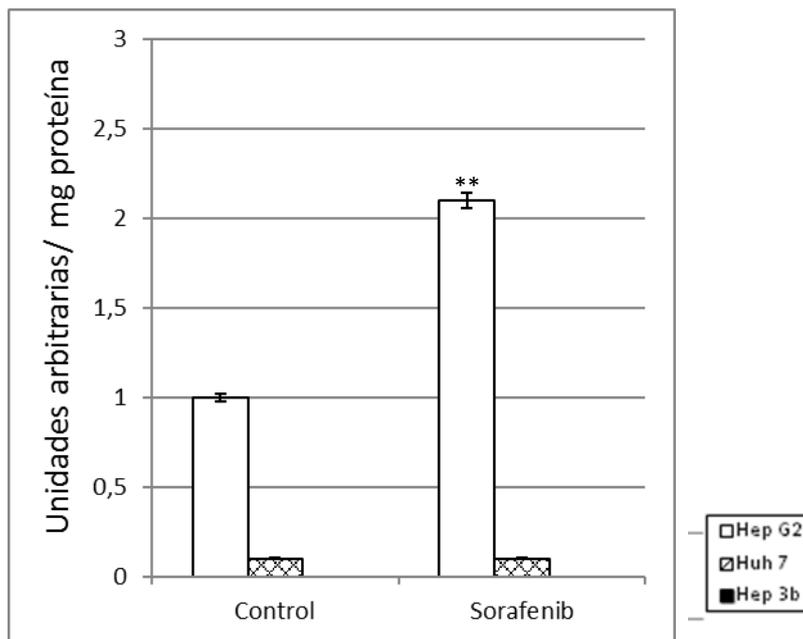


Figura 6A: Efecto de Sorafenib en la expresión de p53

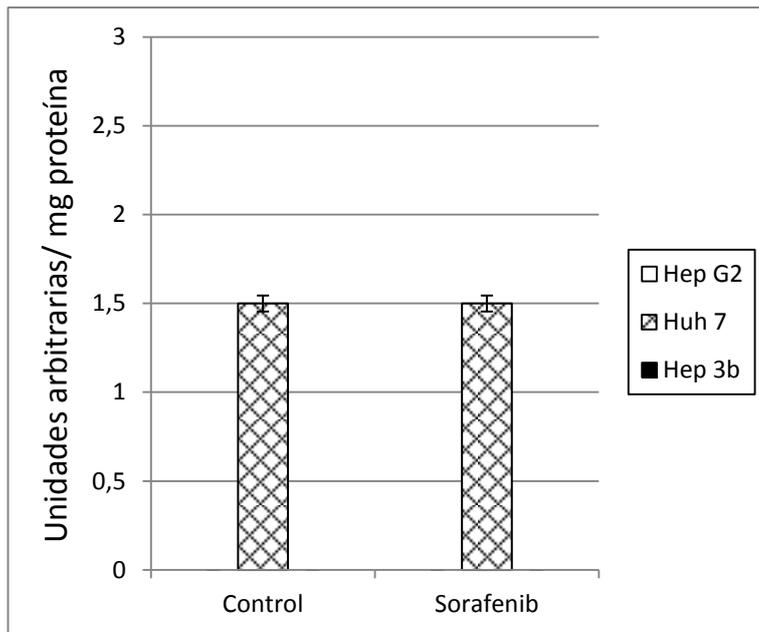


Figura 6B: Efecto de Sorafenib en la expresión de p53BP2

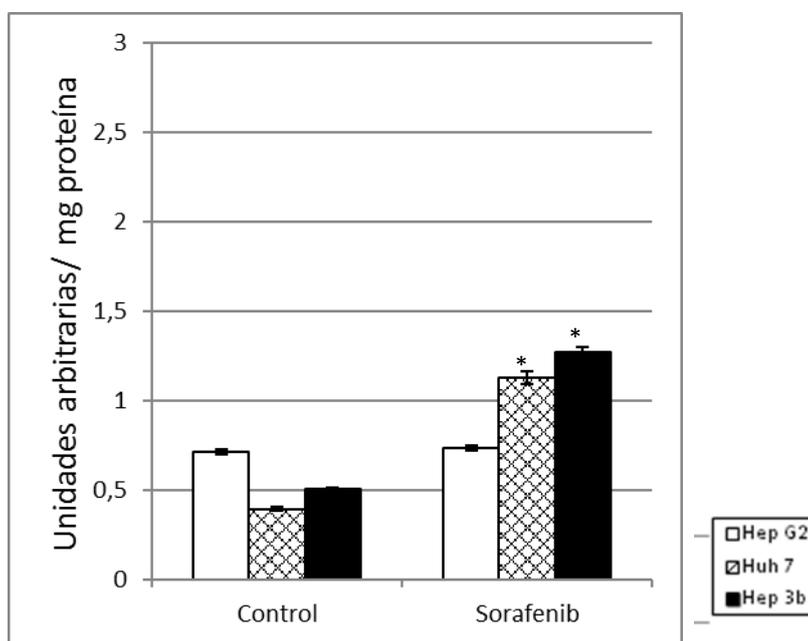


Figura 6C: Efecto de Sorafenib en la expresión de p63TΔ

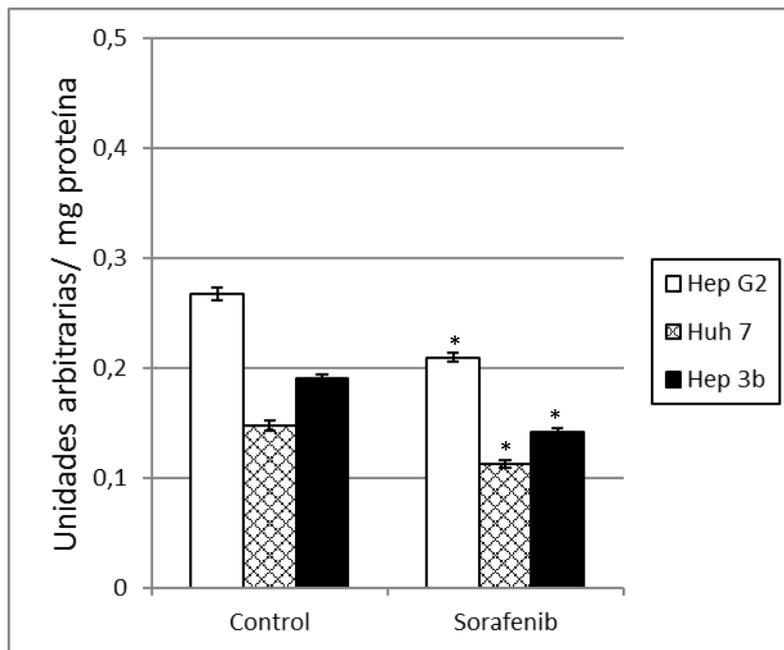


Figura 6D: Efecto de Sorafenib en la expresión de p63ΔN

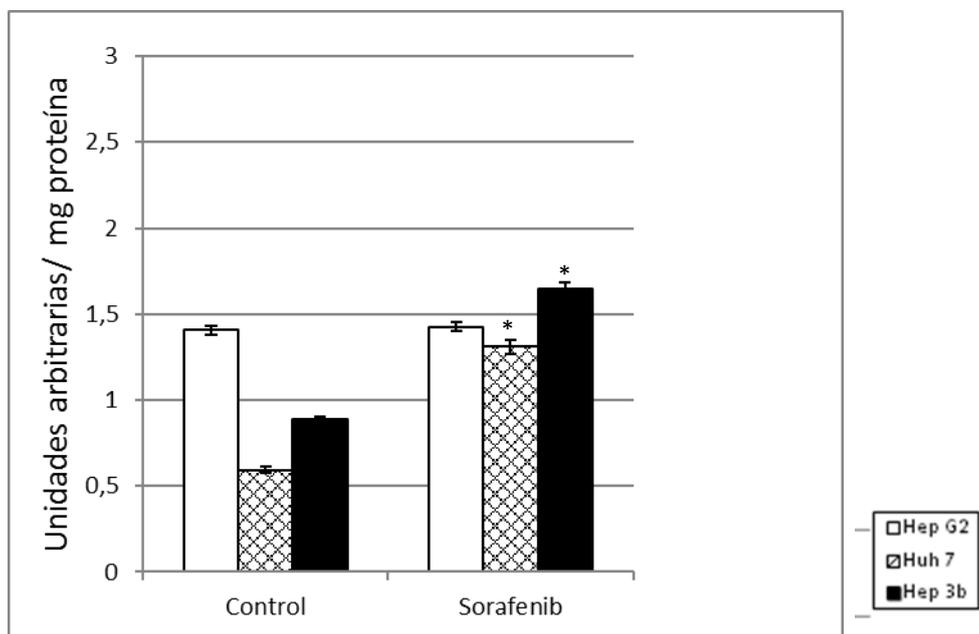


Figura 6E: Efecto de Sorafenib en la expresión de p73TΔ

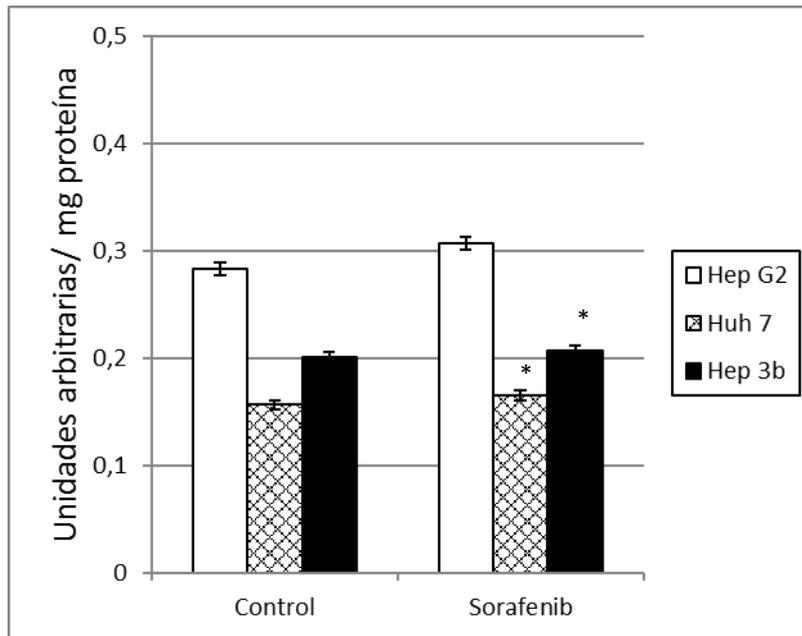


Figura 6F: Efecto de Sorafenib en la expresión de p63ΔN

Sobreexpresión de p53, p63 and p73

Los resultados descritos previamente demostraban una asociación entre el incremento de la expresión de p53 o p63/p73 y de los receptores de muerte celular por Sorafenib en las tres líneas celulares. Asimismo, la inducción de muerte celular por Sorafenib se asociaba con la disminución de la expresión de p63ΔN en las tres líneas celulares.

La capacidad de los plásmidos de sobreexpresión para incrementar la expresión de p53, p63TA, p63ΔN y p73TA fue verificada en las líneas celulares (Figura 7A).

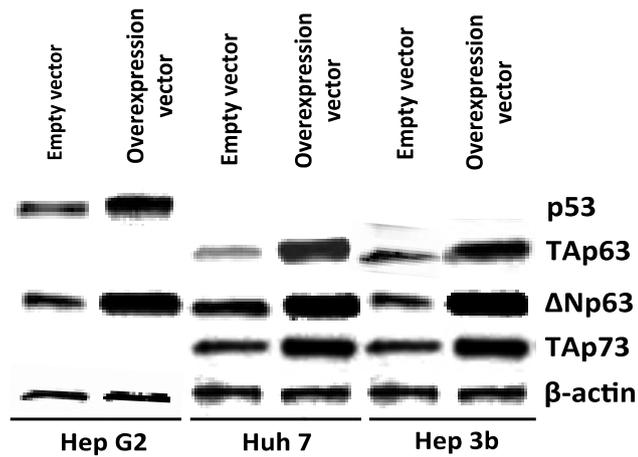


Figura 7A: Control de la expresión de las isoformas de p53 por los correspondientes plásmidos de sobreexpresión

La sobreexpresión de cada uno de los miembros de p53 estudiados no alteró la expresión del resto de isoformas de p53. La sobreexpresión de p53 incrementó la expresión de TNF-R1 (Figura 7B; $p \leq 0,5$), pero no de CD95 (Figura 7C) y TRAIL-R1 (Figura 7D), así como incrementó la actividad caspasa-8 (Figura 7E; $p \leq 0,001$) y el procesamiento de la pro-caspasa-8 (Figura 7F; $p \leq 0,5$) en las células Hep G2 tratadas con Sorafenib. La sobreexpresión de p63 Δ N no modificó la expresión de los tres receptores de muerte celular ni la activación de caspasa-8 como consecuencia del tratamiento con Sorafenib en las tres líneas celulares (Figura 7). De forma interesante, la sobreexpresión de p63TA incrementó los niveles de TNF-R1 (Figura 7B $p \leq 0,5$), CD95 (Figura 7C, $p \leq 0,01$), TRAIL-R1 (Figura 7D, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,5$; respectivamente), actividad caspasa-8 (Figura 7E, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$; respectivamente) y procesamiento de la pro-caspasa-8 (Figura 7F, $p \leq 0,5$, $p \leq 0,01$; respectivamente) en las células Huh 7 y Hep 3b tratadas con Sorafenib. La sobreexpresión de p73TA

incrementó la expresión de TNF-R1 (Figura 7B, $p \leq 0,5$, $p \leq 0,01$; respectivamente), CD95 (Figura 7C, $p \leq 0,5$, $p \leq 0,01$; respectivamente), TRAIL-R1 (Figura 7D, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,5$; respectivamente), actividad caspasa-8 (Figura 7E, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,5$; respectivamente) y procesamiento de pro-caspasa-8 (Figura 7F, $p \leq 0,5$, $p \leq 0,01$; respectivamente) en las células Huh 7 y Hep 3b tratadas con Sorafenib.

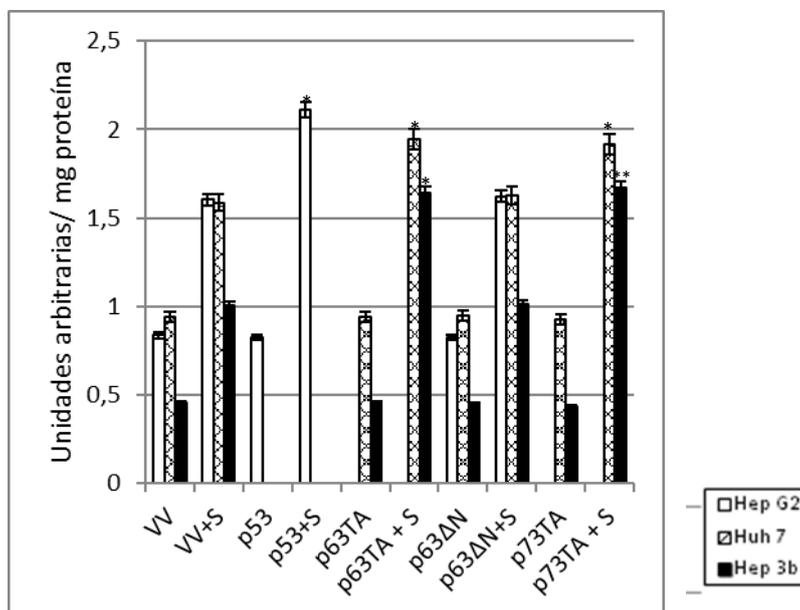


Figura 7B: Efecto de la sobreexpresión de p53, p63TA, p63ΔN y p73TA en la regulación de la expresión de TNF-R1 por Sorafenib (S)

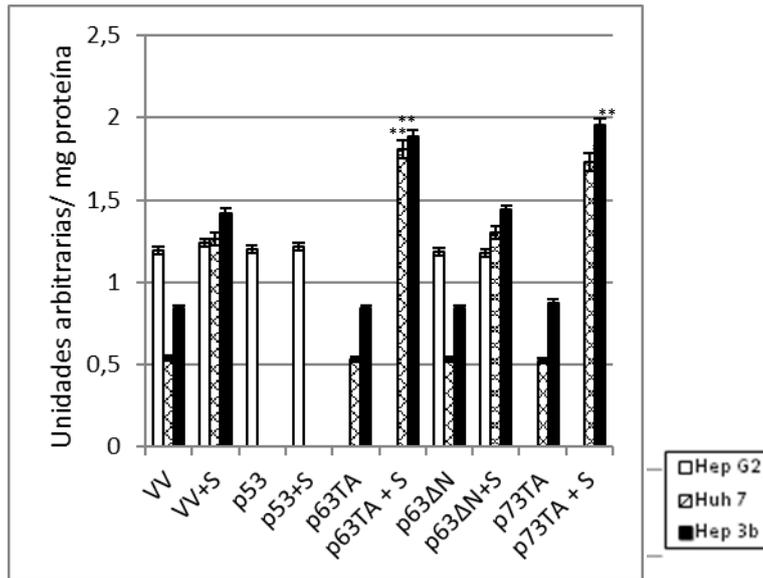


Figura 7C: Efecto de la sobreexpresión de p53, p63TA, p63ΔN y p73TA en la regulación de la expresión de CD95 por Sorafenib (S)

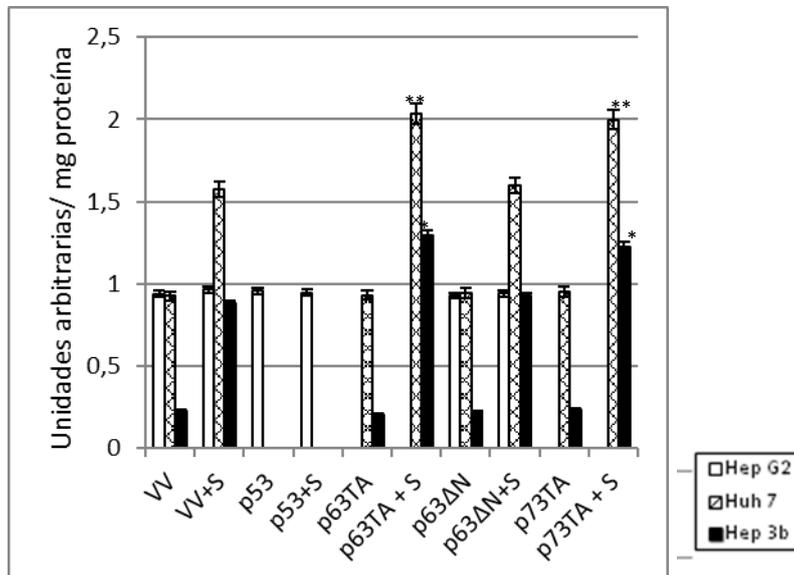


Figura 7D: Efecto de la sobreexpresión de p53, p63TA, p63ΔN y p73TA en la regulación de la expresión de TRAIL-R1 por Sorafenib (S)

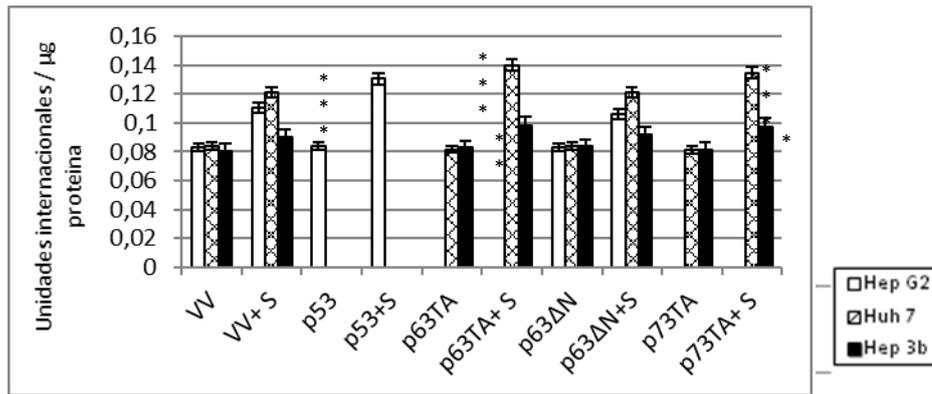


Figura 7E: Efecto de la sobreexpresión de p53, p63TA, p63ΔN y p73TA en la regulación de la actividad caspasa-8 por Sorafenib (S)

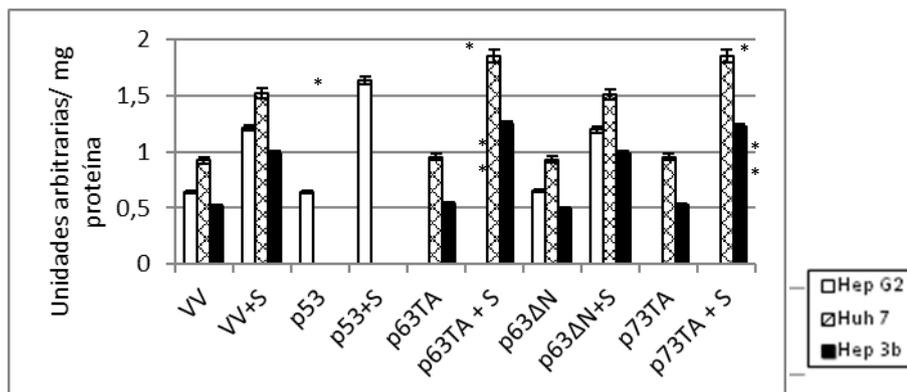


Figura 7F: Efecto de la sobreexpresión de p53, p63TA, p63ΔN y p73TA en la regulación del procesamiento de la caspasa-8 por Sorafenib (S)

Interferencia de p53, p63 and p73

La interferencia de los genes de p53 se realizó mediante dos aproximaciones con distinto grado de especificidad. La interferencia de todas las isoformas de p53, p63 y p73 se realizó mediante siRNA genéricos (siRNA

p53, siRNA p63 y siRNA p73). De forma diferente, la interferencia específica de las isoformas p63TA, p63 Δ N y p73TA se realizó mediante shRNA.

Los siRNA frente a p63 y p73 no fueron capaces de distinguir entre las correspondientes isoformas TA y Δ N (Figura 8A).

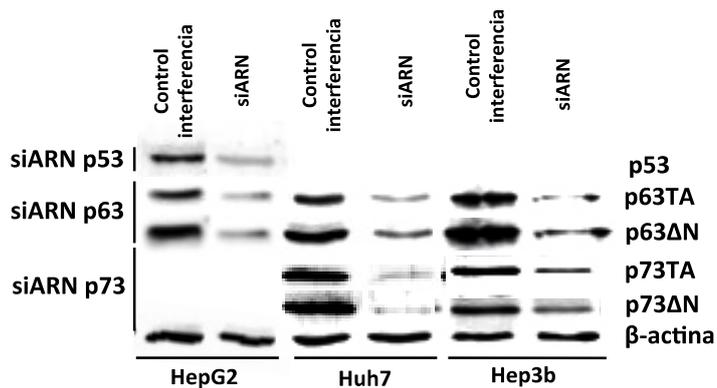


Figura 8A: Control de la expresión de las isoformas de p53 por los correspondientes siRNA

Se observó que la interferencia de p53 wild type (siRNA p53) reducía el incremento de la expresión de TNF-R1 (Figura 8B, $p \leq 0,5$), pero no de CD95 (Figura 8C) y TRAIL-R1 (Figura 8D), y la activación de caspasa-8 (Figura 8E, $p \leq 0,001$; Figura 8F, $p \leq 0,5$; respectivamente) inducida por Sorafenib en Hep G2. La interferencia de p63TA redujo la expresión de CD95 (Figura 8C; $p \leq 0,01$, $p \leq 0,5$), TNF-R1 (Figura 8C; $p \leq 0,5$), TRAIL-R1 (Figura 8D; $p \leq 0,5$) y activación de caspasa-8 (Figura 8E, 8F; $p \leq 0,001$) inducida por Sorafenib en Huh7 y Hep3b, respectivamente. De forma similar, la interferencia de p73TA redujo la expresión de CD95 (Figura 8C; $p \leq 0,5$, $p \leq 0,01$), TNF-R1 (Figura 8B; $p \leq 0,5$),

TRAIL-R1 (Figura 8D; $p \leq 0,5$) y activación de caspasa-8 (Figura 8E, 8F; $p \leq 0,001$) inducida por Sorafenib en Huh7 y Hep3b, respectivamente. Se observa que la reducción de la expresión de p53, TAp63 y TAp73 se reduce la inducción por Sorafenib en la expresión de los receptores de muerte y la apoptosis.

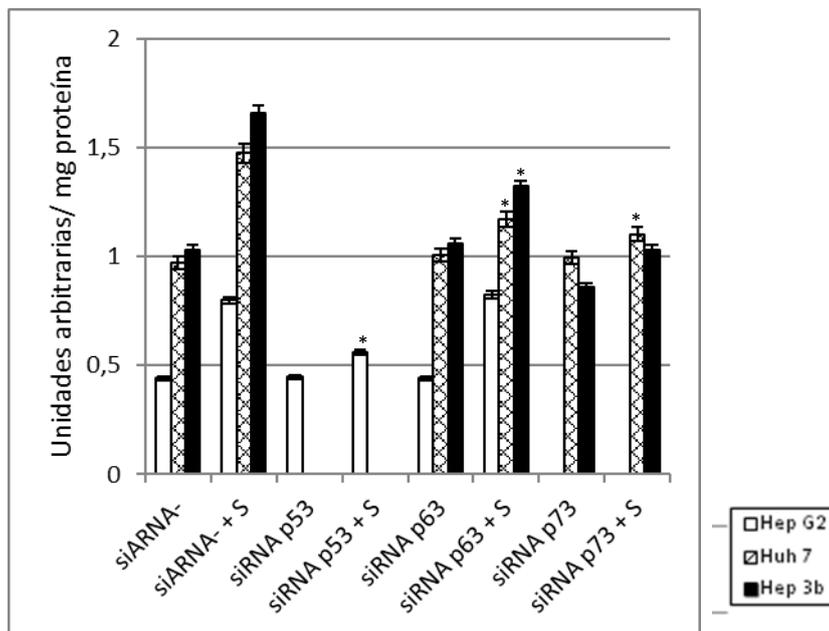


Figura 8B: Efecto de siRNA frente a p53, p63 y p73TA en la regulación de la expresión de TNF-R1 por Sorafenib (S)

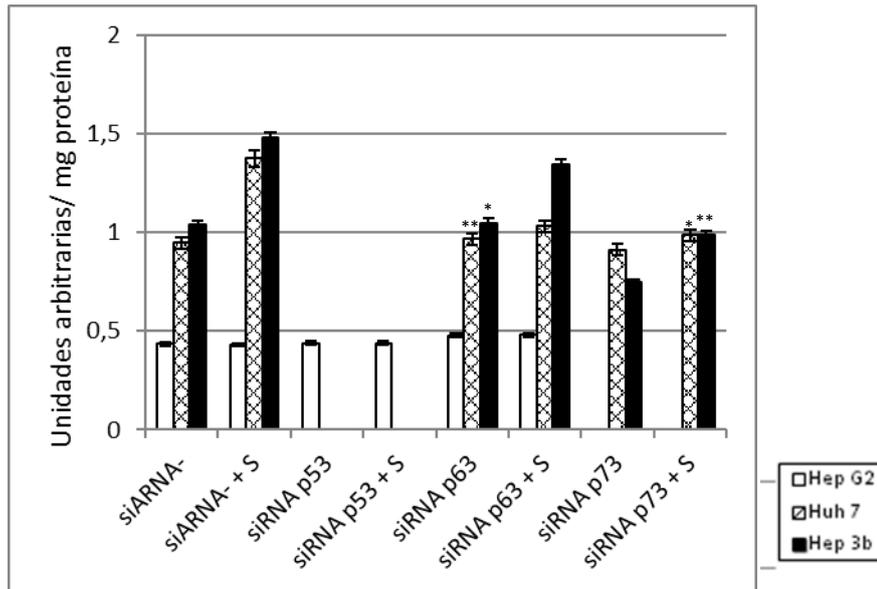


Figura 8C: Efecto de siRNA frente a p53, p63 y p73TA en la regulación de la expresión de CD95 por Sorafenib (S)

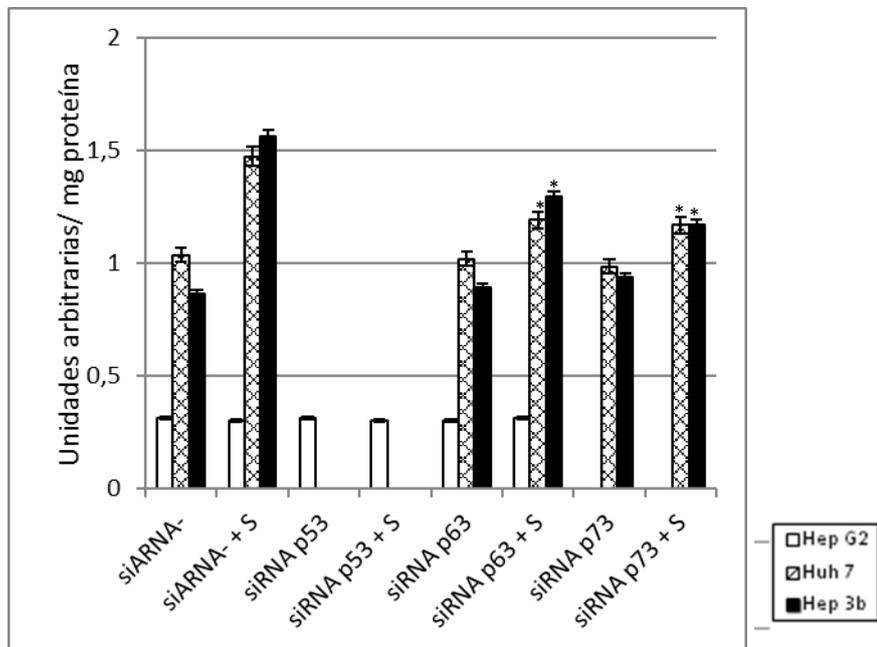


Figura 8D: Efecto de siRNA frente a p53, p63 y p73TA en la regulación de la expresión de TRAIL-R1 por Sorafenib (S)

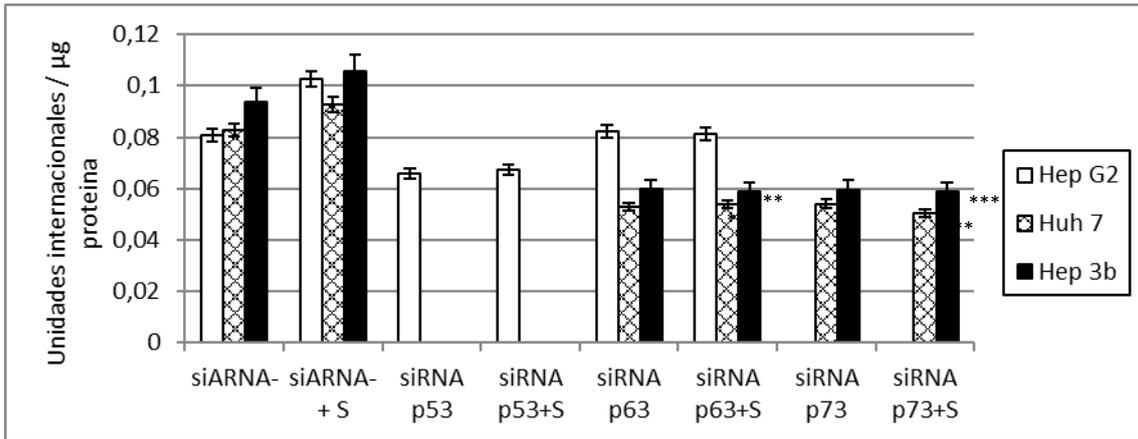


Figura 8E: Efecto de siRNA frente a p53, p63 y p73TA en la regulación de la actividad caspasa-8 por Sorafenib (S)

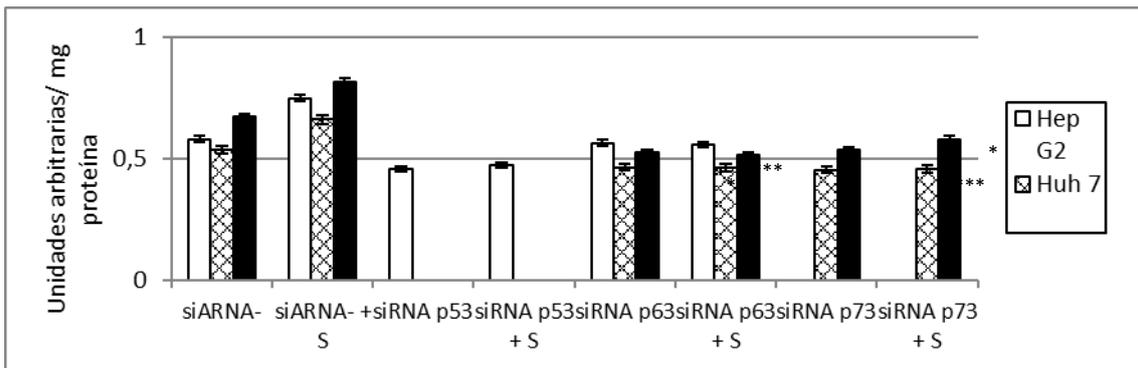


Figura 8F: Efecto de siRNA frente a p53, p63 y p73TA en la regulación del procesamiento de caspasa-8 por Sorafenib (S)

Los shRNA reducen específicamente la expresión de la isoforma para la que se encuentran diseñados al igual que los SiRNA (Figura 9A).

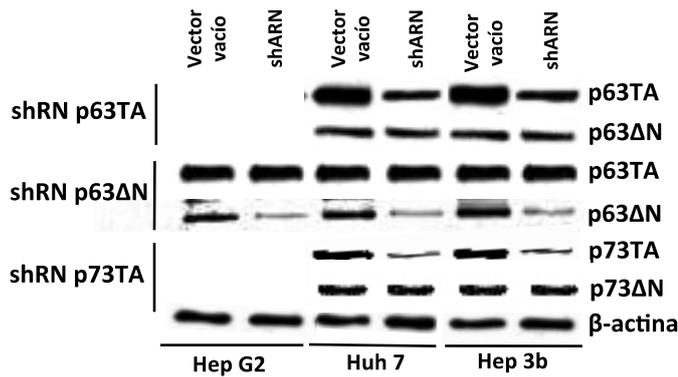


Figura 9A: Control de la expresión de las isoformas de p53 por los correspondientes shRNA

La administración de shRNA frente a p63ΔN no modifica la expresión de TNF-R1 (Figura 9B), CD95 (Figura 9C) y Trail-R1 (Figura 9D), ni la activación de caspasa-8 (Figura 9E, 9F) en ninguna de las tres líneas celulares estudiadas ya que, como hemos dicho, promueve un aumento de la proliferación celular. Sin embargo, el bloqueo específico de p63TA reduce el incremento de la expresión de los tres receptores de muerte celular (Figura 9B, 9C y 9D; $p \leq 0,5$), actividad caspasa-8 (Figura 9E; $p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$) y expresión del fragmento activo de caspasa-8 (Figura 9F; $p \leq 0,5$) en Huh 7 y Hep 3b, respectivamente. De forma similar, el bloqueo específico de p73TA reduce el incremento de la expresión de los tres receptores de muerte celular (Figura 9B, 9C y 9D; $p \leq 0,5$), actividad caspasa-8 (Figura 9E; $p \leq 0,001$, $p \leq 0,5$) y expresión del fragmento activo de caspasa-8 (Figura 9F; $p \leq 0,5$) en Huh 7 y Hep 3b, respectivamente.

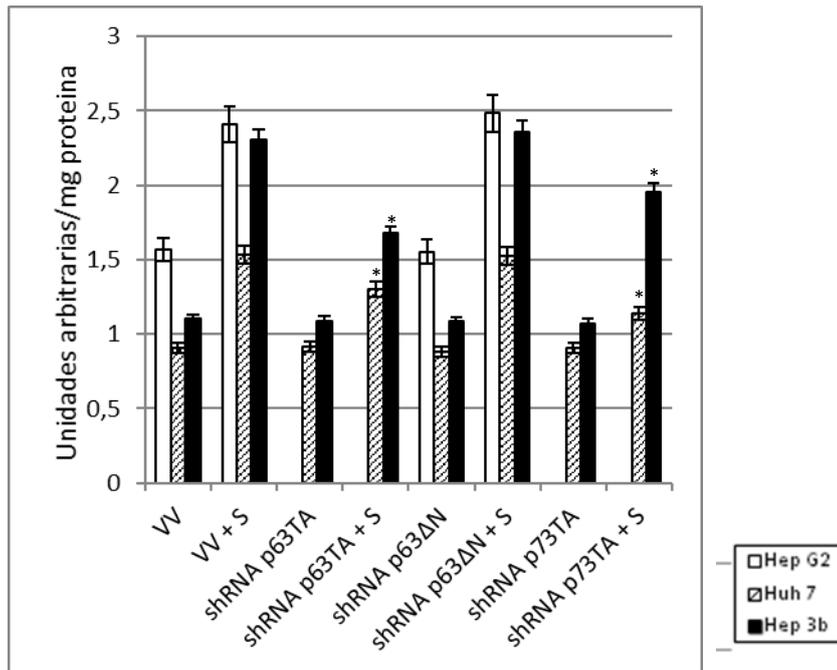


Figura 9B: Efecto de shRNA frente a p63TA, p63ΔN y p73TA en la regulación de la expresión de TNF-R1 por Sorafenib (S)

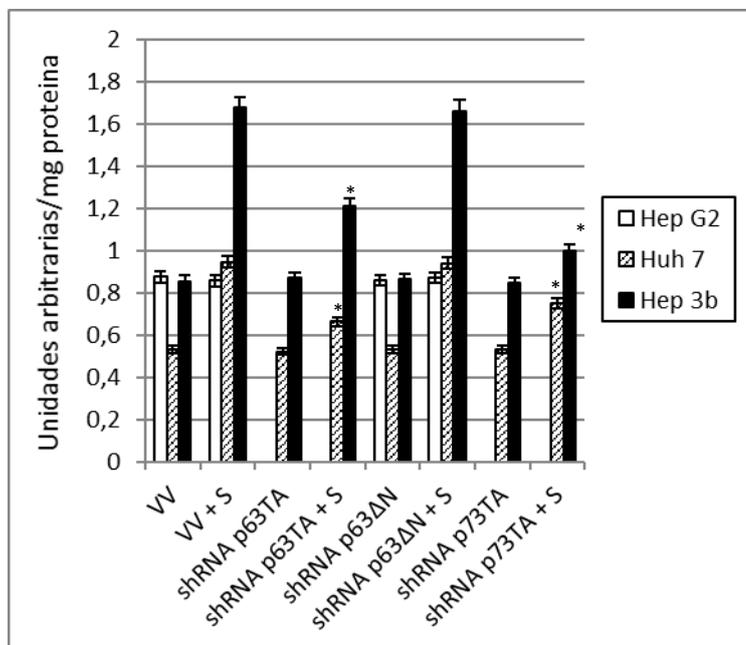


Figura 9C: Efecto de shRNA frente a p63TA, p63ΔN y p73TA en la regulación de la expresión de CD95 por Sorafenib (S)

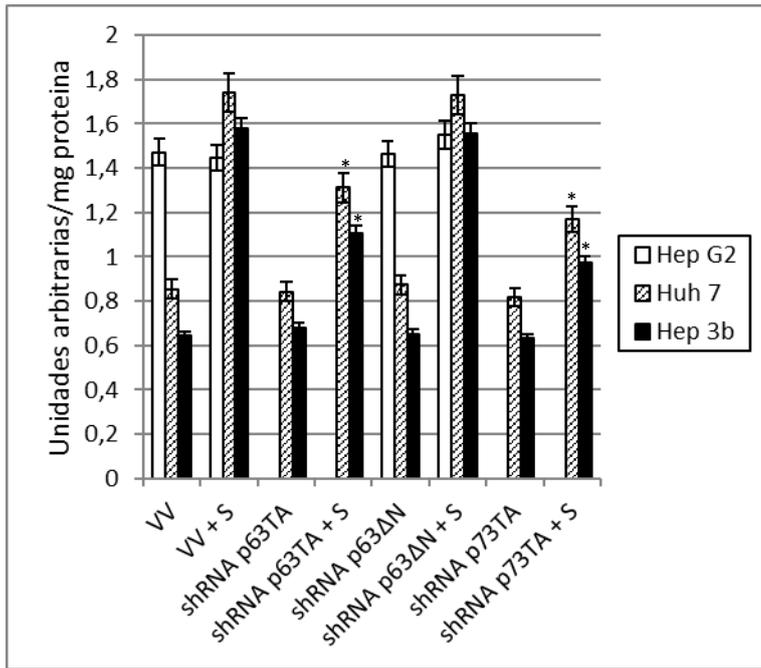


Figure 9D

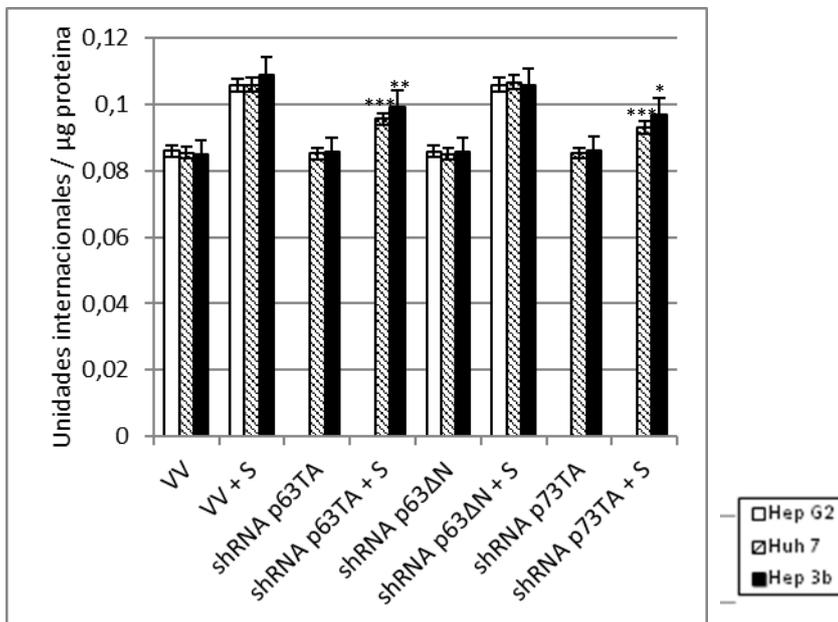


Figure 9E

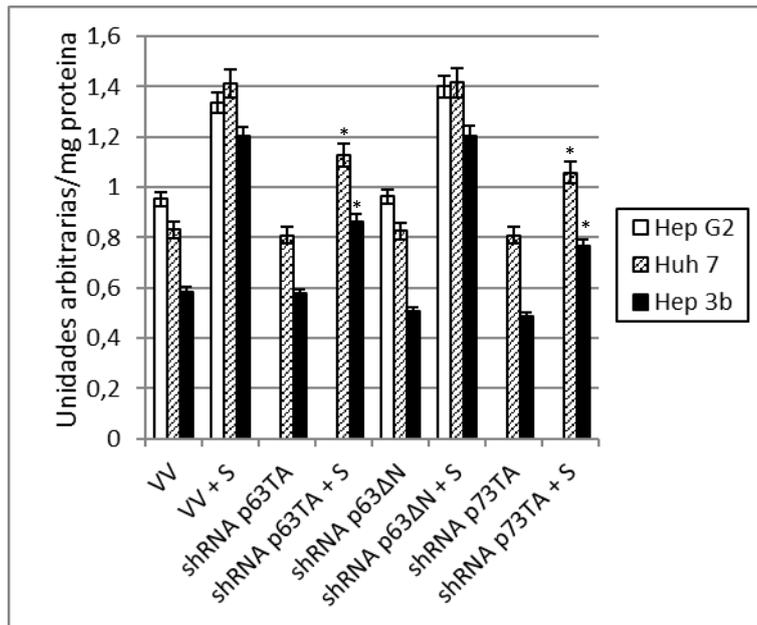


Figure 9F

Sorafenib disminuye el crecimiento tumoral en un modelo murino de xenoinjerto

El implante subcutáneo de las tres estirpes celulares desarrolló tumor en los animales de experimentación. El tratamiento con Sorafenib redujo el volumen tumoral ($p \leq 0,5$) a tiempo final en comparación con sus respectivos controles sin tratamiento (Figura 10A vs 10B, 10C). El crecimiento de las células de la línea Huh 7 fue superior al de Hep G2 y Hep 3b (Figura 10C y 10D). La reducción del volumen tumoral con el tratamiento con Sorafenib se relacionó con un incremento de la apoptosis (Figura 10F vs 10E, 10G; $p \leq 0,001$) y una menor expresión de Ki67 (Figura 10I vs 10H, 10J; $p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$; respectivamente) en los tres grupos con implante tumoral en comparación con sus respectivos controles. De forma interesante, la administración de Sorafenib redujo la fibrogénesis (Figura 10L vs 10K, 10M;

$p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$; respectivamente) y la angiogénesis (Figura 10O vs 10N, 10P, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,5$, $p \leq 0,5$; respectivamente) en los tres grupos con implante tumoral en comparación con sus respectivos controles.



Figura 10A: Imagen de un animal con implante subcutáneo de células tumorales sin tratamiento con Sorafenib



Figura 10B: Imagen de un animal con implante subcutáneo de células tumorales con tratamiento con Sorafenib

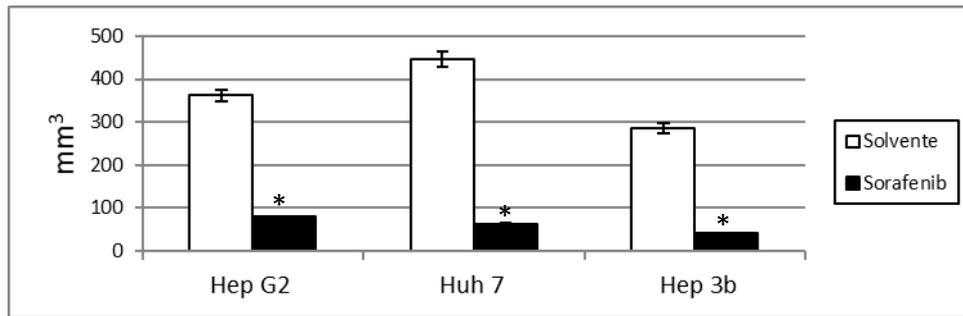


Figura 10C: Efecto de Sorafenib en el volumen tumoral

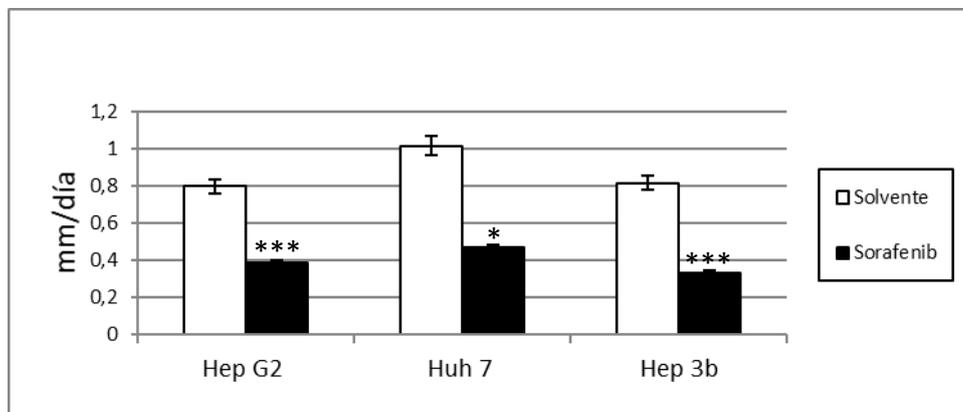


Figura 10D: Efecto de Sorafenib en el incremento diario de tamaño tumoral

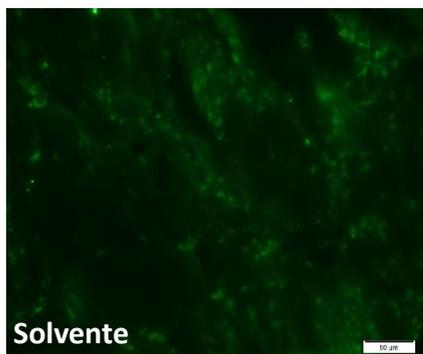


Figura 10E: Expresión de TUNEL en una sección tumoral de un animal control

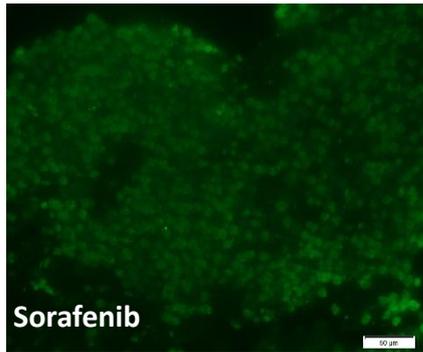


Figura 10F: Expresión de TUNEL en una sección tumoral de un animal tratado con Sorafenib

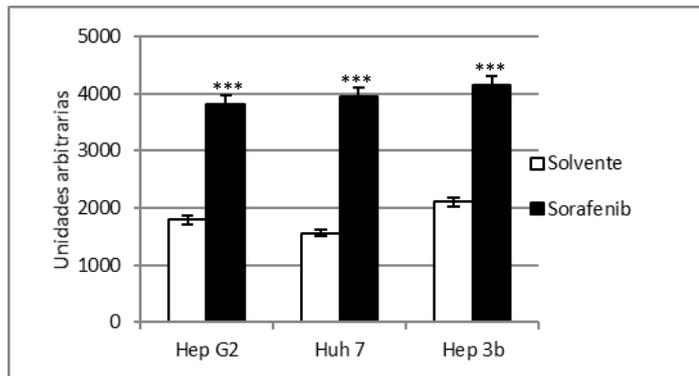


Figura 10G: Efecto de Sorafenib en la expresión de TUNEL en las secciones de tumores derivadas de las distintas estirpes celulares

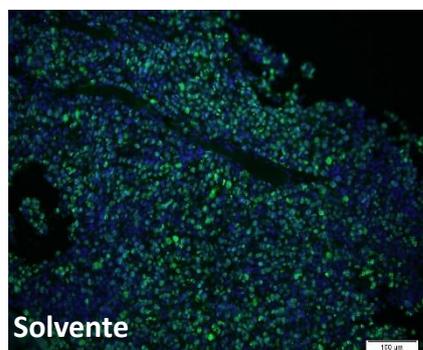


Figura 10H: Expresión de Ki67 en una sección tumoral de un animal control

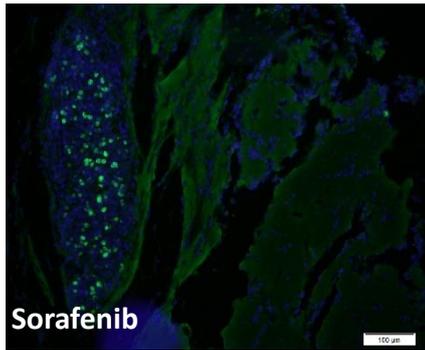


Figura 10I: Expresión de Ki67 en una sección tumoral de un animal tratado con Sorafenib

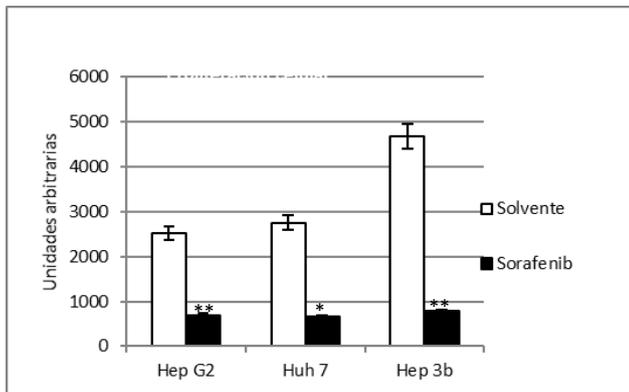


Figura 10J: Efecto de Sorafenib en la expresión de Ki67 en las secciones de tumores derivadas de las distintas estirpes celulares

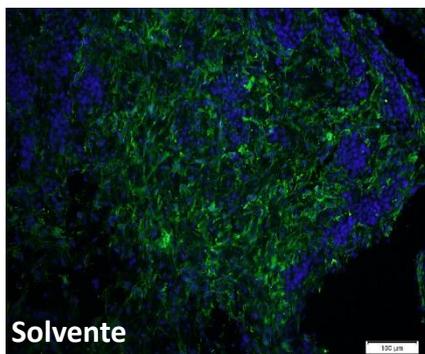


Figura 10K: Expresión de α -SMA en una sección tumoral de un animal control

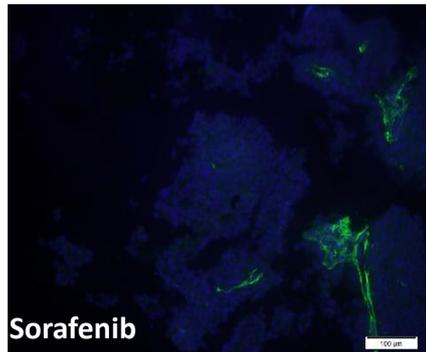


Figura 10L: Expresión de α -SMA en una sección tumoral de un animal tratado con Sorafenib

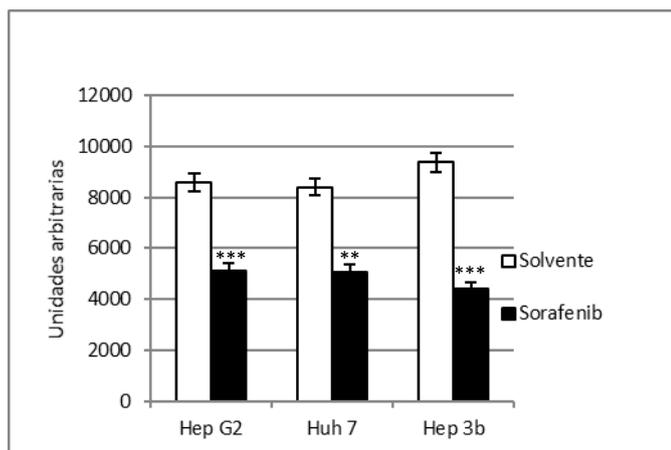


Figura 10M: Efecto de Sorafenib en la expresión de α -SMA en las secciones de tumores derivadas de las distintas estirpes celulares

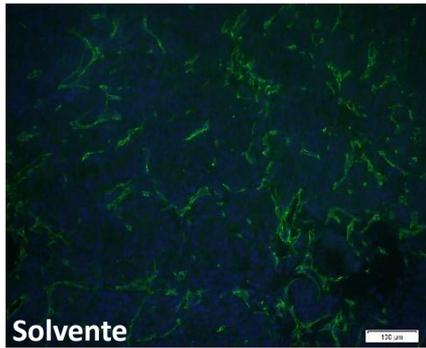


Figura 10N: Expresión de CD31 en una sección tumoral de un animal control

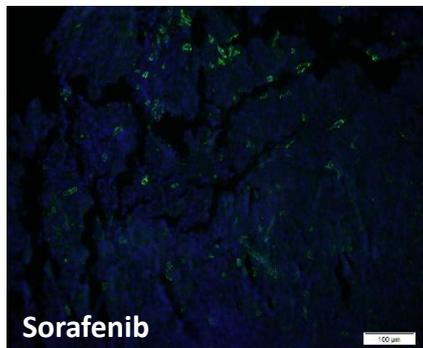


Figura 10O: Expresión de CD31 en una sección tumoral de un animal tratado con Sorafenib

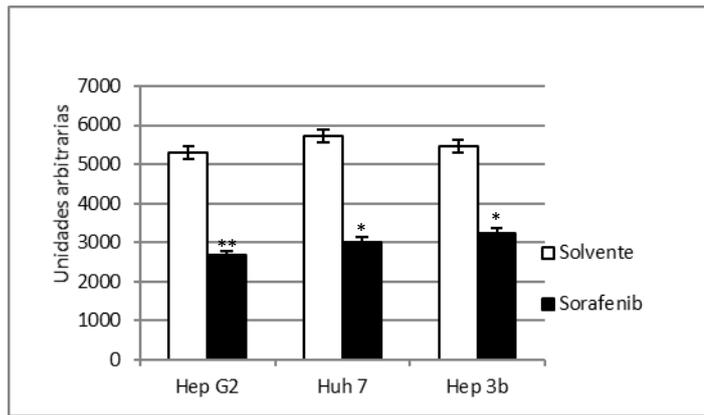


Figura 10P: Efecto de Sorafenib en la expresión de CD31 en las secciones de tumores derivadas de las distintas estirpes celulares

La inducción de la apoptosis en los tumores como consecuencia del tratamiento con Sorafenib (Figura 10) se relacionó con alteración de la expresión de los genes de p53 y de la señal de muerte celular según el tipo celular. En este sentido, Sorafenib incrementó la expresión de p53 (Figura 11A, $p \leq 0,01$), TNF-R1 (Figura 11G, $p \leq 0,001$) y activación de caspasa-8 (Figura 11J, 11K, $p \leq 0,001$) en células Hep G2. Sorafenib incrementó p63TA (Figura 11C, $p \leq 0,5$, $p \leq 0,01$), p73TA (Figura 11E, $p \leq 0,5$, $p \leq 0,01$), CD95 (Figura 11G, $p \leq 0,5$, $p \leq 0,01$), TNF-R1 (Figura 11H, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,5$), TRAIL-R1 (Figura 11I, $p \leq 0,01$), y activación caspasa-8 (Figura 11J, 11K; $p \leq 0,001$) en células Huh 7 y Hep 3b, respectivamente. La administración de Sorafenib indujo una disminución de la expresión de la isoforma p63 Δ N (Figura 11D, $p \leq 0,01$), aunque no de p73 Δ N (Figura 11F), en los tumores procedentes del implante de Huh 7 y Hep 3b.

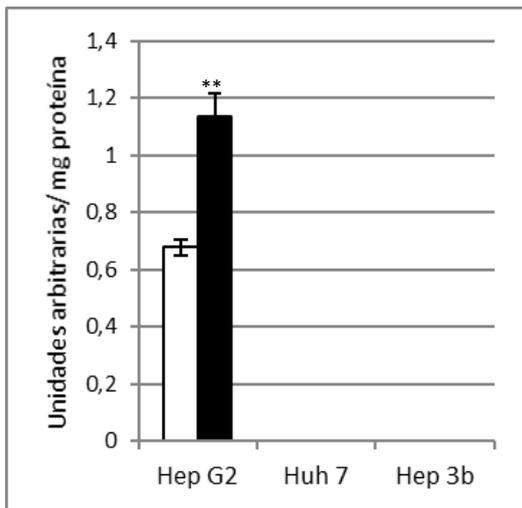


Figura 11A: Efecto de Sorafenib en la expresión de p53 en los tumores

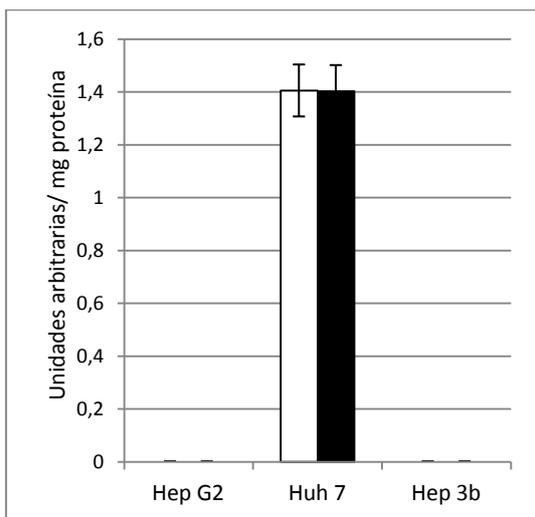


Figura 11B: Efecto de Sorafenib en la expresión de p53BP2 en los tumores

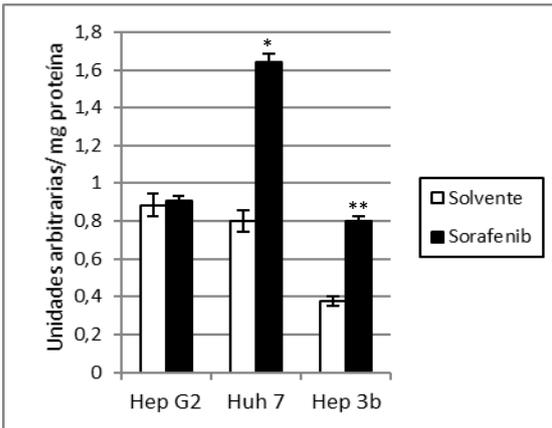


Figura 11C: Efecto de Sorafenib en la expresión de p63TA en los tumores

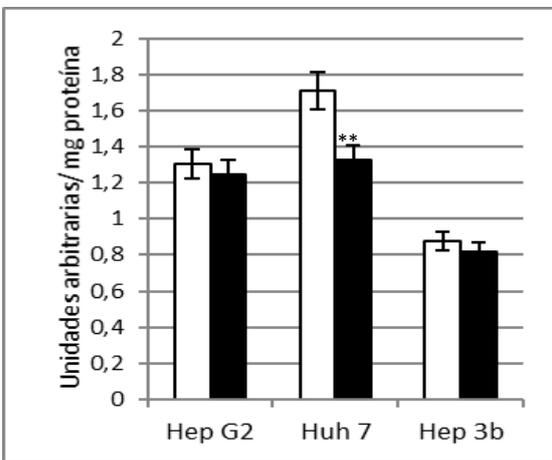


Figura 11D: Efecto de Sorafenib en la expresión de p63ΔN en los tumores

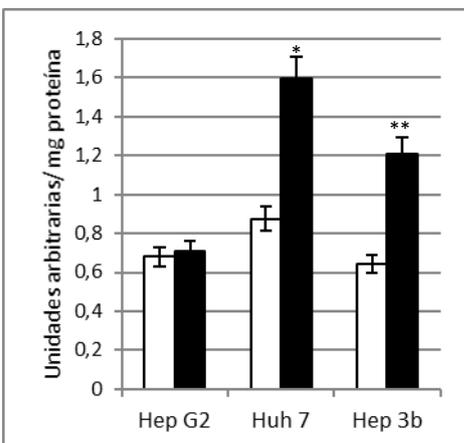


Figura 11E: Efecto de Sorafenib en la expresión de p73TA en los tumores

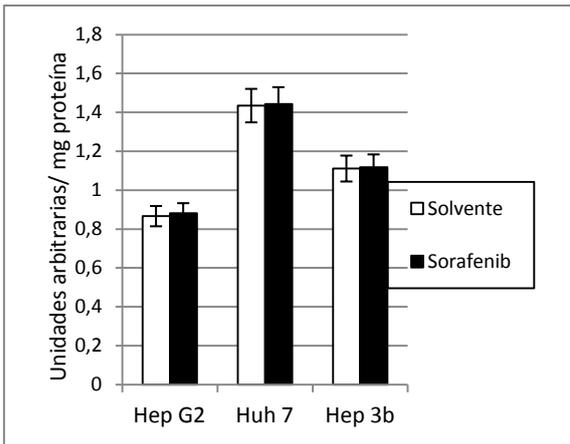


Figura 11F: Efecto de Sorafenib en la expresión de p73ΔN en los tumores

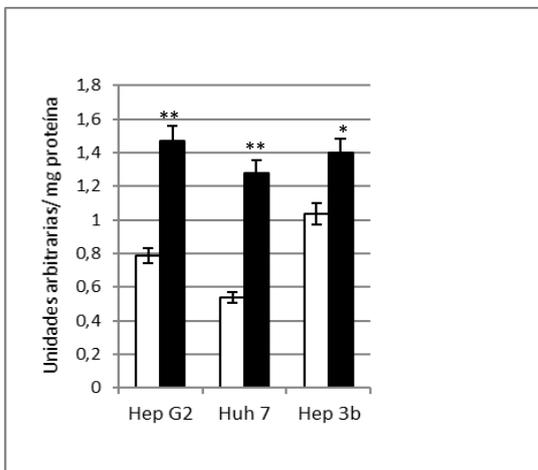


Figura 11G: Efecto de Sorafenib en la expresión de TNF-R1 en los tumores

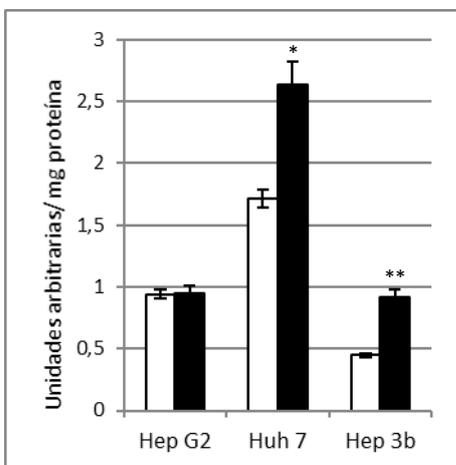


Figura 11H: Efecto de Sorafenib en la expresión de CD95 en los tumores

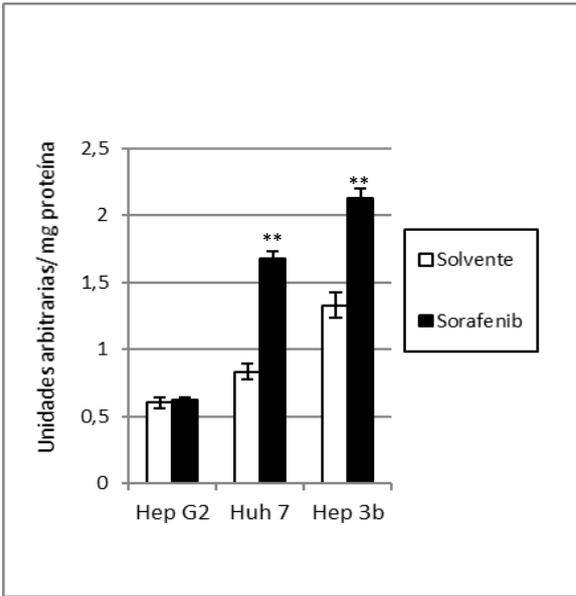


Figura 11I: Efecto de Sorafenib en la expresión de TRAIL-R1 en los tumores

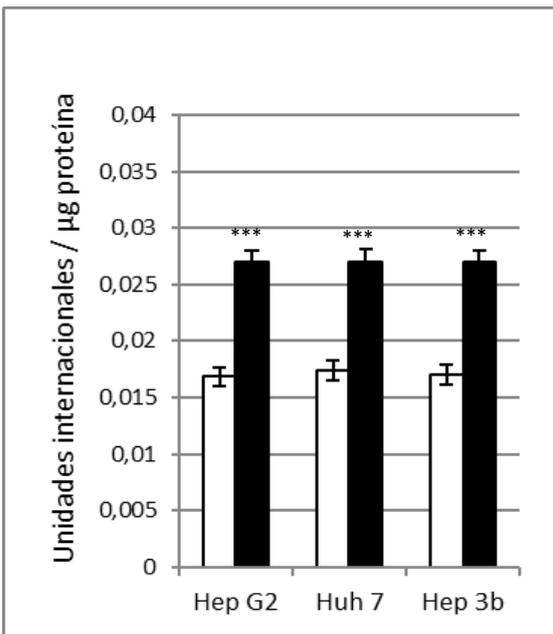


Figura 11J: Efecto de Sorafenib en la actividad caspasa-8 en los tumores

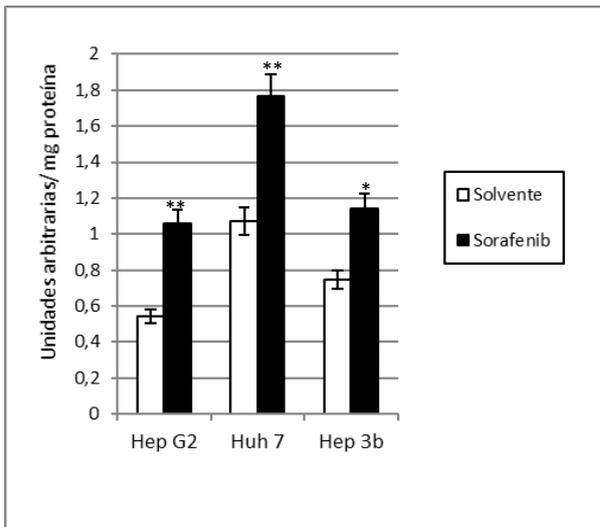


Figura 11K: Efecto de Sorafenib en el procesamiento de caspasa-8 en los tumores.

Discusión

El CHC representa más del 90% de los tumores primarios en el hígado, siendo la sexta neoplasia más frecuente (2), y la tercera causa de fallecimiento por cáncer. El CHC se desarrolla mayoritariamente en un contexto de enfermedad hepática crónica lo que condiciona las opciones terapéuticas. Los primeros estadios de la enfermedad tienen una elevada tasa de supervivencia gracias a las herramientas quirúrgicas curativas como son la resección hepática y el TH. Sin embargo, la presencia de factores de mal pronóstico como el tamaño del tumor (≥ 3 cm) (6), invasión vascular, presencia de metástasis extra-hepáticas (N1 y M1) y deterioro de la sintomatología, hacen que la tasa de recurrencia tumoral, progresión tumoral y mortalidad sean elevadas. El tratamiento recomendado para pacientes en estado avanzado de la enfermedad es Sorafenib, inhibidor de serina/treonina quinasas y de los receptores tirosina quinasa, que ha demostrado un incremento moderado pero significativo de la supervivencia en los ensayos clínicos SHARP (10,7 vs 7,9 meses) y Asia-Pacífico (6,5 vs 4,2 meses). El tratamiento con Sorafenib está asociado a una serie de complicaciones relacionadas con el síndrome de manos/pies, eventos dermatológicos dispersos, diarrea, hipertensión, hemorragia, pérdida de peso e infecciones, etc que se atenúan con la disminución al 50% de la dosis del fármaco. Para obtener una mayor efectividad del tratamiento es necesaria una adecuada caracterización molecular del paciente con CHC antes del tratamiento. En este sentido, a pesar de los importantes avances en el estudio de los mecanismos de acción de Sorafenib, poco se conoce acerca del mecanismo molecular de este fármaco. La reducción de la expresión de los receptores de muerte celular y su relación con la alteración de la señal dependiente de p53 se ha relacionado con el CHC.

El presente estudio investiga la relevancia de los procesos de muerte celular y señalización dependiente de los genes de la familia de p53 en la actividad antitumoral de Sorafenib en células de CHC.

La apoptosis es un proceso regulado mediante el cual se eliminan las células que sufren una alteración molecular que compromete su viabilidad o control. La señal de muerte celular extrínseca mediada por receptores, así como p53 son genes relacionados con la inducción y/o progresión del cáncer. Por lo tanto, la alteración de la correcta activación de los procesos apoptóticos es un evento clave en la oncogénesis. La regulación de la señal de muerte celular por diversos genes de la familia de p53 se ha asociado con el CHC. En este sentido, la pérdida de la expresión de CD95 se relaciona de forma mayoritaria con la mutación de p53 en el CHC. p53 y otros genes de la familia, como p63 y p73, regulan la expresión de los receptores de muerte celular y la actividad antitumoral de diversos quimioterápicos comunes en líneas establecidas de hepatoma. Este efecto parece deberse a un efecto sinérgico, así como aditivo ya que los agentes quimioterápicos producen daños a nivel del ADN y por tanto aumentan la síntesis de p53 como sensor de lesión de ADN coincidiendo esto con el efecto del Sorafenib.

En el presente estudio se observa que la mortalidad de los pacientes debida a la recurrencia tumoral se asocia con un incremento de las formas p63 Δ N y p73 Δ N y reducción de la expresión de los receptores de muerte celular (CD95, TNF-R1 y TRAIL-R1). De hecho, las isoformas Δ N actúan como represores transcripcionales de la acción de las isoformas p63TA y p73TA. La expresión de la isoformas p73 Δ N en el tejido tumoral se ha relacionado con el mal pronóstico de los pacientes con HCC. Otro estudio, observa que p73 Δ N

está sobreexpresado en una importante proporción de pacientes con HCC (37%), que además presentan un tiempo de supervivencia mucho más corto que aquellos pacientes cuyos tumores no sobreexpresan p73 Δ N. La forma nativa de p53 y las isoformas con la secuencia de transactivación TA, p63TA y p73TA, regulan positivamente la expresión de los receptores de muerte celular.

Sorafenib sensibiliza a las células tumorales frente a los factores pro-apoptóticos fisiológicos en células de hepatoma. Así como, es capaz de inducir la activación de TRAIL en células deficientes en bax mediante un mecanismo que implica la disminución de la expresión de Mcl-1 y cIAP2 (proteínas antiapoptóticas). Los datos obtenidos en el presente estudio apoyan el papel pro-apoptótico de Sorafenib (102) basado en el incremento de la expresión de los receptores de muerte celular a través de la actividad transcripcional dependiendo de los genes de la familia de p53 en función del patrón genético de cada línea celular. En este sentido, en las células Hep G2 con p53 funcional el incremento de la expresión de TNF-R1, pero no de CD95 y TRAIL-R1, y la apoptosis por Sorafenib es a través de p53 nativo, sin alterar las isoformas p63TA y p73TA. Por otro lado, las líneas de hepatoma que presentan alterada la vía de p53, bien por mutación puntual de la secuencia (Huh 7) o por mutación sin sentido que elimina la expresión (Hep3b), permiten el incremento de la expresión de los receptores de muerte celular y apoptosis por Sorafenib de las isoformas p63TA y p73TA (213). Se está actualmente investigando los mecanismos mediante los cuales la señal de CD95 no es funcional en la línea Huh 7 a pesar del incremento de su expresión durante el tratamiento con Sorafenib.

El incremento de la expresión de los tres receptores de muerte celular, CD95, TNF-R1 y TRAIL-R1, por las isoformas TA de p63 y p73 (Huh 7 y Hep 3b), en lugar del efecto de p53 sobre el receptor de TNF-R1 (HepG2) durante el tratamiento con Sorafenib sugiere un patrón de transactivación transcripcional específico entre las isoformas de los genes de p53. Resulta remarcable que el tratamiento con Sorafenib reduce la expresión de p63 Δ N en todas las líneas celulares. Sin embargo, y a pesar de que se encuentra asociado con la reducción de la expresión de los receptores de muerte celular tanto en los tumores procedentes de los pacientes con HCC fallecidos por recurrencia tumoral como en las tres líneas celulares, los estudios de sobreexpresión e interferencia de esta isoforma no demuestran una relación con la señal de muerte celular. El grupo está actualmente investigando su papel en la mediación del efecto antiproliferativo de Sorafenib.

Nuestro estudio también demuestra que la administración de Sorafenib por vía oral siguiendo una pauta y dosificación similar a la seguida en la práctica clínica habitual es capaz de inducir la expresión de los genes de la familia de p53, receptores de muerte celular y apoptosis con un patrón similar a los observados en los estudios *in vitro* dependiendo de la estirpe celular de CHC implantada. La inducción de apoptosis medida por TUNEL (medición de apoptosis en tejido tumoral) en los tumores se relaciona con una clara regresión del tamaño y volumen tumoral. De forma interesante, el efecto proapoptótico observado con el tratamiento con Sorafenib se asocia con una relevante actividad anti-proliferativa (Ki67), anti-angiogénica (CD31) y anti-fibrótica (α -SMA) (228) que se encuentra probablemente relacionada con su actividad inhibidora sobre la señal dependiente de VEGFR, PDGFR, FGFR, c-

Kit y Raf. Estos datos concuerdan con los desarrollados por otros autores que observaron una disminución del crecimiento tumoral y angiogénesis por Sorafenib en el implante subcutáneo de células de hepatoma PLC/PRF/5 en ratones inmunodeprimidos.

Conclusiones

- 1- Sorafenib induce el aumento de la transcripción/expresión de los receptores de muerte celular en células tumorales hepáticas.

- 2- La familia de la familia de p53 (p53, p63 y p73) media en el efecto inductor de la transcripción de los receptores de muerte celular por Sorafenib. A pesar del efecto pro-apoptótico de los genes de la familia de p53, existen relevantes diferencias en relación a su actividad transcripcional sobre TNF-R1, CD95 y Trail-R1 en las células tumorales hepáticas.

- 3- La administración oral de Sorafenib incrementa la apoptosis, y reduce la proliferación celular, angiogénesis, fibrogénesis y crecimiento tumoral de las células de hepatoma implantadas subcutáneamente en un modelo de xenoimplante en ratones inmunodeprimidos. En este sentido, la identificación del patrón de expresión de las isoformas de p53 en los pacientes puede ser relevante en la predicción de respuesta al tratamiento con Sorafenib en términos de inducción de muerte hepatocelular, así como para la búsqueda de sinergias y otros factores reguladores que potenciarían el efecto antitumoral del fármaco.

Referencias bibliográficas

1. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 201. May 19, 2016.
2. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME: Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol* 27 (9): 1485-91, 2009.
3. Forner A, Llovet JM, Bruix J: Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379 (9822): 1245-55, 2012.
4. Tapias M, Idrovo V. Natural history of HCC. *Rev gastroenterol* vol. 28. Supl 1. Sept 2013.
5. Bosch FX, Ribes J, Borràs J: Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 19 (3): 271-85, 1999.
6. Hessheimer AJ, Forner A, Varela M, et al.: Metabolic risk factors are a major comorbidity in patients with cirrhosis independent of the presence of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22 (10): 1239-44, 2010.
7. Farinati F, Floreani A, De Maria N, et al.: Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 21 (3): 315-6, 1994
8. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, et al.: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2 (8256): 1129-33, 1981.
9. Beasley RP: Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61 (10): 1942-56, 1988.
10. Fattovich G, Giustina G, Degos F. et al: Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*. 1997 Feb;112(2):463-72.
11. Sun CA, Wu DM, Lin CC, et al.: Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan. *Am J Epidemiol* 157 (8): 674-82, 2003.
12. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, et al.: Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology* 136 (1): 138-48, 2009.
13. Jaskiewicz K, Banach L, Lancaster E: Hepatic siderosis, fibrosis and cirrhosis: the association with hepatocellular carcinoma in high-risk population. *Anticancer Res* 17 (5B): 3897-9, 1997 Sep-Oct.
14. Sun Z, Lu P, Gail MH, et al.: Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with chronic hepatitis who have

- detectable urinary aflatoxin metabolite M1. *Hepatology* 30 (2): 379-83, 1999.
15. Furuya K, Nakamura M, Yamamoto Y, et al.: Macroregenerative nodule of the liver. A clinicopathologic study of 345 autopsy cases of chronic liver disease. *Cancer* 61 (1): 99-105, 1988.
 16. Caraballo Cortes K et al – Oncogenesis of hepatocellular carcinoma . *E&C Hepatology*, 2010; 6(3-4): 7-10.
 17. Forner A, Llovet JM, Bruix J: Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012, 379:1245-1255.
 18. Yang SF, Wang SN, Wu CF, Yeh YT, Chai CY, Chunag SC, Sheen MC, Lee KT: Altered p-STAT3 (tyr705) expression is associated with histological grading and intratumour microvessel density in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 2007, 60:642-648.
 19. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D et al.; EUROCARE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014 Jan;15(1):23-34.
 20. Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, Rota M, Bertuccio P, Malvezzi M et al. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Ann Oncol.* 2016 Jan 22.
 21. Steliarova-Foucher E, O'Callaghan M, Ferlay J, Masuyer E, Forman D, Comber H et al. European Cancer Observatory: Cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Survival in Europe. Version 1.0 (September 2012) European Network of Cancer Registries, International Agency for Research on Cancer.
 22. Encuesta de Morbilidad Hospitalaria, año 2014. Instituto Nacional de Estadística.
 23. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. ARCI: OMS.
 24. Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis* 2005;25:133-142.
 25. Sheu JC, Sung JL, Chen DS, et al: Growth rate of asymptomatic hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *Gastroenterology* 1985;89:259-266.
 26. Okuda K. Tabor E.: "Liver Cancer". New York: Churchill Livingstone; 1997: 1-5.
 27. Gómez Senent s et al. Guía para el diagnóstico, estadificación y tratamiento del hepatocarcinoma. *Med Clin (Barc).* 2007;128(19):741-8.

28. Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2016 Apr;150(4):835-53.
29. Khalili K, Kim TK, Jang HJ, et al.: Optimization of imaging diagnosis of 1-2 cm hepatocellular carcinoma: an analysis of diagnostic performance and resource utilization. *J Hepatol* 54 (4): 723-8, 2011.
30. 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* 59 (5): 638-44, 2010.
31. Iñárrategui M, Sangro B. Diagnóstico del hepatocarcinoma de pequeña tamaño. *Gastroenterol Hepatol*. 2007;30(8):498-505.
32. Barbara L, Benzi G, Gaiani S, et al.: Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology* 16 (1): 132-7, 1992.
33. Llovet JM, Brú C, Bruix J: Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 19 (3): 329-38, 1999.
34. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 28 (3): 751-5, 1998.
35. Sonnenday CJ, Dimick JB, Schulick RD, et al.: Racial and geographic disparities in the utilization of surgical therapy for hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Surg* 11 (12): 1636-46; discussion 1646, 2007.
36. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, 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.
37. Okuda K, Ohtsuki T, Oyata H. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer*. 1985;56:918-28.
38. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients. *Hepatology*. 1998;28:751-5.
39. Leung TW, Tang AM, Zee B, Lau WY, Lai PB, Leung KL, et al. Construction of Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients. *Cancer*. 2002;15:1760-9.

40. Nanashima et al. Modified Japan Integrated Staging is currently the best available staging system for hepatocellular carcinoma patients who have undergone hepatectomy. *Journal of Gastroenterology*. March 2006, Volume 41, Issue 3, pp 250-256.
41. Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, et al. A new prognostic classification for predicting survival in patient with hepatocellular carcinoma. *Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire. J Hepatol.*1999;31:133–41.
42. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular hepatocarcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999;19:329-38.
43. Bruix J, Sherman M. Management of Hepatocellular Carcinoma: An Update. *Hepatol.* 53, 3, 2011.
44. Bruix et al. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2016;150(4): 835-853
45. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999;19 329-38.
46. Khalili K, Kim TK, Jang HJ, et al.: Implementation of AASLD hepatocellular carcinoma practice guidelines in North America: two years of experience. [Abstract] *Hepatology* 48 (Suppl 1): A-128, 362A, 2008.
47. Shah SA, Smith JK, Li Y, et al.: Underutilization of therapy for hepatocellular carcinoma in the medicare population. *Cancer* 117 (5): 1019-26, 2011.
48. Forner A, Reig M, Varela M, Burrel M, Feliu J, Briceño J, Sastre J, Martí-Bonmati L, Llovet JM, Bilbao JI, Sangro B, Pardo F, Ayuso C, Bru C, Tabernero J, Bruix J. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update consensus document from the AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI and SETH]. *Med Clin (Barc).* 2016 Jun 3;146(11):511.
49. Dhir M, Lyden ER, Smith LM, et al.: Comparison of outcomes of transplantation and resection in patients with early hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *HPB (Oxford)* 14 (9): 635-45, 2012.
50. 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 (3): 599-609.
51. Llovet JM, Bruix J: Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 37 (2): 429-42, 2003.

52. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, et al.: Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 56 (4): 918-28, 1985
53. Bruix J, Sherman M; American Association for the Study of Liver Diseases: Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53 (3): 1020-2, 2011.
54. Bruix et al. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2016;150(4): 835-853.
55. Hwang S, Moon DB, Lee SG. Liver transplantation and conventional surgery for advanced hepatocellular carcinoma. *Transpl Int.* 2010 Jul;23(7):723-7
56. V. Felipe, M. Varela, A. Forner y J. Bruix. Trasplante hepático en el carcinoma hepatocelular. Validez de los criterios de Milán Oncología Hepática. Unidad de Hepatología. Hospital Clínic. *Gastroenterol Hepatol.* 2007; 30(Supl 1):78-81.
57. Ebara M, Ohto M, Shinagawa T, et al.: Natural history of minute hepatocellular carcinoma smaller than three centimeters complicating cirrhosis. A study in 22 patients. *Gastroenterology* 90 (2): 289-98, 1986.
58. López PM, Villanueva A, Llovet JM. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma – an updated analysis of randomized controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23, 1535–1547 2006.
59. Verslype C, Van Cutsem E, Dicato M, Arber N, Berlin JD, Cunningham D, De Gramont A, Diaz-Rubio E, Ducreux M, Gruenberger T, et al.: The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th world congress on gastrointestinal cancer, Barcelona, 2008. *Ann Oncol* 2009, 20(Suppl 7):vii1-vii6.
60. Estado actual del hepatocarcinoma y perspectivas futuras Bilbao Aguirre, J.L. Lázaro Fernández, L. Castells Fuste y R. Charco Torras. julio-agosto 2010.
61. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A. Liver transplantation for treatment of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996;334:693-9.
62. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology.* 2001;33:1394-403.
63. Herrero JI, Sangro B, Pardo F, Quiroga J, Iñarrairaegui M, Rotellar F, et al. Liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma across Milan criteria. *Liver Transpl.* 2008;14:272-8. 17.

64. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective exploratory analysis. *Lancet Oncol.* 2009;10:35-43.
65. Toso C, Asthana S, Bigam DL, Shapiro AM, Kneteman NM. Reassessing selection criteria prior to liver transplantation for hepatocellular carcinoma utilizing the Scientific Registry of Transplant Recipients database. *Hepatology.* 2009;49:832-8.
66. Yao FY, Kerlan Jr RK, Hirose R, Davern III TJ, Bass NM, Feng S, et al. Excellent outcome following down-staging of hepatocellular carcinoma prior to liver transplantation: an intention-to-treat analysis. *Hepatology.* 2008;48:819-27
67. E. Varo Pérez, J.F. Castroagudín y E. Molina Pérez. Trasplante hepático en el hepatocarcinoma: criterios expandidos de California *Gastroenterol Hepatol.* 2007;30(Supl 1):82-7.
68. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: a 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology.* 2006;43:1303-10.
69. Cillo U, Vitale A, Bassanello M, Boccagni P, Brolese A, Zanusi G, et al. Liver transplantation for the treatment of moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2004;239:150-9. 8.
70. Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis.* 2005;25:133-42.
71. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trial for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology.* 2003;37:429-42.
72. Lewis AL, Taylor RR, Hall B. Pharmacokinetic and safety study of doxorubicin-eluting beads in a porcine model of hepatic arterial embolization. *J Vasc Interv Radiol.* 2006;17:1335-43.
73. Lewis AL, Taylor RR, Hall B. Pharmacokinetic and safety study of doxorubicin-eluting beads in a porcine model of hepatic arterial embolization. *J Vasc Interv Radiol.* 2006;17:1335-43.
74. Varela M, Real MI, Burrel M. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol.* 2007;46:474-81.
75. Lencioni R, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A, et al. A randomized phase II trial of a drug eluting bead in the treatment of hepatocellular carcinoma by transcatheter arterial chemoembolization. *J Clin Oncol.* 2009;27:4523.

76. Gillams AR. Review article, liver ablation therapy. *Br J Radiol.* 2004;77:713-23.
77. Goldberg SN, Gazelle GS, Mueller PR. Thermal ablation therapy for focal malignancy: a unified approach to underlying principles, techniques and diagnostic imaging guidance. *AJR Am J Roentgenol.* 2000;174:323-31.
78. Goldberg SN, Charboneau JH, Dodd III GD, Dupuy DE, Gervais DA, Gillams AR, et al. Image-guided tumor ablation: proposal for standardization of terms and reporting criteria. *Radiology.* 2003;228:335-45.
79. Sangro B, Bilbao JL, Boan J et al. Sangro B, Bilbao JL, Boan J et al. Radioembolisation using 90Y-resin microspheres for patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66: 792–800.
80. Andolino DL, Johnson CS, Maluccio M, et al. Stereotactic body radiotherapy for primary hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;81:e447-e453. *Int J Radiation Oncol Biol Phys*, Vol. 87, No. 1, pp. 22e32, 2013
81. Ishii H, Okada S, Nose H, Okusaka T, Yoshimori M, Takayama T, et al. Local recurrence of hepatocellular carcinoma after percutaneous ethanol injection. *Cancer* 1996; 77: 1792-6.
82. Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, de Sio I, Bolondi L, et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 1995; 197: 101-8.
83. Farinati F, Demaria M, Fornasiero A, Salvagnini M, Faggioli S, Chiaramonte M, et al. Prospective controlled trial with antiestrogen drug tamoxifen in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 659-62.
84. Castells A, Bruix J, Bru C, Ayuso C, Rosa M, Boix L, et al. Treatment of hepatocellular carcinoma with tamoxifen: a double-blind placebo controlled trial in 120 patients. *Gastroenterology* 1995; 109: 917-22.
85. International Interferon-Alpha Hepatocellular Carcinoma Study Group. Effect of interferon-alpha on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *Lancet* 1998; 351: 1535-9.
86. Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, Morimoto H, Takeda T, Nakajima S, et al. Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis with cirrhosis. *Lancet* 1995; 346: 1051-5.
87. Llovet JM, Sala M, Castells LI, Suarez Y, Vilana R, Bianchi LI, et al. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 54-8.

88. Mathurin P, Rixe O, Carbonell N, Bernard B, Cluzel P, Bellin MF, et al. Overview of medical treatment in unresectable hepatocellular carcinoma, an impossible meta-analysis?. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 111-26.
89. Sangro B, Ruiz J, Qian C, Prieto J. Terapia génica de las enfermedades digestivas. *Gastroenterol Hepatol* 2000; 23: 394-402.
90. Yeo W et al. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Oct 19;97(20):1532-8.
91. Gish RG, Porta C, Lazar L et al. Phase III randomized controlled trial comparing the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with nolatrexed or doxorubicin. *J Clin Oncol.* 2007 Jul 20;25(21):3069-75.
92. Roxburgh P, Evans TR. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: are we making progress? *Adv Ther.* 2008 Nov;25(11):1089-104.
93. LoRusso PM, Canetta R, Wagner JA, Balogh EP, Nass SJ, Boerner SA, Hohneker J: Accelerating cancer therapy development: the importance of combination strategies and collaboration. Summary of an institute of medicine workshop. *Clin Cancer Res* 2012, 18:6101-6109.
94. Erber, R., Thurnher, A., Katsen, A. D., Groth, G., Kerger, H., Hammes, H. P., et al. (2004). Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J.* 18, 338–340.
95. Ficha Técnica Sorafenib EMEA.
96. Ficha Técnica Sorafenib FDA.
97. Simpson D et al. Sorafenib: In hepatocellular carcinoma. *Drugs* 2008; 68(2): 251-8.
98. Zhu AX. Development of sorafenib and other molecularly targeted agents in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2008; 112(2): 250-9.
99. Furuse J et al. Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99(1): 159-65.
100. Llovet B, Ricci V, Mazzaferro P et al. Randomized phase III trial of Sorafenib vs placebo in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. 25 (Suppl:18S); Jun 2007 // Scientific Discussion EMEA (Septiembre 2007) and FDA (Nov 2007).

101. J. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro, P. et al. For the SHARP Investigators Study Group. Sorafenib improves survival in advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC): Results of a Phase III randomized placebo-controlled trial (SHARP trial). *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: LBA1.
102. Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., et al. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 359, 378–390
103. Kong J, Kong F, Gao J, Zhang Q, Dong S, Gu F, Ke S, Pan B, Shen Q, Sun H, Zheng L, Sun W. YC-1 enhances the anti-tumor activity of sorafenib through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in hepatocellular carcinoma *Mol Cancer*. 2014 Jan 13;13(1):7.
104. Hagihara A, Ikeda M, Ueno H, Morizane C, Kondo S, Nakachi K, Mitsunaga S, Shimizu S, Kojima Y, Suzuki E, Katayama K, Imanaka K, Tamai C, Inaba Y, Sato Y, Kato M, Okusaka T. A phase I study of the combination chemotherapy of sorafenib and transcatheter arterial infusion with cisplatin for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2014 Jan 17.
105. Zhai, B., Jiang, X., He, C., Zhao, D., Ma, L., Xu, L., et al. Arsenic trioxide potentiates the anti-cancer activities of sorafenib against hepatocellular carcinoma by inhibiting Akt activation. *Tumour Biol*. 2015; 36, 2323–2334.
106. Chou TC, Talalay P: Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984, 22:27-55.
107. Wei G, Wang M, Hyslop T, Wang Z, Carr BI: Vitamin K enhancement of sorafenib-mediated HCC cell growth inhibition in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2010, 127:2949-2958.
108. Rockwell, S., Grove, T. A., Liu, Y., Cheng, Y. C., Higgins, S. A., and Booth, C. J. Preclinical studies of the Chinese Herbal Medicine formulation PHY906 (KD018) as a potential adjunct to radiation therapy. *Int. J. Radiat. Biol*. 2013;89, 16–25.
109. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, 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.
110. Abdel-Rahman, O., and Fouad, M. (2014). Sorafenib-based combination as a first line treatment for advanced hepatocellular carcinoma: a systematic review of the literature. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 91,1 -7.

111. Gauthier, A., and Ho, M. Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatol. Res.* 2013; 43, 147–154.
112. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C: Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 2006, 66:11851-11858.
113. Subramaniam A, Shanmugam MK, Perumal E, Li F, Nachiyappan A, Dai X, Swamy SN, Ahn KS, Kumar AP, Tan BK, et al.: Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1835, 2013:46-60.
114. Tai WT, Cheng AL, Shiau CW, Huang HP, Huang JW, Chen PJ, Chen KF: Signal transducer and activator of transcription 3 is a major kinase-independent target of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2011, 55:1041-1048.
115. Gu FM, Li QL, Gao Q, Jiang JH, Huang XY, Pan JF, Fan J, Zhou J: Sorafenib inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by blocking STAT3. *World J Gastroenterol* 2011, 17:3922-3932.
116. Cervello M, Bachvarov D, Lampiasi N, Cusimano A, Azzolina A, McCubrey JA, Montalto G: Molecular mechanisms of sorafenib action in liver cancer cells. *Cell Cycle* 2012, 11:2843-2855.
117. Liu L et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 2006; 66(24): 11851-8.
118. Adnane, L., Trail, P. A., Taylor, I., and Wilhelm, S. M. (2006). Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol.* 669 407, 597–612.
119. L. Bolondi, W. Caspary, J. Bennouna et al. Clinical benefit of sorafenib in hepatitis C patients with hepatocellular carcinoma (HCC): Subgroup analysis of the SHARP trial. 2008 Gastrointestinal Cancers Symposium.
120. Guan, Y. S., and He, Q. Sorafenib: activity and clinical application in patients with hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Pharmacother* 2011; 12, 303–313.
121. Honma, Y., and Harada, M. (2013). Sorafenib enhances proteasome inhibitor-mediated cytotoxicity via inhibition of unfolded protein response and keratin phosphorylation. *Exp. Cell Res.* 319, 2166–2178.

122. Liu, L. P., Ho, R. L., Chen, G. G., and Lai, P. B. (2012). Sorafenib inhibits hypoxia inducible factor-1alpha synthesis: implications for antiangiogenic activity in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 18, 5662–5671.
123. Wilhelm, S. M., Adnane, L., Newell, P., Villanueva, A., Llovet, J. M., and Lynch, M. (2008). Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3129–40.
124. Zhang, C. Z., Wang, X. D., Wang, H. W., Cai, Y., and Chao, L. Q. Sorafenib inhibits liver cancer growth by decreasing mTOR, AKT, and PI3K expression. *J. B.U.ON. Off. J. Balk. Union Oncol.* 2015; 20, 218–222.
125. Ezzoukhry Z, Louandre C, Trecherel E, Godin C, Chauffert B, Dupont S, Diouf M, Barbare JC, Maziere JC, Galmiche A: EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *Int J Cancer* 2012, 131:2961-2969.
126. Blivet-Van Eggelpeel MJ, Chettouh H, Fartoux L, Aoudjehane L, Barbu V, Rey C, Priam S, Housset C, Rosmorduc O, Desbois-Mouthon C: Epidermal growth factor receptor and HER-3 restrict cell response to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *J Hepatol* 2012, 57:108-115.
127. Chen KF, Tai WT, Liu TH, Huang HP, Lin YC, Shiao CW, Li PK, Chen PJ, Cheng AL: Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3. *Clin Cancer Res* 2010, 16:5189-5199.
128. Liang Y, Zheng T, Song R, Wang J, Yin D, Wang L, Liu H, Tian L, Fang X, Meng X, et al.: Hypoxia-mediated sorafenib resistance can be overcome by EF24 through Von Hippel-Lindau tumor suppressor-dependent HIF-1alpha inhibition in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013, 57:1847-1857.
129. Chiou, J. F., Tai, C. J., Huang, M. T., Wei, P. L., Wang, Y. H., An, J., et al. (2010). Glucose-regulated protein 78 is a novel contributor to acquisition of resistance to sorafenib in hepatocellular Ann. Surg. Oncol. 17, 603–612.
130. Eum, K. H., Ahn, S. K., Kang, H., and Lee, M. Differential inhibitory effects of two Raf-targeting drugs, sorafenib and PLX4720, on the growth of multidrug resistant cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2013; 372, 65–74.
131. He, C., and Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 2009; 43, 67–93.
132. Eskelinen, E. L. The dual role of autophagy in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2011; 11, 294–300.

133. Fischer, T. D., Wang, J. H., Vlada, A., Kim, J. S., and Behrns, K. E. (2014). Role of autophagy in differential sensitivity of hepatocarcinoma cells to sorafenib. *World J. Hepatol.* 6, 752–758.
134. Manov, I., Pollak, Y., Broneshter, R., and Iancu, T. C. (2011). Inhibition of doxorubicin induced autophagy in hepatocellular carcinoma Hep3B cells by sorafenib--the role of extracellular signal-regulated kinase counteraction. *FEBS J.* 278, 3494–3507.
135. Park, M. A., Reinehr, R., Haussinger, D., Voelkel-Johnson, C., Ogretmen, B., Yacoub, A., et al. (2010). Sorafenib activates CD95 and promotes autophagy and cell death via Src family kinases in gastrointestinal tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 9, 2220– 2231.
136. Shimizu, S., Takehara, T., Hikita, H., Kodama, T., Tsunematsu, H., Miyagi, T., et al. (2012). Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int. J. cancer. Journal Int. du cancer* 2012; 131, 548–557.
137. Stiuso, P., Potenza, N., Lombardi, A., Ferrandino, I., Monaco, A., Zappavigna, S., et al. MicroRNA-423-5p Promotes Autophagy in Cancer Cells and Is Increased in Serum From Hepatocarcinoma Patients Treated With Sorafenib. *Mol. Ther. Acids* 2015; 4, e233.
138. Sarkar, S. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem. Soc. Trans.* 2013; 41, 1103–1130.
139. Shi, Y.-H. H., Ding, Z.-B. B., Zhou, J., Hui, B., Shi, G.-M. M., Ke, A.-W. W., et al. Targeting autophagy enhances sorafenib lethality for hepatocellular carcinoma via ER stress-related apoptosis. *Autophagy* 7, 2011; 1159–1172.
140. Tai, W. T., Shiau, C. W., Chen, H. L., Liu, C. Y., Lin, C. S., Cheng, A. L., et al. Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis.* 2013; 4, e485.
141. Yuan, H., Li, A.-J. J., Ma, S.-L. L., Cui, L.-J. J., Wu, B., Yin, L., et al. (2014). Inhibition of autophagy significantly enhances combination therapy with sorafenib and HDAC inhibitors for human hepatoma cells. *World J. Gastroenterol.* 20, 4953– 4962.
142. Park, M. A., Reinehr, R., Haussinger, D., Voelkel-Johnson, C., Ogretmen, B., Yacoub, A., et al. Sorafenib activates CD95 and promotes autophagy and cell death via Src family kinases in gastrointestinal tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 2010, 2220– 2231.

143. Park, M. A., Zhang, G., Martin, A. P., Hamed, H., Mitchell, C., Hylemon, P. B., et al. Vorinostat and sorafenib increase ER stress, autophagy and apoptosis via ceramide-dependent CD95 and PERK activation. *Cancer Biol. Ther.* 2008; 7, 1648–1662.
144. Bareford, M. D., Hamed, H. A., Tang, Y., Cruickshanks, N., Burow, M. E., Fisher, P. B., et al. Sorafenib enhances pemetrexed cytotoxicity through an autophagy dependent mechanism in cancer cells. *Autophagy* 2011. 7, 1261–1262.
145. Bareford, M. D., Park, M. A., Yacoub, A., Hamed, H. A., Tang, Y., Cruickshanks, N., et al. Sorafenib enhances pemetrexed cytotoxicity through an autophagy dependent mechanism in cancer cells. *Cancer Res.* 2011; 71, 4955–4967.
146. Hurvitz, S. A., and Kakkar, R. Role of lapatinib alone or in combination in the treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast cancer* 2012; 4, 35–831 51.
147. Opdam, F. L., Guchelaar, H. J., Beijnen, J. H., and Schellens, J. H. Lapatinib for advanced or metastatic breast cancer. *Oncologist* 2012; 17, 536–542.
148. Wang, H. Lapatinib for the treatment of breast cancer in the People's Republic of China. *Onco. Targets. Ther.* 2014; 7, 1367–1373.
149. Tavallai, M., Hamed, H. A., Roberts, J. L., Cruickshanks, N., Chuckalovcak, J., Poklepovic, A., et al. (2015). Nexavar/Stivarga and Viagra Interact to Kill Tumor Cells. *J. Cell. Physiol.* 2015.
150. Pisonero-Vaquero, S., Martinez-Ferreras, A., Garcia-Mediavilla, M. V, Martinez-Florez, S., Fernandez, A., Benet, M., et al. Quercetin ameliorates dysregulation of lipid metabolism genes via the PI3K/AKT pathway in a diet-induced mouse model of nonalcoholic fatty liver disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015.
151. Liu, S. H., and Cheng, Y. C. Old formula, new Rx: the journey of PHY906 as cancer adjuvant therapy. *J. Ethnopharmacol.* 2012 140, 614–623.
152. Jakubowicz-Gil, J., Langner, E., Badziul, D., Wertel, I., and Rzeski, W. (2014). Quercetin and sorafenib as a novel and effective couple in programmed cell death induction in human gliomas. *Neurotox. Res.* 26, 64–77.
153. Siegel AB, Olsen SK, Magun A, Brown RS Jr: Sorafenib: where do we go from here? *Hepatology* 2010, 52:360-369.
154. Carr BI. Hepatocellular carcinoma: current management and future trends. *Gastroenterology* 2004; 127(s1): s218-24.
155. Giannini, G., Cabri, W., Fattorusso, C., and Rodriguez, M. (2012). Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: overview and perspectives. *Future Med. Chem.* 4, 1439–1460.

156. Hamed, H. A., Tavallai, S., Grant, S., Poklepovic, A., and Dent, P. Sorafenib/regorafenib and lapatinib interact to kill CNS tumor cells. *J. Cell. Physiol.* 2015; 230, 131–139.
157. Carr, B. I., Cavallini, A., Lippolis, C., D'Alessandro, R., Messa, C., Refolo, M. G., et al. (2013). Fluoro-Sorafenib (Regorafenib) effects on hepatoma cells: growth inhibition, quiescence, and recovery. *J. Cell. Physiol.* 228, 292–297.
158. Abou-Alfa GK et al. Phase II study of Sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4293-4300.14.
159. Richly H et al. Results of a phase I trial of sorafenib (BAY 43-9006) in combination with doxorubicin in patients with refractory solid tumors. *Ann Oncol* 2006; 17(5): 866-73.
160. Fallahian F, Karami-Tehrani F, Salami S, Aghaei M: Cyclic GMP induced apoptosis via protein kinase G in oestrogen receptor-positive and -negative breast cancer cell lines. *FEBS J* 2011, 278:3360-3369.
161. Hurvitz, S. A., and Kakkar, R. Role of lapatinib alone or in combination in the treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast cancer* 2012; 4, 35–51.
162. Opdam, F. L., Guchelaar, H. J., Beijnen, J. H., and Schellens, J. H. Lapatinib for advanced or metastatic breast cancer. *Oncologist* 2012; 17, 536–542.
163. Wang, H. Lapatinib for the treatment of breast cancer in the People's Republic of China. *Onco. Targets. Ther.* 2014; 7, 1367–1373.
164. Lee CS, Kwak SW, Kim YJ, Lee SA, Park ES, Myung SC, Kim W, Lee MS, Lee JJ: Guanylate cyclase activator YC-1 potentiates apoptotic effect of licochalcone A on human epithelial ovarian carcinoma cells via activation of death receptor and mitochondrial pathways. *Eur J Pharmacol* 2012, 683:54-62.
165. Huang YT, Pan SL, Guh JH, Chang YL, Lee FY, Kuo SC, Teng CM: YC-1 suppresses constitutive nuclear factor-kappaB activation and induces apoptosis in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005, 4:1628-1635.
166. Chi, K. N., Ellard, S. L., Hotte, S. J., Czaykowski, P., Moore, M., Ruether, J. D., et al. A phase II study of sorafenib in patients with chemo-naive castration resistant prostate cancer. *Ann. Oncol.* 2008; 19, 746–751.
167. Lian, J., Ni, Z., Dai, X., Su, C., Smith, A. R., Xu, L., et al.

- Sorafenib sensitizes (-)-gossypol-induced growth suppression in androgen-independent prostate cancer cells via Mcl-1 inhibition and Bak activation. *Mol. Cancer Ther.* 2012; 11, 416–426.
168. Kummar, S., Copur, M. S., Rose, M., Wadler, S., Stephenson, J., O'Rourke, M., et al. A phase I study of the chinese herbal medicine PHY906 as a modulator of irinotecan-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 2011; 10, 85–96.
169. Walker, T., Mitchell, C., Park, M. A., Yacoub, A., Graf, M., Rahmani, M., et al. Sorafenib and vorinostat kill colon cancer cells by CD95-dependent and - independent mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 2009; 76, 342–355.
170. Feng Y, Zhu H, Ling T, Hao B, Zhang G, Shi R: Effects of YC-1 targeting hypoxia-inducible factor 1 alpha in oesophageal squamous carcinoma cell line Eca109 cells. *Cell Biol Int* 2011, 35:491-497.
171. Wu SY, Pan SL, Chen TH, Liao CH, Huang DY, Guh JH, Chang YL, Kuo SC, Lee FY, Teng CM: YC-1 induces apoptosis of human renal carcinoma A498 cells in vitro and in vivo through activation of the JNK pathway. *Br J Pharmacol* 2008, 155:505-513.
172. Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., et al. (2007). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 356, 125–134.
173. Knievel, J., Schulz, W. A., Greife, A., Hader, C., Lubke, T., Schmitz, I., et al. (2014). Multiple mechanisms mediate resistance to sorafenib in urothelial cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 20500–20517.
174. Gollob, J. A., Rathmell, W. K., Richmond, T. M., Marino, C. B., Miller, E. K., Grigson, G., et al. (2007). Phase II trial of sorafenib plus interferon alfa-2b as first- or second line therapy in patients with metastatic renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 3288– 3295.
175. Chen CJ, Hsu MH, Huang LJ, Yamori T, Chung JG, Lee FY, Teng CM, Kuo SC: Anticancer mechanisms of YC-1 in human lung cancer cell line, NCI-H226. *Biochem Pharmacol* 2008, 75:360-368.
176. To KF, Chan MW, Leung WK, Ng EK, Yu J, Bai AH, Lo AW, Chu SH, Tong JH, Lo KW, et al.: Constitutional activation of IL-6-mediated JAK/STAT pathway through hypermethylation of SOCS-1 in human gastric cancer cell line. *Br J Cancer* 2004, 91:1335-1341.
177. Strowski MZ, Cramer T, Schafer G, Juttner S, Walduck A, Schipani E, Kemmner W, Wessler S, Wunder C, Weber M, et al.: Helicobacter pylori stimulates host vascular endothelial growth factor-A (vegf-A) gene

- expression via MEK/ERK-dependent activation of Sp1 and Sp3. *FASEB J* 2004, 18:218-220.
178. Alonso-Gordoa, T., Diez, J. J., Duran, M., and Grande, E. (2015). Advances in thyroid cancer treatment: latest evidence and clinical potential. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 7, 672 22–38.
179. Lin, C. I., Whang, E. E., Lorch, J. H., and Ruan, D. T. (2012). Autophagic activation potentiates the antiproliferative effects of tyrosine kinase inhibitors in medullary thyroid cancer. *Surgery* 152, 1142–1149.
180. Chung JG, Yang JS, Huang LJ, Lee FY, Teng CM, Tsai SC, Lin KL, Wang SF, Kuo SC: Proteomic approach to studying the cytotoxicity of YC-1 on U937 leukemia cells and antileukemia activity in orthotopic model of leukemia mice. *Proteomics* 2007, 7:3305-3317.
181. Antar, A., Kharfan-Dabaja, M. A., Mahfouz, R., and Bazarbachi, A. (2014). Sorafenib Maintenance Appears Safe and Improves Clinical Outcomes in FLT3-ITD Acute Myeloid Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk.*
182. Kharaziha, P., De Raeve, H., Fristedt, C., Li, Q., Gruber, A., Johnsson, P., et al. (2012). Sorafenib has potent antitumor activity against multiple myeloma in vitro, ex vivo, and in vivo in the 5T33MM mouse model. *Cancer Res.* 72, 5348–5362.
183. Rahmani, M., Davis, E. M., Bauer, C., Dent, P., and Grant, S. (2005). Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down regulation of Mcl-1 through inhibition of translation. *J. Biol. Chem.* 280, 35217– 35227.
184. Zhao Q, Du J, Gu H, Teng X, Zhang Q, Qin H, Liu N: Effects of YC-1 on hypoxia-inducible factor 1-driven transcription activity, cell proliferative vitality, and apoptosis in hypoxic human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2007, 34:242-247.
185. Colombo M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Digestion.* 1998;59(Suppl 2):70-1.
186. Bolondi L, Sofía S, Siringo S, Gaiani S, Casali A, Zironi G, et al. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut* 2001; 48: 251-9.
187. A. Linares, M. Rodríguez, L. Rodrigo. Algoritmo diagnóstico y terapéutico del carcinoma hepatocelular *Oncología*, 2004; 27 (4):223-229.
188. Moral A et al. Marcadores tumorales serológicos en cirugía hepatobiliopancreática. *Cir Esp* 2004;76(5):276-83.

189. 5. Johnson PJ. Role of alpha-fetoprotein in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *J Gast Hepatol* 1999; (Suppl): S32-36.
190. Sherman M. Alphafetoprotein: An obituary. *J Hepatol* 2001;34:603-60.
191. Tangkijvanich P, Anukulkarnkusol N, Suwangool P, Lertmaharit S, Hanvivatvong O, Kullavanijaya P, et al. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: analysis based on serum alpha-fetoprotein levels. *J Clin Gastroenterol.* 2000;31:302-8.
192. Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC. High a-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and b-catenin mutations. *Int J Cancer.* 2004;112:44-50.
193. Huo TI, Huang YH, Lui WY, Wu JC, Lee PC, Chan FY, et al. Selective prognostic impact of serum alpha-fetoprotein level in patients with hepatocellular carcinoma: analysis of 543 patients in a single center. *Oncol Rep.* 2004;11:543-50.
194. Reichmam TW, Bahramipour P, Barone A, Koneru B, Fisher A, Contractor D, et al. Hepatitis status, Child-Pugh classification, and serum AFP levels predict survival in patients treated with transarterial embolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Surg.* 2005;9:638-45.
195. 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;82:116–140.
196. Leerapun A, Suravarapu SV, Bida JP, et al. The utility of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:394–402.
197. Kobayashi M, Hosaka T, Ikeda K, et al. Highly sensitive AFP-L3% assay is useful for predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after curative treatment pre- and postoperatively. *Hepatology Res.* 2011;41:1036–1045.
198. Joo M, Chi JG, Lee H. Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci.* 2005;20:829–834.
199. 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;6:1049–1057.

200. 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;18:544–550.
201. Tremosini S, Forner A, Boix L, et al. Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2012;61:1481–1487.
202. Zaika AI, Rifai W. The role of p53 protein family in gastrointestinal malignancies. *Cell Death Differ* 2006; 13: 935-940.
203. Flores, E.R., Sengupta, S., Miller, J.B., Newman, J.J., Bronson, R., Crowley, D., Yang, A., McKeon, F., Jacks, T. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 2005; 7: 363–373.
204. Casciano, I., Mazzocco, K., Boni, L., Pagnan, G., Banelli, B., Allemanni, G., Ponzoni, M., Tonini, G.P., Romani, M. Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ.*2002; 9: 246–251.
205. Melino G et al. P73 induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* 2004; 279: 8076-8083.
206. Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., Vousden, K.H. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19: 1751–1758.
207. Brooks, C.L., Gu, W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003; 15: 164–171.
208. Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saviile, M.K., Lane, D.P. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.*2005; 19: 2122–2137.
209. Ghosh, A., Stewart, D., Matlashewski, G. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol. Cell Biol.* 2004;24: 7987–7997.
210. Levine, A.J., Finlay, C.A., Hinds, P.W.. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell* 116 (2 Suppl), 2004; S67–S69.
211. Vousden, K.H. p53: death star. *Cell* 2000; 103: 691–694.
212. Dimri, G.P. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*2005; 7: 505–512.

213. Harris, S.L., Levine, A.J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; 24: 2899–2908.
214. Oren, M. p53: the ultimate tumor suppressor gene? *FASEB J.* 1992; 6: 3169–3176.
215. Benchimol, S. p53—an examination of sibling support in apoptosis control. *Cancer Cell* 2004; 6: 3–4.
216. Senoo, M., Manis, J.P., Alt, F.W., McKeon, F. p63 and p73 are not required for the development and p53-dependent apoptosis of T cells. *Cancer Cell* 2004; 6: 85–89.
217. Swisher, S.G., Roth, J.A., Nemunaitis, J., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 91: 763–771.
218. Clayman, G.L., el Naggari, A.K., Lippman, S.M., Henderson, Y.C., Frederick, M., Merritt, J.A., Zumstein, L.A., Timmons, T.M., Liu, T.J., Ginsberg, L., Roth, J.A., Hong, W.K., Brusco, P., Goepfert, H.. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16 . 2221–2232.
219. Nemunaitis, J., Swisher, S.G., Timmons, T., Connors, D., Mack, M., Doerksen, L.D., et al.. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with no-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18: 609–622.
220. Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoef, L.G., Masucci, M., Pramanik, A., Selivanova, G., 2004. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat. Med.* 2004; 10: 1321–1328.
221. .Bykov, V.J., Issaeva, N., Zache, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Bergman, J., Selivanova, G., Wiman, K.G. Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *J. Biol. Chem.* 2005a; 280: 30384–30391.
222. Gressner, O., Schilling, T., Lorenz, K., Schulze, S.E., Koch, A., Schulze-Bergkamen, H., Maria, L.A., Candi, E., Terrinoni, A., Valeria, C.M., Oren, M., Melino, G., Krammer, P.H., Stremmel, W., Müller, M.. TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.* 2005; 24 : 2458–2471.
223. Wu, G., Nomoto, S., Hoque, M.O., Dracheva, T., Osada, M., Lee, C.C., Dong, S.M., Guo, Z., Benoit, N., Cohen, Y., Rechthand, P., Califano, J., Moon, C.S., Ratovitski, E., Jen, J., Sidransky, D., Trink, B. DeltaNp63alpha

- and TAp63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. *Cancer Res.* 2003; 63: 2351–2357.
224. Mills, A.A.. p63: oncogene or tumor suppressor? *Curr. Opin. Genet. Dev* 2006; 16: 38–44.
225. Massion, P.P., Taflan, P.M., Jamshedur Rahman, S.M., Yildiz, P., Shyr, Y., Edgerton, M.E., Westfall, M.D., Roberts, J.R., Pietenpol, J.A., Carbone, D.P., Gonzalez, A.L. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res.* 2003; 63: 7113–7121.
226. Hibi, K., Trink, B., Patturajan, M., Westra, W.H., Caballero, O.L., Hill, D.E., Ratovitski, E.A., Jen, J., Sidransky, D. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97: 5462–5467.
227. Candi, E., Schmidt, R., Melino, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; 6: 328–340.
228. Yang, A., Kaghad, M., Caput, D., McKeon, F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* 2002; 18: 90–95
229. Celli, J., Duijf, P., Hamel, B.C., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A.P., Newbury-Ecob, R., Hennekam, R.C., Van Buggenhout, G., van Haeringen, A., Woods, C.G., van Essen, A.J., de Waal, R., Vriend, G., Haber, D.A., Yang, A., McKeon, F., Brunner, H.G., van Bokhoven, H. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 1999; 99: 143–153.
230. Keyes, W.M., Vogel, H., Koster, M.I., Guo, X., Qi, Y., Petherbridge, K.M., Roop, D.R., Bradley, A., Mills, A.A.. p63 heterozygous mutant mice are not prone to spontaneous or chemically induced tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 8435–8440.
231. Keyes, W.M., Wu, Y., Vogel, H., Guo, X., Lowe, S.W., Mills, A.A. p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev.* 2005; 19: 1986–1999.
232. Flores, E.R., Sengupta, S., Miller, J.B., Newman, J.J., Bronson, R., Crowley, D., Yang, A., McKeon, F., Jacks, T. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 2005; 7: 363–373.
233. Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., De Luca, M. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98: 3156–3161.
234. Gressner, O., Schilling, T., Lorenz, K., Schulze, S.E., Koch, A., Schulze-Bergkamen, H., Maria, L.A., Candi, E., Terrinoni, A., Valeria, C.M., Oren, M.,

- Melino, G., Krammer, P.H., Stremmel, W., M^uller, M.. TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.*2005; 24: 2458–2471.
235. Zangen, R., Ratovitski, E., Sidransky, D. DeltaNp63alpha levels correlate with clinical tumor response to cisplatin. *Cell Cycle* 2005; 4: 1313– 1315.
236. Ozaki, T., Nakagawara, A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci* 2005; 96: 729–737.
237. Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A.Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., Caput, D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; 90: 809–819.
238. Moll, U.M., Slade, N., 2004. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol. Cancer Res.* 2004; 2:371–386.
239. Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P., Bourdon, J.C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.*2006; 13: 962–972.
240. Nakagawa, T., Takahashi, M., Ozaki, T., Watanabe, K.K., Todo, S., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakagawara, A.. Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol. Cell Biol.* 2002;22: 2575–2585.
241. Melino, G., De Laurenzi, V., Vousden, K.H.. p73: friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 605–615.
242. Ramadan, S., Terrinoni, A., Catani, M.V., Sayan, A.E., Knight, R.A., Mueller, M., Krammer, P.H., Melino, G., Candi, E. p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*2005; 331: 713–717.
243. Dominguez, G., Garcia, J.M., Pena, C., Silva, J., Garcia, V., Martinez, L., Maximiano, C., Gomez, M.E., Rivera, J.A., Garcia-Andrade, C., Bonilla, F., DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *J. Clin. Oncol* 2006; 24: 805–815.
244. Petrenko, O., Zaika, A., Moll, U.M.. DNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol. Cell Biol.*2003; 23: 5540–5555.
245. M^uller, M., Schilling, T., Sayan, A.E., Kairat, A., Lorenz, K., Schulze-Bergkamen, H., Oren, M., Koch, A., Tannapfel, A., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P.H. TAp73/DeltaNp73 influences apoptotic response,

- chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.* 2005; 12: 1564–1577.
246. Vayssade, M., Haddada, H., Faridoni-Laurens, L., Tourpin, S., Valent, A., Benard, J., Ahomadegbe, J.C.. P73 functionally replaces p53 in adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 2005; 116: 860–869.
247. Costanzo, A., Merlo, P., Pediconi, N., Fulco, M., Sartorelli, V., Cole, P.A., Fontemaggi, G., Fanciulli, M., Schiltz, L., Blandino, G., Balsano, C., Levrero, M., DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol. Cell* 2002 9: 175–186.
248. Gong, J.G., Costanzo, A., Yang, H.Q., Melino, G., Kaelin Jr., W.G., Levrero, M., Wang, J.Y. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999; 399: 806–809.
249. Agami, R., Blandino, G., Oren, M., Shaul, Y. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 1999; 399: 809–813.
250. Thottassery, J.V., Westbrook, L., Someya, H., Parker, W.B., 2006. c-Abl-independent p73 stabilization during gemcitabine- or 4_-thio-beta-d-arabinofuranosylcytosine-induced apoptosis in wild-type and p53-null colorectal cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 400–410.
251. Concin, N., Hofstetter, G., Berger, A., Gehmacher, A., Reimer, D., Watrowski, R., Tong, D., Schuster, E., Hefler, L., Heim, K., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Moll, U.M., Zeimet, A.G., Zeillinger, R.. Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. *Clin. Cancer Res.* 2005;11: 8372–8383.
252. Bergamaschi, D., Gasco, M., Hiller, L., Sullivan, A., Syed, N., Trigiant, G., Yulug, I., Merlano, M., Numico, G., Comino, A., Attard, M., Reelfs, O., Gusterson, B., Bell, A.K., Heath, V., Tavassoli, M., Farrell, P.J., Smith, P., Lu, X., Crook, T. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 2003; 3: 387–402.