



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Programa de Doctorat: Medicina Interna

**Estudi del perfil proteic del plasma de pacients amb
diferents graus d'hepatopatia: identificació de
biomarcadors del carcinoma hepatocel·lular**

Tesi Doctoral presentada per
Isabel Serra Matamala

Directora: **Dra. Carolina Armengol Niell**

Director: **Dr. Ramon Planas Vilà**

Any 2015

Carolina Armengol Niell, directora del Departament Liver Oncology Group de la Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol i **Ramon Planas Vilà**, cap de Servei del Servei de l'Àparell Digestiu de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, certifiquen que la Tesi titulada:

Estudi del perfil proteic del plasma de pacients amb diferents graus d'hepatopatia: identificació de biomarcadors del carcinoma hepatocel·lular

ha sigut realitzada per **Isabel Serra Matamala** sota la seva direcció i és apta per a ser defensada davant d'un tribunal par a optar al grau de Doctora.

Dra. Carolina Armengol Niell

Directora

Dr. Ramon Planas Vilà

Director

Badalona, 20 de novembre de 2015

ÍNDIX DE CONTINGUTS

1.	INTRODUCCIÓ.....	5
1.1	Carcinoma hepatocel·lular..... 5
1.1.1	Epidemiologia, etiologia i factors de risc.....	5
1.1.2	Detecció precoç: programa de vigilància del pacient cirròtic	11
1.1.3	Diagnòstic radiològic i anatomopatològic del CHC	16
1.1.4	Classificació i tractament del CHC: Estadiatge BCLC i implicacions pronòstiques.....	21
1.1.5	Avaluació de la resposta terapèutica	27
1.2	La proteòmica com a eina per a la identificació de biomarcadors.....	28
1.2.1	Proteòmica	32
1.2.2	Biomarcadors de càncer identificats per proteòmica	40
2	HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	45
3	MATERIAL I MÈTODES	48
3.1	Establiment d'una col·lecció de mostres de plasma de pacients amb diferents graus de malaltia hepàtica amb i sense tumor i voluntaris sans.	48
3.1.1	Inclusió de pacients	48
3.1.2	Extracció i emmagatzematge de mostres de plasma	51
3.1.3	Registres de paràmetres clínics i anatomopatològics	52
3.1.4	Anàlisi estadística de les dades clíniques	52
3.2	OBJECTIU 1: Estudi del perfil proteic del plasma de pacients amb diferents graus de malaltia hepàtica amb i sense tumor mitjançant una tecnologia proteòmica d'alt rendiment.....	53
3.2.1	Selecció de pacients per l'anàlisi proteòmica	53
3.2.2	Tractament del plasma per l'anàlisi proteòmica.....	53
3.2.2.1	Depleció de les proteïnes majoritàries del plasma	55
3.2.2.2	Quantificació proteica de la mostra deplecionada	57
3.2.2.3	Precipitació de proteïnes	58
3.2.2.4	Separació de proteïnes segons el seu pes molecular per electroforesi amb gel de poliacrilamida	58
3.2.2.5	Tinció dels gel de poliacrilamida amb nitrat de plata	60
3.2.2.6	Retall de les proteïnes de la mostra.....	61
3.2.2.7	Digestió peptídica.....	62
3.2.2.8	Fraccionament dels pèptids digerits amb cromatografia líquida	63
3.2.2.9	Anàlisi proteòmic per espectrometria de masses i identificació proteica.	64
3.2.2.10	Anàlisi de les dades proteòmiques del plasma obtingudes per HPLC-MS/MS.....	65

ÍNDIX DE CONTINGUTS

3.2.3 Estudi de les dades proteòmiques del plasma: estudi dels diferents perfils proteics	66
3.2.3.1 Anàlisi no supervisada de les dades	66
3.2.3.1 Anàlisi supervisada de les dades	66
3.2.2.11 Anàlisi d'enriquiment funcional	68
3.3 OBJECTIU 2: Identificació i validació de potencials biomarcadors plasmàtics diagnòstic de CHC	69
3.3.1 Identificació de biomarcadors de CHC a partir de l'estudi dels perfils proteics	69
3.3.1.1 Anàlisi quantitativa.....	69
3.3.1.2 Anàlisi qualitativa	70
3.3.2 Validació dels biomarcadors mitjançant la tècnica ELISA	70
3.3.2.1 Anàlisi estadística dels resultats d'ELISA.....	71
4 RESULTATS.....	74
4.1 Establiment d'una col·lecció de mostres de plasma de pacients amb diferents graus de malaltia hepàtica amb i sense tumor així com de voluntaris sans.....	74
4.1.1 Descripció de la col·lecció de mostres de plasma.	74
4.1.2 Seguiment prospectiu dels pacients de la col·lecció	77
4.1.3 Estudi del valor diagnòstic de l'AFP a la col·lecció	77
4.2 OBJECTIU 1: Estudi del perfil proteic del plasma de pacients amb diferents graus de malaltia hepàtica amb i sense tumor mitjançant una tècnica proteòmica d'alt rendiment.....	79
4.2.1 Descripció dels pacients inclosos a l'estudi proteòmic.....	79
4.2.2 Descripció dels perfils proteics de mostres de pacients amb diferents graus d'hepatopatia crònica amb i sense CHC obtinguts per HPLC- MS/MS.....	81
4.2.2.1 Anàlisi no supervisada.....	82
4.2.2.2 Anàlisi supervisada	85
4.3 OBJECTIU 2: Identificació i validació de potencials biomarcadors plasmàtics de CHC	90
4.3.1 Identificació de biomarcadors de CHC a partir de l'estudi dels perfils proteics	90
4.3.1.1 Identificació de putatius biomarcadors diagnòstic precoç de CHC	90
4.3.1.2 Identificació de putatius biomarcadors de disseminació tumoral.....	92
4.3.2 Validació de potencials biomarcadors plasmàtics per ELISA	99
4.3.2.1 Validació de putatius biomarcadors diagnòstic inicial de CHC	101
4.3.2.2 Validació de putatius biomarcadors de disseminació tumoral.....	102
5 DISCUSIÓ.....	105
6 CONCLUSIONS.....	119
7 BIBLIOGRAFIA	122

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Carcinoma hepatocel·lular

El carcinoma hepatocel·lular (CHC) és un tumor maligne de fetge d'origen epitelial que sorgeix de la transformació oncogènica dels hepatòcits o dels cèl·lules precursors d'hepatòcits en un context de dany hepàtic^{1,2}. És el tumor més prevalent del fetge i correspon a més del 90% dels tumors primaris hepàtics³.

1.1.1 Epidemiologia, etiologia i factors de risc

El CHC és altament prevalent i mortal, la incidència del qual està augmentant en els darrers anys a nivell mundial, amb més de 700.000 casos anuals diagnosticats⁴. El CHC és el cinquè tumor més freqüent en homes i el novè en dones i la segona causa de mort per càncer en tot el món, estimant-se 746.000 morts l'any 2012⁴.

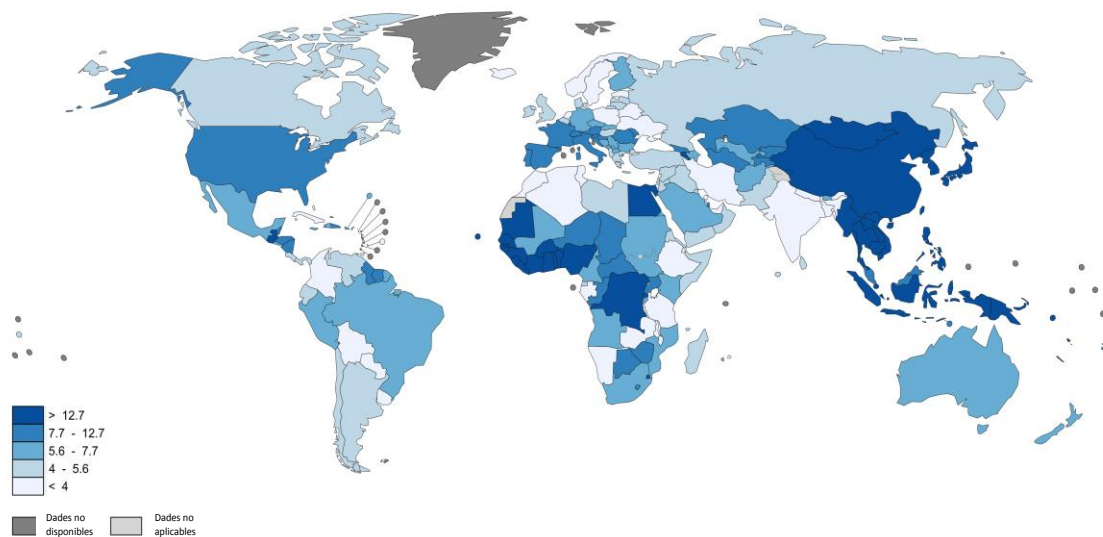


Figura 1. Variació geogràfica del carcinoma hepatocel·lular a nivell mundial estimada en la taxa d'incidència estandarditzada per edat en homes (Adaptació de World Health Organization 2012)⁴.

La incidència del CHC varia en funció de l'àrea geogràfica tal com es pot observar a la figura 1. Així, l'Àfrica Sud-Sahariana i l'extrem orient són regions d'alta incidència, amb una taxa d'edat estandarditzada (TEE) d'entre 22 i 33 casos per 100.000 habitants i any; els països de l'àrea mediterrània presenten una incidència mitjana (TEE de 9.5 casos per

100.000 habitants i any); i en canvi, les regions del nord d'Europa, Austràlia i Amèrica presenten una baixa incidència (TEE d'entre 3.7 i 4.6 casos per 100.000 habitants)⁴.

Aquestes variacions geogràfiques van en paral·lel al la distribució als factors genètics i factors ambientals⁵. D'aquesta manera, la majoria de CHC (80%) que apareixen a l'Est Asiàtic i a l'Àfrica Sud-Sahariana estan causats principalment pel virus de l'hepatitis B (VHB) com a factor de risc dominant de la inflamació crònica hepàtica, juntament amb l'exposició a l'aflatoxina B1. Contràriament, a la zona d'Amèrica del Nord, Europa i Japó, la infecció pel virus de l'hepatitis C (VHC) és el factor principal, juntament amb l'abús en el consum d'alcohol, com és el cas del nostre medi. La incidència del CHC a Espanya en TEE és entre 2.4 i 9.9 casos per 100.000 habitants, segons dones i homes respectivament, sent amb una taxa de mortalitat de 4.4 casos per 100.000 habitants a l'any⁴ (Figura 2). La causa més freqüent de malaltia hepàtica és el VHC en un 60%-70% dels casos, seguit del consum d'alcohol (20%) i el VHB (15%).

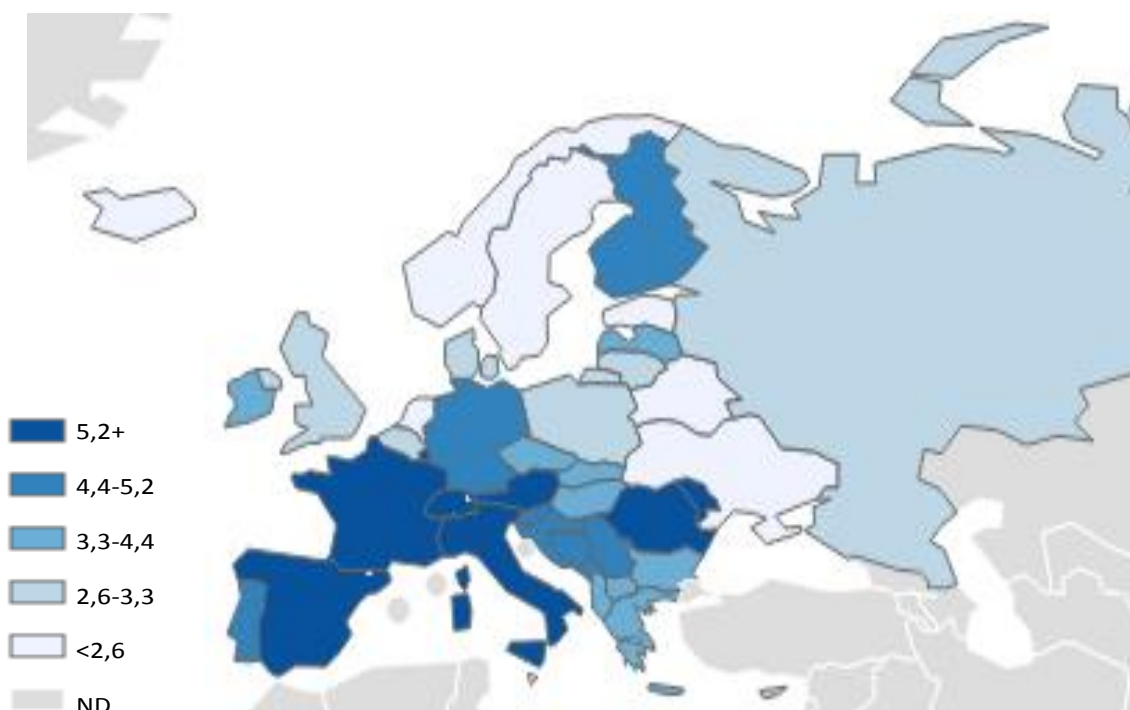


Figura 2: Variació geogràfica del carcinoma hepatocel·lular a nivell europeu estimada en la taxa d'incidència estandarditzada per edat en homes i dones (Adaptació de World Health Organization 2012)⁴. A Espanya el CHC ocupa el 5è lloc de tumors més freqüents. La intensitat de color és proporcional a la magnitud de la incidència.

La incidència del CHC és més freqüent en homes que en dones, en una proporció de 2 a 4 vegades⁵. L'edat de presentació més freqüent és entre 60-70 anys, tret de les zones d'alta prevalença el CHC es apareix en edats més precoces, entre 45-60 anys⁵.

El CHC es desenvolupa en la majoria dels casos (70-90%) en el sí d'un fetge amb una inflamació crònica de base, base que si es perllonga en el temps, condueix a la cirrosi hepàtica⁵. La cirrosi és el factor de risc més important pel desenvolupament del CHC, independentment de l'etiologia³. Tant és així que, un terç dels pacients cirròtics desenvoluparan un CHC al llarg de la seva vida amb una incidència de 1-8% casos per any (2% dels pacients cirròtics infectats per VHB i 3-8% dels pacients cirròtics infectats per VHC)⁶. La incidència acumulada de CHC en pacients amb cirrosi pot arribar al 20% als 5 anys⁷.

De totes les causes de cirrosi, les infeccions virals del VHB i VHC són les més freqüents, seguit del consum d'alcohol i la malaltia metabòlica grassa no alcohòlica (MMGNA)^{6,7,8}. Menys freqüents són les malalties hereditàries com l'hemocromatosi, la malaltia de Wilson, el dèficit d'alfa 1 antitripsina, les hepatitis autoimmunes i cirrosi biliar primària(CBP), amb una incidència acumulada de presentar CHC que varia des del 20% als 5 anys quan la causa de cirrosi és una hemocromatosi fins al 4% als 5 anys quan la causa és una CBP. L'associació entre alcohol, hepatitis crònica virals o d'altres factors associats a la síndrome metabòlica tenen un efecte sinèrgic d'inflamació hepàtica. Com a cofactors importants de risc de carcinogènesi, cal destacar l'exposició d'aflatoxina B1 en algunes parts d'Àfrica i Àsia, el consum de tabac, la coinfecció del virus de la immunodeficiència humana (VIH), la presència d'hipertensió portal, la obesitat i la diabetis mellitus les quals que exacerben el risc de presentar CHC en pacients amb hepatitis crònica viral⁸.

Mitjançant la prevenció de l'adquisició dels factors de risc s'aconsegueix disminuir la incidència de cirrosi i en conseqüència també de CHC. Gràcies a la vacuna contra el VHB s'ha reduït la incidència d'infecció de manera significativa⁹. Per contra, la infecció pel VHC, la ingesta d'aflatoxina, el consum d'alcohol o la síndrome metabòlica es poden prevenir mitjançant campanyes dirigides a millorar les condicions socio sanitàries dels ciutadans i la promoció d'hàbits de vida saludables¹⁰. En el cas que s'hagi ja adquirit el

factor de risc, la única opció de prevenció és evitar la progressió cap a cirrosi mitjançant el tractament antiviral, l'abstinència alcohòlica o el control metabòlic. Els tractaments antivirals actuals del VHB són molt efectius i aconsegueixen eliminar la càrrega viral circulant, tot i no aconseguir la seroconversió de l'anticòs contra l'antigen de superfície del virus, signe de curació¹¹. En canvi, els nous antivirals contra el VHC aconsegueixen la curació de la infecció en més del 90% dels casos aturant el procés de dany hepàtic¹². Aquesta nova teràpia ha sigut una revolució en el marc del VHC ja que antigament amb la teràpia interferó s'aconseguia una baixa resposta terapèutica a expenses d'elevats efectes secundaris.

Hepatocarcinogènesi

Tal com s'esquematitza a la figura 3, el desenvolupament del CHC inclou diferents etapes, en un procés que s'inicia en el moment de dany hepàtic el qual provoca un canvi progressiu del fenotip dels hepatòcits mitjançant l'acumulació d'alteracions genètiques i epigenètiques, fins l'aparició del CHC¹³.

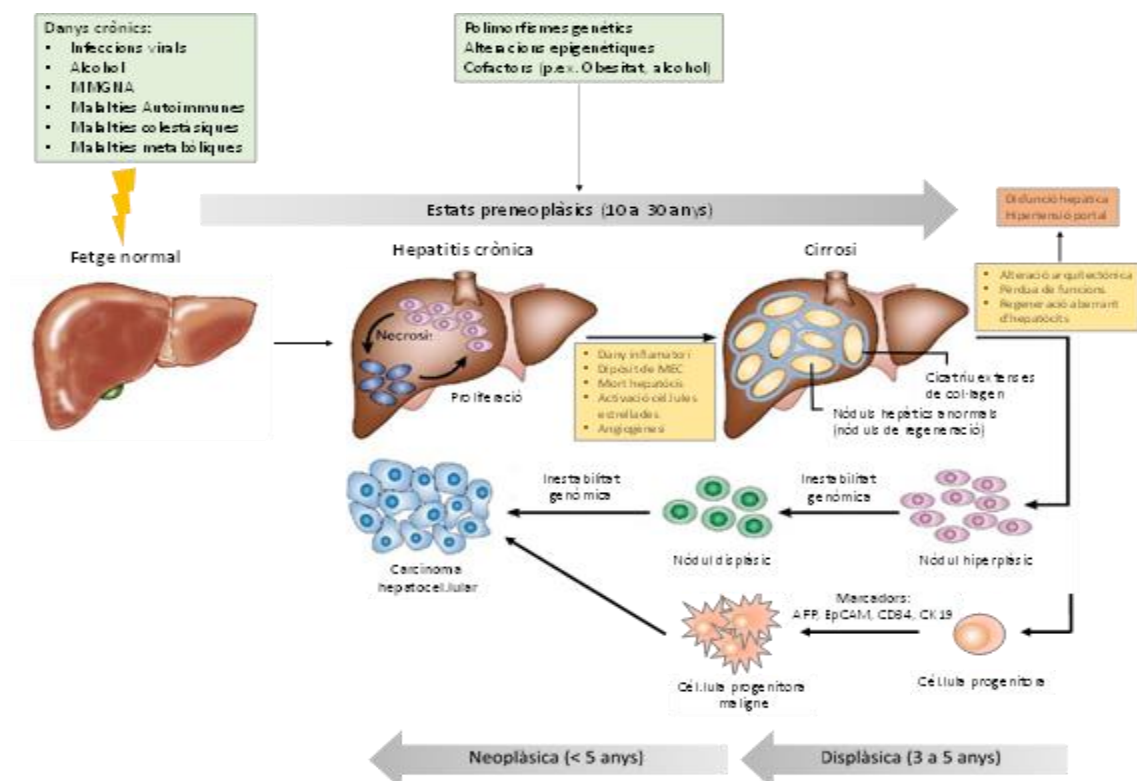


Figura 3. Etapes de la carcinogènesi del fetge i implicació de les diferents etiologies. AFP: Alfa Fetoproteïna; CK19: citoqueratina19; EpACM: *Epithelial cell adhesion molecule*; MEC: Matriu Extracel·lular; MMGNA: Malaltia Metabòlica Grassa No Alcohòlica. (Adaptació de Farazi et.al.)^{14,1}

La fibrosi hepàtica és un estat preneoplàsic i és la conseqüència del desequilibri entre un augment de fibrogènesi i una disminució de fibrinòlisi davant un dany hepàtic crònic (per exemple VHB, VHC, abús d'alcohol, MMNA). Independentment de la causa, es produeix la mort dels hepatòcits, i el dipòsit excessiu de proteïnes de la matriu extracel·lular i teixit connectiu al parènquima hepàtic, formant una cicatriu¹⁵. La formació d'aquesta cicatriu és un procés molt lent (aproximadament al llarg de 30 anys quan la causa és VHC), però l'existència de cofactors com l'obesitat o l'alcohol acceleren la història natural.

Aquest microambient inflamatori afavoreix l'hepatocarcinogènesi la qual pot ser el resultat de la pèrdua de diferenciació d'hepatòcits madurs o bé a la transformació oncogènica de cèl·lules progenitores (anomenades *stem cells*)¹⁶. Els canvis que promouen un avantatge en el creixement són seleccionats i acumulats al llarg del temps, donant lloc directament a cèl·lules tumorals o bé, cèl·lules displàsiques les quals s'organitzen en nòduls displàsics que gràcies al microambient adequat que produeix la fibrosi, podent adquirir un fenotip maligne capaç de sobreviure i proliferar¹. Per altra banda, el CHC es pot originar també de cèl·lules progenitores o *stem cells*¹⁷. Es creu que els tumors sòlids contenen *cancer stem cells* (CSCs), i són responsables de la recidiva tumoral i de les metàstasis degut a les seves capacitats d'autorenovar-se, diferenciar i desenvolupar nous tumors.

En el context d'una inflamació crònica, les cèl·lules progenitores poden patir una transformació oncogènica, que donaria lloc a l'activació i divisió descontrolada donant lloc a un càncer de fetge s'activen i es multipliquen descontroladament formant agregats de cèl·lules tumorals¹⁸. Es coneix l'existència d'aquestes cèl·lules en el CHC perquè expressen marcadors propis CSCs hepàtiques, com per exemple l'Alfa Fetoproteïna (AFP), *Epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM), CD34 o citoqueratina 19 (CK19)^{17,18}. Durant el procés d'hepatocarcinogènesi, múltiples alteracions genètiques i epigenètiques s'han associat amb la proliferació i manteniment de les cèl·lules tumorals, incloent l'activació d'oncogens (p. ex. β -catenina, N-RAS, c-myc) i inactivació de gens supressors de tumors (p. ex. p53, AXIN1)^{16,19,20}. La complexitat genòmica i heterogeneïtat del CHC comporta que la majoria dels mecanismes moleculars subjacents es mantinguin encara desconeguts.

En general, les cèl·lules canceroses adquireixen unes capacitats durant la carcinogènesi les quals els permeten créixer i desenvolupar-se. Aquestes habilitats es resumeixen en la capacitat proliferativa sostinguda, l'evasió de mecanismes supressors del creixement, la resistència a la mort cel·lular, permetent una immortalitat replicativa, induint angiogènesi, activant mecanismes d'invasió i metàstasi, reprogramació del metabolisme energètic i evasió del sistema immune^{21,22} (Figura 4).

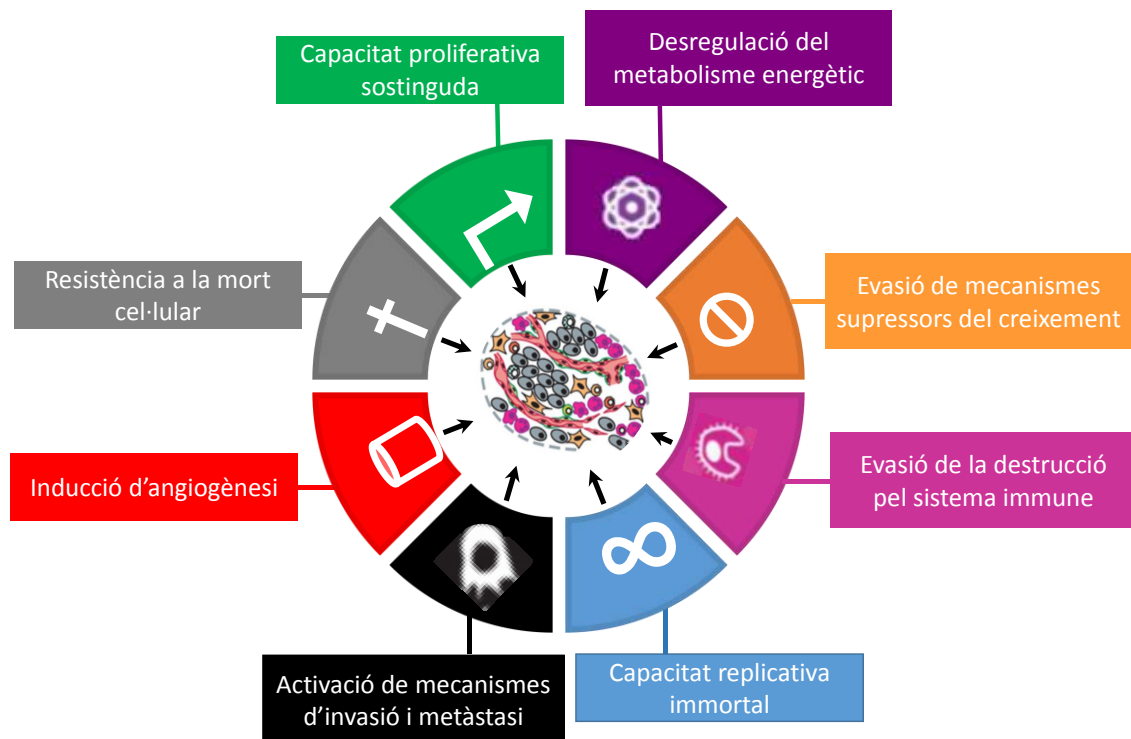


Figura 4: Capacitats adquirides de les cèl·lules tumorals, també anomenades *Hallmarks of cancer*, proposades per Douglas Hanahan i Robert A. Weinberg l'any 2000²¹ i actualitzades l'any 2011 amb dues capacitats noves identificades (la desregulació del metabolisme energètic i l'evasió de la destrucció pel sistema immune²²).

Específicament en el CHC, es coneixen diferents cascades de senyalització, tant en el teixit cirròtic com en el CHC, que s'han vist implicades en l'hepatocarcinogènesi humana: la via de Wnt/ β -catenina i via de Hedgehog s'han vist implicades en el desenvolupament i diferenciació cel·lular; la via de ras i PI3K/Akt/mTOR així com la del *epidermal growth factor*, *insulin-like growth factor* i *hepatocyte growth factor* s'han vist implicades en la proliferació cel·lular depenent del receptor de la tirosina quinasa^{16,23,24}. Igualment la cascada de la neoangiogènesi s'ha vist que té un paper molt important en la formació i progressió del CHC dirigida per les proteïnes *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factors* (FGFs), *angiopoietine* (Ang) i *platelet derived growth factor*

(PDGF), ja que el CHC és típicament un tumor hipervascularitzat i la formació de nous vasos assegura l'adequada aportació de nutrients i oxigen^{25,26}.

1.1.2 Detecció precoç: programa de vigilància del pacient cirròtic

Degut a que la majoria de CHC apareixen en un fetge cirròtic, i que en aquests pacients el CHC és la principal causa de mort⁵, es recomana fer un programa de cribratge per tal de diagnosticar el tumor en un estadi inicial que permeti aplicar un tractament curatiu que disminueixi la mortalitat. Aquest programa és cost efectiu quan la incidència acumulada del CHC supera el 1.5%²⁷, com ocorre en el nostre medi. Per tant, són tributaris a entrar en programa de cribratge els pacients amb una cirrosi establerta, independentment de l'etiologia. En el cas de la infecció per VHB, com que aquest virus té una capacitat oncogènica superior i directa sobre el fetge i la incidència del CHC en països endèmics és elevada en edats precoces, es recomana el seguiment d'aquests pacients portadors crònics tot i no tenir una cirrosi, segons les últimes guies de pràctica clínica⁸ (Taula 1).

Taula 1. Pacients tributaris a entrar en el programa de cribratge de CHC

1.	Pacients cirròtics, Child-Pugh A i B
2.	Pacients cirròtics, Child-Pugh C en llista de trasplantament
3.	Pacients portadors VHB, no cirròtics, amb hepatitis activa o història familiar de CHC*
4.	Pacients amb hepatitis crònica VHC no cirròtics amb malaltia avançada estadi 3 de fibrosi

* Procedents del Sud-est Asiàtic i l'Àfrica Subsahariana

L'interval recomanat pel cribratge és de sis mesos ja que s'estima que el temps necessari per doblar el volum tumoral és de 2-4 mesos²⁸. Actualment l'ecografia abdominal és l'eina utilitzada per fer aquest cribratge^{8,29}. La sensibilitat d'aquesta prova es situa entre el 60% i el 80%, amb una especificitat del 90%³⁰. Aquesta és una tècnica operador dependent i cal que sigui feta en mans expertes donat que el fetge cirròtic és un fetge nodular on és difícil diferenciar els nòduls de regeneració propis de la cirrosi dels nòduls tumorals³¹. La tomografia computeritzada (TC) i la ressonància magnètica (RM) no han estat validades com a tests de cribratge pel seu elevat cost, poca accessibilitat i radiació, excepte en els casos on l'ecografia no és útil, com en el cas de pacients obesos o amb fetges molt nodulars.

A nivell sanguini s'han proposat varis biomarcadors diagnòstic de CHC, però cap d'ells ha estat acceptat a les guies clíniques com a test serològic de detecció del CHC en un estadi inicial. La taula 2 resumeix els biomarcadors plasmàtics proposats per la detecció del CHC més àmpliament estudiats. Com es pot comprovar en els diferents estudis, existeix una heterogeneïtat en termes de sistema de classificació del CHC que no permet comparar els resultats. En aquest sentit, quan l'objectiu és la cerca d'un biomarcador de diagnòstic precoç, és molt important classificar i establir correctament els CHC en estadi inicial. Per altra banda, es pot observar com es donen diferents nivells de concentració del biomarcador com a punts de tall per establir la capacitat diagnòstica, fet que dificulta la comparació entre estudis.

En general es pot comprovar com els valors de sensibilitat i especificitat entre els diferents biomarcadors i estudis no han obtingut resultats satisfactoris. I dels marcadors amb resultats més prometedors, com *Dickkopf-1* i *Midkine* encara falten validacions en poblacions més extenses i representatives de la població com pacients amb diferents etiologies (VHB, VHC, alcohol o esteatohepatitis no alcohòlica), de manera prospectiva, aleatoritzada i controlada, i per grups de recerca independents per poder-los introduir en la pràctica clínica habitual.

Per tant, en aquest sentit, hi ha una necessitat a validar els biomarcadors més prometedors, així com identificar nous biomarcadors serològics amb l'objectiu d'oferir eines per al diagnòstic precoç que complementin l'ecografia abdominal durant la vigilància i seguiment dels pacients amb risc de presentar un CHC.

Taula 2: Biomarcadors plasmàtics diagnòstic de CHC descrits a la literatura

Marcador	Nombre d'individus de la població estudiada						Criteri CHC inicial	Valor Detecció	S (%)	CHC inicial S (%)	E (%)	CHC inicial E (%)	Autor i any publicació
	Sa (n=)	HC (n=)	Cirrosi (n=)	CHC (n=)	CHC inicial (%)	Altres tumors							
AFP	-	-	170	170	13.5	-	Únics <3cm	20ng/mL 200ng/mL	60 22.4	-	91 99.4	-	Trevisani et al. 2001 ³²
	-	-	-	1158	19.2	-	<2cm	20ng/mL	53.5%	-	-	-	Farinati et al. 2006 ³³
	-	-	417	419	49.6	-	BCLC 0/A	10.9ng/mL 20ng/mL	66 59	53	81 90	90	Marrero et al. 2009 ³⁴
AFP-L3	-	-	298	78	-	-	-	10% de l'AFP total	36.5	-	91.6	-	Sterling et al. 2007 ³⁵
			417	419	49.6	-	BCLC 0/A	10% del' AFP total	42	28	97	97	Marrero et al. 2009 ³⁴
hs-AFP-L3	-	-	396	270	49.5	-	<20mm	5% **	42	-	85	-	Toyoda et al. 2011 ³⁶
DCP	48	51	53	55	30.9	-	TNM I	125 mAU/mL	89	-	95	-	Marrero et al. 2003 ³⁷
	-	-	348	1361	61.3	-	< 3cm	40 mAU/mL 100 mAU/mL	58 44	41 22	97 100	-	Nakamura et al. 2006 ³⁸
	-	-	417	419	49.6	-	BCLC 0/A	150 mAU/mL	74	61	70	70	Marrero et al. 2009 ³⁴
DKK1	-	50	50	100	50	-	TNM I-II	1,209 ng/ml	30.43	-	100	-	Tung et al. 2011 ³⁹
	312	171	168	633	55.3	-	BCLC 0/A	2,153 ng/mL	69-71	71-74	87-91	87-91	Shen et al. 2012 ⁴⁰
GP73	56	-	152	144	33.3	-	TNM I-II	10 UR	69	62	75	88	Marrero et al. 2005 ⁴¹
	1690	337	512	789	4.7	889	<3cm	8.5 UR	74.6	-	97.4	-	Mao et al. 2010 ⁴²
	61	32	80	84	76.2	-	BCLC 0/A	13.5 UR	82	64	80	85	Wang et al. 2014 ⁴³
MDK	210	-	129	252	46.0	116	BCLC 0/A	0.654 ng/mL	87	80-87	84	90	Zhu WW et al. 2013 ⁴⁴

AFP: Alfa- Fetoproteïna; AFP-L3: *Lens culinaris agglutin-reactive AFP*; BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*; CHC: Carcinoma Hepatocel·lular; DCP: *Des gammacarboxy prothombin*; DKK1: *Dickkopf-1*; E: especificitat; GP73: *Golgi Protein-73*; HC: Hepatitis crònica; hs-AFP-L3: *highly sensitive AFP-L3*; MDK: *Midkine*; n: nombre total de casos; S: sensibilitat; UR: Unitats Relatives

A continuació es descriuen els biomarcadors serològics de CHC més estudiats fins al moment actual.

➤ **L'alfa fetoproteïna (AFP)**, glicoproteïna específica produïda principalment pel fetge fetal, ha sigut el marcador serològic clàssicament utilitzat pel diagnòstic del CHC. Però les darreres revisions han demostrat les limitacions de l'AFP com a biomarcador diagnòstic de CHC amb una sensibilitat i especificitat que varien significativament des del 40% -65% i del 76% -96%, respectivament⁴⁵. S'han estudiat diverses concentracions de l'AFP com a punts de tall per establir els valors de sensibilitat i especificitat diagnòstics de l'AFP, però no s'ha aconseguit superar una sensibilitat del 65%³⁴. Nivells >200-400 ng/mL proporcionen una alta sensibilitat, però molt poca especificitat, no acceptable per un marcador oncològic³².

Així mateix s'ha explorat el benefici addicional de l'AFP juntament a l'ecografia abdominal bianual per la detecció precoç del CHC, no objectivant una milloria de la sensibilitat diagnòstica³⁰.

Aquesta baixa sensibilitat es deu a la correlació dels nivells d'AFP plasmàtica amb la mida tumoral, fet que comporta que més del 50% dels CHC petits no presenten concentracions elevades d'AFP. Així doncs la seva utilitat es limita al diagnòstic de tumors en estats avançats quan ja no és necessari l'ús d'un biomarcador⁴⁶. La falta d'especificitat ve determinada per l'increment dels nivells d'AFP en pacients amb inflamació crònica hepàtica sense CHC, normalment deguda a virus hepàtics C i B, per la simple regeneració hepàtica^{47,48}. A més, els nivells plasmàtics d'AFP s'han trobat augmentats en presència d'altres càncers com del colangiocarcinoma⁴⁹ o diferents càncers gàstrics⁵⁰. Per aquestes limitacions, les principals guies clíniques desaconsellen el seu ús com a eina de cribratge i diagnòstic^{8,29}.

➤ ***Lens culinaris agglutinin-reactive AFP (AFP-L3)***, una isoforma glicosilada de l'AFP, s'ha proposat com un altre marcador per al diagnòstic de CHC. S'ha establert com a llindar un valor superior al 10% de la proporció AFP-L3 sobre AFP per al diagnòstic de CHC. Diferents estudis fase II-III han establert la sensibilitat i especificitat d'aquest marcador, però cap d'ells ha superat la capacitat diagnòstica de l'AFP per la identificació del CHC precoç^{34,35,51}. La limitació que presenta aquest marcador és que requereix unes concentracions elevades d'AFP plasmàtica, i aquesta no es troba elevada en tots els CHC. La introducció del mètode d'alta sensibilitat (*highly sensitive AFP-L3, hs-AFP-L3*)

soluciona aquesta limitació podent-lo mesurar en pacients amb concentracions d'AFP menors a 20ng/mL³⁶. No obstant, les conclusions són que l'AFP-L3 és un marcador de malaltia avançada, com invasió vena porta o patologia indiferenciada⁵².

➤ **Des gammacarboxy prothombin (DCP)** o també anomenada *prothombin induced by vitamin K absence II (PIVKA II)*. Aquesta és una protombina anòmala generada com a resultat d'un defecte de carboxilació postraduccional en la cèl·lula tumoral. Molts estudis fase II han avaluat la capacitat diagnòstica del marcador en front AFP convencional^{34,37,38,53}, observant bons resultats diagnòstics amb una sensibilitat i especificitat que varia del 28%-89% i 87%-96%, respectivament (punt de tall de 40 mAU/mL). S'ha observat que els nivells de DCP es correlacionen amb la mida tumoral i la invasió vascular, per tant no és un bon marcador per detectar CHC en fases inicials⁵⁴. El grup de Marrero et al. va obtenir una sensibilitat diagnòstica del 89% i una especificitat del 95% amb un punt de tall més elevat de 125 mAU/mL³⁷. No obstant això, un recent meta-anàlisi no ha mostrat millors resultats de DCP en front de l'AFP⁴⁵. Per tant, es necessiten més estudis que avaluïn la capacitat diagnòstica de DCP pel CHC.

➤ **Golgi Protein-73 (GP73)**. Aquesta és una glicoproteïna transmembrana normalment expressada en les cèl·lules epitelials. Diferents estudis han demostrat la seva capacitat diagnòstica de CHC amb una sensibilitat del 69-82% i una especificitat del 80-97%, disminuint la sensibilitat a un 62% en la detecció de CHC petits⁴¹⁻⁴³. A més, Mao et al. van concloure que l'elevació de GP73 està relacionada amb la recidiva tumoral, sent un potencial marcador de seguiment⁴². Recentment, tres revisions sistemàtiques han analitzat el paper de GP73 en CHC⁵⁵⁻⁵⁷. Els resultats han demostrat que GP73 podria ser un bon biomarcador diagnòstic i pronòstic de CHC i la capacitat per monitoritzar la progressió de la malaltia. Tot i així, han posat de manifest les múltiples limitacions metodològiques, en termes per exemple de selecció i definició de pacients, i l'àmplia heterogeneïtat dels resultats, alguns d'ells oposats, que limiten la seva validesa.

➤ **Dickkopf-1 (DKK1)** és una proteïna de secreció inhibidora de la via de senyalització de Wnt/ β -caterina que juga un rol en el control de la proliferació i supervivència cel·lular⁵⁸. El seu potencial com a biomarcador de malaltia avançada s'ha estudiat en altres càncers com el de pròstata o melanoma, objectivant una reducció dels nivells plasmàtics i tissulars respectivament^{59,60}.

En CHC, es va avaluar la capacitat diagnòstica de DKK-1 en una àmplia cohort xinesa de 1284 pacients, observant una alta sensibilitat (70%) per detectar tumors molt inicials, inclús en pacients amb nivells d'AFP normals⁴⁰. Tot i això, amb uns valors d'especificitat no acceptables en termes d'oncologia (10-15% falsos negatius)⁶¹.

➤ **Midkine (MDK)** és un factor de creixement unit a l'heparina, relacionat amb la proliferació, migració, resistència a l'apoptosi, transformació i angiogènesi de molts tumors sòlids, incloent CHC⁶². El grup de Zhu WW et al. va estudiar-lo en més de 900 participants en tres cohorts independents, obtenint resultats prometedors com a biomarcador de diagnòstic precoç de CHC⁴⁴. En aquest estudi, es va observar una millor sensibilitat de MDK vers AFP per detectar tumors en estadis precoços (80% vs 40%), mantenint una especificitat semblant (83,9% vs 86,3%).

Per tant, a dia d'avui, no està recomanat cap marcador serològic com a eina de vigilància que complementi l'ecografia abdominal ni eina diagnòstica per tal de discriminar CHC d'altres tumors hepàtics⁸. És per aquest motiu que és de vital importància promoure i intensificar l'estudi en la cerca de nous biomarcadors diagnòstic de CHC capaços d'identificar el tumor en una fase inicial, quan realment es pot oferir un tractament curatiu i millorar la supervivència dels pacients.

1.1.3 Diagnòstic radiològic i anatomopatològic del CHC

A manca de biomarcadors sanguinis, el diagnòstic actual del CHC es realitza amb tècniques d'imatge i si aquestes no són concloents, es recomana una biòpsia per poder obtenir el diagnòstic patològic. Així, quan es detecta un nòdul en un pacient amb cirrosi, l'actitud que s'ha de seguir dependrà de la mida de la lesió, tal com es resumeix a la figura 5²⁹. Si el nòdul és inferior a 1 cm, caldrà fer un seguiment cada 3-4 mesos, ja que les eines de les que es disposa actualment no permeten arribar a un diagnòstic i en un 50% del casos no serà un CHC i desapareixerà en el seguiment. Si el nòdul és més gran d'1 cm s'haurà d'establir el diagnòstic de CHC, si és possible inicialment amb tècniques d'imatge no invasives i en cas que no es pugui arribar el diagnòstic per citohistologia mitjançant biòpsia hepàtica. Aquests criteris no invasius es basen en un patró vascular característic de CHC. Aquest patró consisteix en la presència d'hipervascularització en

fase arterial i amb un rentat en fase venosa en les proves radiològiques dinàmiques^{29,63}(Figura 6). Ara bé, només es podrà establir el diagnòstic de CHC per criteris radiològics en cas de tractar-se d'un fetge cirròtic, en cas contrari serà necessària una biòpsia.

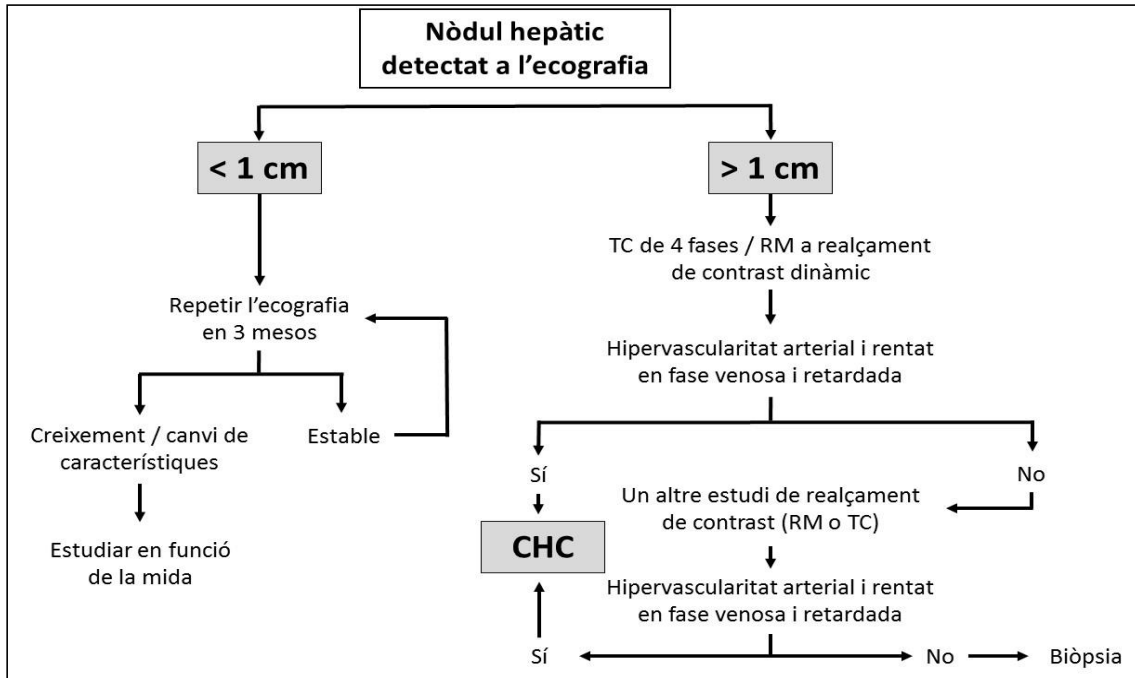


Figura 5. Algoritme diagnòstic dels nòduls identificats per ecografia abdominal durant el programa de cribatge de CHC en pacients de risc. (Adaptació de Bruix, et.al.²⁹). CHC: Carcinoma Hepatocel·lular; TC: Tomografia Computeritzada; RM: Resonància Magnètica.

Les proves d'imatge radiològiques dinàmiques recomanades per fer aquest diagnòstic són la RM o la TC. Els criteris radiològics han estat validats en aquestes dues tècniques per nòduls > 1cm mostrant una especificitat i un valor predictiu positiu de quasi 100%⁶⁵. Malgrat tot, fins una tercera part de CHC no es poden diagnosticar mitjançant criteris no invasius i caldrà fer una biòpsia (citologia o histologia)^{8,66}. L'ecografia amb contrast no es recomana utilitzar pel nombre de falsos positius en pacients amb colangiocarcinoma⁶⁷. L'arteriografia no està justificada al tractar-se d'una prova invasiva i que no aporta informació addicional a la TC i la RM. Les imatges per PET (*Positron Emission Tomography*) no són útils per la detecció de tumors inicials⁸.

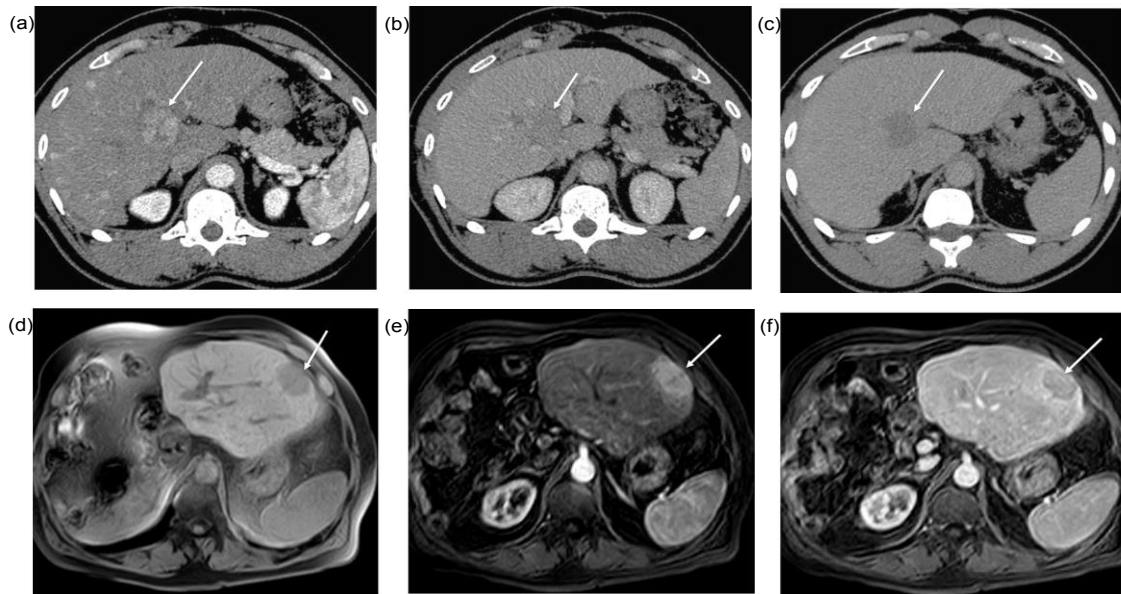


Figura 6: Patró de captació típic del CHC. a-c) TC amb contrast d'un CHC en un home de 62 anys afecte d'una cirrosi VHC. La fletxa blanca (a) mostra la captació precoç arterial, seguit d'un rentat en fase venosa (b) i en fase tardana d'equilibri amb el nòdul hipodens respecte el parènquima hepàtic (c). (d-f) RM d'un CHC en un home de 58 anys afecte d'una cirrosi causada pel consum d'alcohol. Detecció del CHC durant el seguiment després d'una hepatectomia dreta. Les imatges sense contrast en fase T1 mostren una lesió subcapsular hipotensa (fletxa d). Després de la injecció extracel·lular del quelat de gadolini, la lesió mostra la típica hipercaptació en fase arterial (fletxa a e) i rentat en fase venosa portal (f) (Imatges procedents de Ronot M et al.)⁶⁴.

En cas que no es pugui establir el diagnòstic del nòdul a partir de les proves d'imatge és necessària realitzar una biòpsia del nòdul. Ara bé, aquest és un procediment invasiu i per tant no està exempta de complicacions, destacant les més greus però també més infreqüents l'hemoperitoni, l'hematoma intrahepàtic i l'hemobilia. Per minimitzar el risc, la biòpsia l'ha de realitzar per personal expert, però tot això la mobilitat de la punció és del 3.1/1000 puncions i mortalitat del 0.3/1000 puncions⁶⁸. La biòpsia del nòdul també pot presentar fins un 40% de falsos negatius sobretot en els tumors de mida petita (1-2 cm) ja que en nòduls petits el patró anatomopatològic pot ser difícil de diferenciar entre nòduls displàsics i CHC, perquè les característiques típiques del CHC com és la invasió estromal poden no ser-hi o no detectar-se². De la mateixa manera, la detecció de artèries aberrants i mitosi poden no identificar-se en una mostra de biòpsia. La biòpsia hepàtica per Tru-cut és definitivament superior a l'aspiració amb agulla fina, ja que la mostra obtinguda permet avaluar tant l'arquitectura com característiques citològiques². Per tant, una biòpsia negativa no exclou el diagnòstic i s'ha de valorar la

repetició de la mateixa. En el cas que no s'arribi a establir el diagnòstic caldrà un seguiment del nòdul cada tres o quatre mesos^{67,69}.

El diagnòstic anatomopatològic del CHC es basa en les definicions del Grup de Consens Internacional per CHC⁷⁰. El CHC té un patró histològic molt característic en els estadis avançats, però la distinció entre un CHC molt inicial i un nòdul displàsic d'alt grau pot presentar dificultat, especialment en nòduls petits d'entre 1 i 2 cm². El CHC que apareix en un fetge cirròtics està presidit majoritàriament per lesions no malignes precanceroses com els nòduls displàsic de baix i alt grau (NDBG i NDAG respectivament). Ara bé, el risc de transformació maligne dels NDBG és molt baix, i entre el 40-60% desapareixen durant el seguiment⁷¹. En canvi, els NDAG tenen un risc molt elevat de transformació maligne, amb una taxa acumulativa del 61.5% als 3 anys de seguiment⁷². En els CHC presidits per lesions premalignes, apareixen lesions microscòpiques de menys d'1cm compostes per hepatòcits displàsics, les quals s'anomenen focus displàsics caracteritzats per la presència de petits i grans canvis cel·lulars⁷³. En el moment que aquests canvis es poden distingir del parènquima hepàtic, normalment com a lesions nòduls majors d'1cm es parla de nòduls displàsics els quals poden ser de baix grau o alt grau en funció de moderada o elevada presència d'atípia, respectivament.

L'evidència que els nòduls displàsic són lesions premalignes es sosté amb l'evolució natural de transformació maligne estudiada en cohorts independents^{72,74,70}; les similituds en els canvis genètics i epigenètics entre les dues entitats (nòduls displàsics i CHC)^{75,76}; i la presència d'escurçament de telomerasas i l'augment d'inestabilitat cromosòmics en els nòduls displàsics, sobretot en NDAG, canvis característics evidenciats en CHC⁷⁷.

Les característiques histològiques d'un CHC molt ben diferenciat són: augment de la densitat cel·lular més del doble de vegades amb un augment de la proporció nucli/citoplasma amb patró trabecular irregular; tractes portals dins del nòdul; patró pseudoglandular; canvi gras difús (40%); artèries aberrants; invasió estromal, és a dir invasió d'hepatòcits tumorals dels tractes portals, canvis que s'intensifiquen a mesura que es desdiferencia el CHC². Aquests canvis morfològics des de lesions premalignes a malignes expliquen el comportament radiològic (Figura 7)⁷⁰.





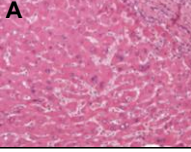
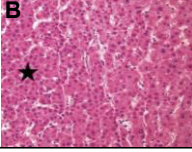
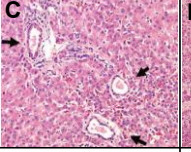
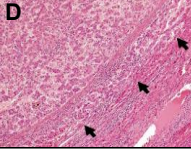


	Nòdul displàsic baix grau	Nòdul displàsic d'alt grau	CHC ben diferenciat	CHC moderadament diferenciat
				
				
Característiques patològiques: Aparença macroscòpica Invasió estroma	(-)	(-)	Vaga-nodular + / -	Definida-nodular + / -
Captació contrast radiològic: Infusió arterial Infusió venosa portal	iso / hipo +	iso / hipo +	iso / hipo (hiper) +	hiper -
Relació clínico-patològica	Lesions premalignes		CHC inicial	CHC en progressió

Figura 7. Correlacions anatomopatològiques i radiològiques dels nòduls displàsics i CHC. Els dibuixos de la fila superior mostren els canvis anatòmics presents en l'evolució a CHC maligne. El fet que les cèl·lules tumorals creixin substituint els cordons cel·lulars hepàtics i reemplacin el patró límit, l'aparença dels CHC inicials és vagament nodular. Quan el tumors mesuren entre 1.5 i 2 cm de diàmetre, tendeixen a desdiferenciar-se convertint-se en moderadament diferenciat i creixent d'una manera expansiva formant una càpsula fibrosa. La hipervascularitat de la senyal de contrast en les proves d'imatge està relacionada amb el desenvolupament de les artèries aberrants i l'absència de subministrament de la vena porta. (A) **Nòdul displàsic de baix grau**: focus ocasionals de canvis cel·lulars. (B) **Nòdul displàsic d'alt grau**: increment de la densitat cel·lular, irregularitat del patró trabecular, poques pseudoglàndules, cèl·lules més petites sobretot a la part esquerre de la imatge (estrella). (C) **CHC petit, ben diferenciat**. Desenvolupament d'artèries aberrants (fletxes). (D) **CHC en progressió moderadament diferenciat** amb invasió de la càpsula (fletxes).  Artèria aberrant;  Tracte portal intratumoral. Tinció d'immunohistoquímica hematoxilina-eosina, magnificació original (x200). (Adaptació de Kojiro et al.⁷⁰ i les imatges histològiques (A i B) de Rocalli et al.⁷¹ i (C-D) de Park et al.⁷³.

En els casos en els quals el patró histològic no és característic, la genètica i la immunohistoquímica poden ajudar a establir el diagnòstic de CHC i diferenciar-lo d'altres tipus de nòduls. En el primer cas, s'han identificat signatures genètiques capaces de discriminar entre nòduls de regeneració i displàsics de CHC petits (<2cm)^{78,79,80,81}. Per exemple, Llovet et al. va identificar una signatura de 3 gens (Glypican 3, Survivin, LYVE1) per reacció en cadena de la polimerasa en temps real (*quantitative polymerase chain reaction, qPCR*) al comparar mostres de teixit de 17 nòduls displàsics i 20 CHC inicials⁷⁸. La signatura aconseguia una sensibilitat i especificitat del 95% i 94%, respectivament per discriminar lesions preneoplàsiques de

CHC⁷⁸. Així mateix Nam et al. va identificar una signatura de 240 gens diferencials entre nòduls hepàtics (7 NDBG, 7 NDAG i 27n CHC) a partir de la tècnica oligo-nucleòtid microarrays⁸⁰.

A nivell d'immunohistoquímica, una tècnica senzilla i econòmica, també s'han proposat varis marcadors. La combinació dels marcadors *Glypican 3* (GPC-3), *heat shock protein 70* (HSP70) i *glutamine syntetase* (GS) ha demostrat una sensibilitat diagnòstica de CHC del 72% i una especificitat del 100% quan 2 d'ells són positius^{82,83,84}. L'AFP no és un bon marcador tissular per la seva baixa sensibilitat (25%-30%) inclús en CHC moderadament diferenciats. La combinació d'AFP, AFP-L3 i DCP a nivell tissular també ha demostrat superioritat diagnòstica en front cada marcador individualment (sensibilitat de 86% amb la combinació dels tres marcadors)⁸⁵. A més, l'AFP-L3 i la DCP s'han vist relacionades a nivell histològic amb la malaltia disseminada, sent marcadors útils pel pronòstic^{86,85}. Hi ha altres tincions per avaluar neovascularització com el CD34^{2,87} o per avaluar les cèl·lules progenitores com CK19 la presència de les quals es relaciona amb major taxa de recidiva i per tant pitjor pronòstic⁸⁸.

A banda, el perfil d'expressió genètica del teixit hepàtic no tumoral adjacent al CHC també s'ha relacionat amb la supervivència⁸⁹.

Establir l'extensió tumoral és fonamental per definir l'estiatge i plantejar l'estratègia de tractament. L'afectació extrahepàtica i la presència d'adenopaties es detecten amb TC o RM, i la gammagrafia es pot utilitzar per avaluar la presència de metàstasis òssies. L'avaluació pretrasplantament ha d'incloure una prova dinàmica abdominal (TC o RM) TC toràcica i una gammagrafia òssia⁸.

1.1.4 Classificació i tractament del CHC: Estadiatge BCLC i implicacions pronòstiques

Com s'ha dit anteriorment, el 90% dels CHCs apareixen en un fetge cirròtic i aquesta coexistència de dues malalties que comprometen la supervivència és la característica que distingeix el CHC dels altres tumors sòlids. Per altra banda, la qualitat de vida del pacient en el moment del diagnòstic també s'ha de tenir en compte, ja que marcarà el pronòstic. Per tant, el sistema de classificació ideal ha de tenir en compte paràmetres de funció hepàtica, qualitat de vida i característiques tumorals (Taula 3).

Existeixen múltiples sistemes de classificació tumoral però no tots inclouen aquests paràmetres. Entre ells els més estudiats són tres europeus GETCH (*Groupe d'étude et de Traitement du Carcinoma Hepatocellulaire*)⁹⁰, CLIP (*The Cancer of the Liver Italian Program*)⁹¹ i BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*)⁹² i dos asiàtics JIS (*Japan Integrated Staging Score*)⁹³ i CUPI (*Chinese University Prognostic Index*)⁹⁴. Només el sistema de classificació BCLC creat l'any 1999 pel grup del Dr Bruix de Barcelona, té en compte els tres paràmetres (funció hepàtica, qualitat de vida i característiques tumorals) i els ha relacionat amb una indicació de tractament. Aquesta classificació ha estat validada tant a Europa, Estats Units i Àsia, sent la classificació recomanada actualment per les guies de pràctica clínica europea i americana (nivell d'evidència 2A)^{92,95}.

Taula 3. Paràmetres clínics i tumorals			
Classificació Child-Pugh de funció hepàtica⁹⁶			
Paràmetres	1 punt	2 punts	3 punts
Bilirubina total	<34 umol/L <2 mg/dL	34-50 umol/L 2-3 mg/dL	>50 umol/L >3 mg/dL
Albúmina sèrica	>3.5 g/L	2.8-3.5 g/L	<2.8 g/L
INR	<1.7	1.7-2.3	>2.3
Temps protombina	>50%	30-50%	<30%
Ascites	Absent	Lleu	Moderada-greu (Refractària)
Encefalopatia hepàtica	Absent	Grau I-II	Grau III-IV
Puntuació i classificació: 5-6 punts Classe A; 7-9 punts Classe B; 10-15 punts Classe C			
Classificació Karnofsky (Performance Status Test)⁹⁷			
0	No evidència clínica de malaltia. Treballa a diari normal		
1	Simptomàtic. Treballa a diari normal		
2	No treballa però autònom. Enllitat<50% hores diürnes		
3	Atenció mèdica freqüent. Enllitat>50% hores diürnes		
4	Incapacitat. Enllitament total		
Paràmetres tumorals i d'extensió			
Nombre nòduls			
Mida nodular			
Extensió intrahepàtica (uni/multi segmentaris; uni/bilobars)			
Extensió extrahepàtica (nòduls limfàtics hili portal, trombosi portal, metàstasis extrahepàtiques)			

El sistema de classificació de BCLC divideix els pacients amb CHC en 5 estadis (0, A, B, C i D) en funció dels principals factors pronòstic: 1) l'estat del tumor (mida i nombre de nòduls, presència d'invasió vascular i disseminació extrahepàtica), 2) la funció hepàtica definida per la classificació de Child-Pugh i 3) l'estat general de salut definit per la classificació de Karnofsky (*Performance Status Test*) segons la presència de símptomes (Figura 6).

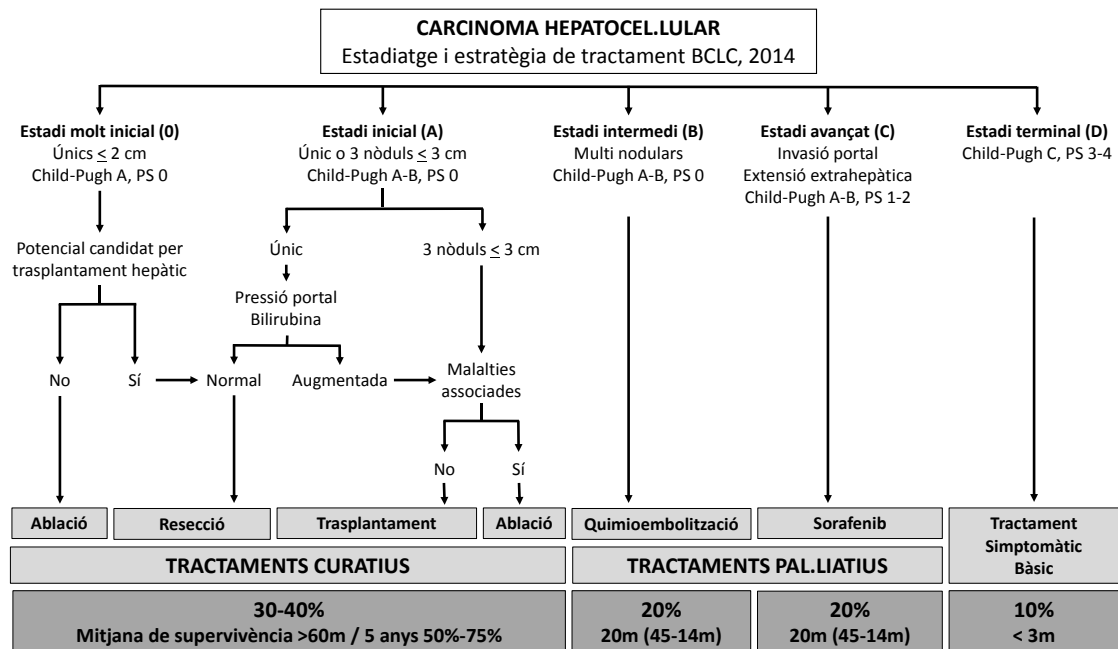


Figura 8. Estratègia de tractament del BCLC en funció de la classificació dels pacients amb CHC en funció de les característiques tumorals, clíniques i funció hepatocel·lular. Per cada subgrup s'especifica la primera opció de tractament en funció del pronòstic, el percentatge de pacients diagnosticats a cada estadi i la mitjana (rang) de supervivència expressada en mesos (m). BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*; PS: *Performance Status* (Adaptació de Forner et al.)⁹⁵

A continuació es detallen els diferents estadis tumorals del sistema BCLC:

➤ **Estadi molt inicial i inicial (BCLC 0/A)** inclou aquells pacients amb un CHC únic menor de 2 cm (BCLC 0) o un CHC únic major de 2 cm o 3 nòduls menors de 3 cm de diàmetre (BCLC A), amb una funció hepàtica conservada (Child-Pugh A/B) i asimptomàtics amb bona qualitat de vida (PS-0)⁸. Només un 5-10% dels tumors es diagnostiquen en un estadi BCLC 0 degut a la falta d'implementació universal del programa de cribratge de pacients cirròtics, les limitacions de les proves d'imatge i la manca de marcadors serològics amb capacitat diagnòstica de tumors petits⁹⁸. Aquest percentatge augmenta fins al 30% al Japó gràcies a una implementació extensa del sistema de cribratge⁹⁹. Fins a un 60-80% dels pacients es diagnostiquen en l'estadi BCLC

A, però només la meitat d'ells es pot beneficiar d'un tractament radical o curatiu (resecció quirúrgica, trasplantament hepàtic o tractament percutani). A nivell espanyol, es va publicar un estudi descriptiu dels CHC registrats l'any 2010 actualitzat l'any 2014, objectivant-se que només un 47% dels pacients amb CHC es diagnosticaven a través de programes de cribratge, resultats equiparables amb sèries americanes^{100,101}. Així, els pacients diagnosticats en programes de cribratge tenien una mida tumoral i nombre de nòduls significativament inferior als pacients que es diagnosticaven fora de cribratge.

Dins dels CHC BCLC 0 es poden distingir dos subgrups segons estudi anatomopatològic: el vagament nodular (molt ben diferenciat amb marges imprecisos i sense invasió vascular ni satèl·lits), anomenat *in situ* i el marcadament nodular amb signes d'invasió local mostrant en un 10% dels casos satèl·lits i en un 27% invasió portal microscòpica². Tant la invasió microvascular i la satel·litosi, relacionades amb la disseminació tumoral² com una mala diferenciació histològica i la multinodularitat, s'han identificat com a factors de risc per la recidiva després d'un tractament curatiu^{102,103}. Malauradament no existeixen marcadors serològics que puguin predir la presència d'aquests factors de risc al moment de l'estiatge del pacient, de manera que tant la invasió microvascular com la satel·litosi tant sols es poden identificar a la peça quirúrgica.

La mediana de supervivència als 5 anys dels pacients amb tumors BCLC 0 i A, aplicant tractaments curatius, es troba entre el 80%-90% i 50%-75% respectivament^{98,104-106}. La resecció quirúrgica tumoral constitueix el primer esglaió de tractament en aquest grup de pacients. Els millors resultats amb aquest tractament s'aconsegueixen en tumors únics de qualsevol mida i en absència tant de bilirubina elevada com d'hipertensió portal clínicament significativa (definida com un gradient de pressió venosa hepàtica portal ≥ 10 mmHg, la presència de varices esofàgiques o esplenomegàlia i un recompte plaquetari < 100.000 mm), factors independents de supervivència¹⁰⁷⁻¹⁰⁸. La supervivència final és del 75% als 5 anys^{102,105}, però amb una taxa de recidiva després de la resecció quirúrgica del 70%-80% als 5 anys i el 60% abans dels 2 anys (recidiva precoç)¹⁰³. Aquesta elevada taxa de recidiva tumoral ve determinada per la presència dels factors de risc de recidiva (invasió microvascular, satel·litosi, multinodularitat i diferenciació histològica pobre) que només es poden identificar a la peça quirúrgica. Actualment no existeix cap tractament per disminuir la recidiva tumoral en pacients

tractats mitjançant resecció quirúrgica, per això en alguns centres si es detecta algun d'aquests factors de mal pronòstic s'indica trasplantament hepàtica abans de detectar la recidiva tumoral^{109,110}. Ara bé, si els pacients amb CHC < 2 cm que serien inicialment tributaris a resecció quirúrgica però no podran ser candidats a rebre trasplantament hepàtic posterior tot i identificar factors de risc de recidiva tumoral a la peça quirúrgica, bé sigui per comorbiditats o edat superior als 68 anys, l'estratègia terapèutica recomanada recentment és l'ablació percutània. Aquest tractament assoleix les mateixes taxes de resposta i supervivència que la resecció quirúrgica en aquest tipus de pacients però amb menys complicacions^{95,111}.

En el cas de pacients amb tumors no resecables per la presència d'hipertensió portal significativa o bé de tumors multinodulars, el següent tractament a avaluar és el trasplantament de fetge. Un dels avantatges d'aquest tractament és que a part d'eliminar la malaltia tumoral, elimina també la cirrosi, causa oncològica subjacent. Seguint els criteris de Milà descrits per Mazzafero (tumor solitari ≤ 5 cm o 3 nòduls de ≤ 3 cm, sense presència d'invasió vascular ni disseminació extrahepàtica)¹¹² s'aconsegueixen unes taxes de supervivència als 5 anys del 70% amb un risc de recidiva tumoral baix del 5-15%^{102,113}.

Als pacients que no se'ls pot oferir el trasplantament hepàtic i presenten un tumor entre 2-5 cm, l'alternativa com a tractament curatiu és l'ablació percutània, bé sigui per injecció d'etanol o per radiofreqüència (RF). Diferents estudis controlats aleatoritzats han demostrat la superioritat de la RF versus l'alcoholització tant en taxes de resposta com en taxes de supervivència en tumors més grans de 2 cm^{114,115,116}. La RF presenta una taxa de recidiva intrahepàtica del 75% als 5 anys i una supervivència global del 60% als 5 anys¹¹⁷. Actualment estan en vies d'experimentació altres modalitats d'ablació percutània com és l'ablació per microones, la crioablació o l'ablació d'alta intensitat focalitzada per ecografia¹¹⁸.

➤ **Estadi intermedi (BCLC B).** Es classifiquen en aquest estadi els pacients amb una funció hepàtica i estat de salut conservat (Child-Pugh A-B, PS-0) i que presenten tumors no resecables sense invasió macrovascular (trombosi portal tumoral) ni extensió extrahepàtica⁸. Per aquests pacients ja no és possible aplicar un tractament curatiu, sent la quimioembolització (TACE, *Transarterial chemoembolization*) el tractament pal·liatiu recomanat. La TACE és una tècnica que consisteix en obstruir de manera selectiva

l'artèria hepàtica que nodreix el tumor amb la conseqüent necrosi tumoral¹¹⁹. Aquesta oclusió arterial convencional es fa amb d'agents quimioteràpics, sent els més utilitzats la doxorubicina, el cisplatí. Un tipus d'embolització més modern és l'embolització amb partícules carregades de l'agent quimioteràpic per tal de disminuir l'efecte sistèmic, el que s'anomena *Drug Eluting Beds* (DEB)^{120,121}. La mitjana de supervivència en els primers estudis amb TACE era al voltant de dos anys¹²². Recentment amb la millora en la selecció dels pacients i la tècniques la mitjana de supervivència assoleix els 4 anys¹²³.

➤ **Estadi avançat (BCLC C).** Aquest grup comprèn els pacients que presenten símptomes relacionats amb la malaltia tumoral (PS 1-2), Child-Pugh A-B i/o invasió macrovascular o disseminació extrahepàtica⁸. Aquests pacients sense tractament tenen una mitjana de supervivència de 6-8 mesos¹²⁴.

En els darrers anys s'han produït molts progressos en el coneixement de les alteracions moleculars del CHC. Aquest fet ha permès desenvolupar nombrosos agents que actuen de forma específica en les vies moleculars alterades. S'han avaluat múltiples tractaments però de tots ells, l'únic agent sistèmic que ha demostrat millorar la supervivència dels pacients ha estat el Sorafenib¹²⁵. En aquest sentit, un estudi clínic controlat i aleatoritzat va descriure les diferències de mitjana de supervivència de 10.7 mesos en el grup control vs 7.9 mesos en el grup placebo HR 0.69 (95%CI: 0.55-0.88) amb un temps fins progressió de 5.5 mesos en el grup Sorafenib vs 2.2 mesos en el grup placebo HR 0.58 (95% CI: 0.45-0.74) sense haver-se demostrat que hi hagués resposta radiològica¹²⁵. El sorafenib és un inhibidor de la tirosina quinasa que inhibeix la proliferació de les cèl·lules tumorals i l'angiogènesi. En concret, s'ha descrit que actua inhibint les quinases Raf-1 i B-Raf i l'activitat tirosina quinasa del receptor del VEGFR i del factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF)¹²⁶.

Pacients amb presència de trombosi portal tumoral, o pacients BCLC B que no són bons candidats a TACE o que no han respòs aquesta per tenir una malaltia voluminosa, una opció que s'està investigant és la radioembolització amb esferes Yttrium-90. Aquesta és una teràpia innovadora que actua irradiant la zona tumoral per via intra-arterial. Tot i l'eficàcia similar a TACE en quan a respostes objectives, no és de primera opció ja que no hi ha estudis controlats que ho demostrin^{127,128}.

➤ **Estadi terminal (BCLC D).** El darrer estadi de classificació comprèn aquells pacients amb una funció hepàtica descompensada i/o greu afectació de l'estat de salut

(Child-Pugh C i PS 3-4), siguin quines siguin les característiques tumorals⁸. En aquest estadi està indicat el tractament simptomàtic, essent la mitjana de supervivència d'aquests pacients no superior als 4 mesos⁹².

1.1.5 Avaluació de la resposta terapèutica

Després d'aplicar qualsevol tractament s'ha d'avaluar la resposta terapèutica. En el cas de la resecció quirúrgica, la recidiva tumoral normalment es divideix en la recidiva precoç que apareix en els primers dos anys després del tractament, i la recidiva tardana després dels dos anys, parlant aleshores de tumors *de novo*¹²⁹. La recidiva precoç normalment es deu a la presència de factors de risc de recidiva anteriorment mencionats (invasió microvascular, satel.litosi, multinodularitat i mala diferenciació histològica)^{102, 103}, mentre que la recidiva tardana depèn majoritàriament de l'efecte de carcinogènesi de la malaltia inflamatòria crònica hepàtica subjacent⁸⁹.

L'avaluació de la resposta dels pacients tractats amb injecció de substàncies citotòxiques tant a nivell percutani com selectiu per TACE es mesura amb els criteris mRECIST (*Modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) resumits a la taula 4¹³⁰. Aquesta modificació dels criteris originals RECIST^{131,132}, es deu al fet que molts tractaments del CHC actuen mitjançant la inducció de necrosi tumoral i aquest fenomen no sempre s'acompanya de la reducció de la mida tumoral. Per tant, els nous criteris tenen en compte la viabilitat del tumor i no la reducció de la mida. Aquesta viabilitat es mesura amb tècniques radiològiques dinàmiques com la TC i la RM, definida com la captació de contrast en fase arterial. Ara bé, els canvis de vascularització que produeixen les noves teràpies orals antiangiogèniques com el Sorafenib, no són avaluables amb aquests criteris¹³³, havent-se definit els BCLC-refined RECIST. Han aparegut altres criteris per avaluar la resposta al tractament que incorporen la necrosi tumoral com el *Choi Response Criteria*¹³⁴ i el *Response Evaluation Criteria in Cancer of the Liver (RECICL)*^{135,136}, cap d'ells validat de forma adequada.

Taula 4: Criteris mRECIST¹³⁰	
Lesió diana	
Resposta completa	Desaparició de qualsevol hipercaptació arterial de les lesions tractades
Resposta parcial	Disminució $\geq 30\%$ de la suma dels diàmetres de tumor viable de les lesions tractades (hipercaptació arterial) respecte la suma inicial dels diàmetres de les lesions
Malaltia estable	Ni progressió ni estabilitat
Progressió tumoral	Augment de $\geq 20\%$ de la suma de diàmetres del tumor viable de les lesions tractades respecte la suma més petita del diàmetre del tumor viable des de l'inici del tractament
Lesió no diana	
Resposta completa	Desaparició de qualsevol hipercaptació arterial de les lesions
Resposta incompleta/parcial	Persistència d'hipercaptació arterial en una o més lesions
Progressió tumoral	Aparició d'una o més lesions noves i/o progressió de les existents
Recomanacions mRECIST	
Vessament pleural/ascites	És necessària la confirmació citopatològica del líquid pleural o ascític per establir la progressió tumoral
Nòduls limfàtics a l'hili portal	Els nòduls limfàtics hiliars es consideren malignes si el diàmetre menor és $> 2\text{cm}$
Trombosi portal	Es considera una lesió no mesurable i per tant és una lesió no diana
Nova lesió	Es considera una nova lesió de CHC si el diàmetre més llarg és $> 1\text{cm}$ amb patró de captació de contrast típic. Si el patró és atípic, es considera CHC si creix $> 1\text{cm}$

1.2 La proteòmica com a eina per a la identificació de biomarcadors

Com ha quedat palès en el capítol anterior, l'elevada mortalitat del CHC es deu principalment al seu diagnòstic tardà (més del 60% dels tumors es diagnostiquen en fases avançades), on ja no és possible aplicar un tractament amb intenció curativa, degut a una disseminació tumoral intra- o extrahepàtica. A més, la falta de marcadors pronòstic, no permet detectar en un estadi inicial els factors de risc de recidiva ni tampoc, una vegada aplicat el tractament, detectar precoçment l'elevada taxa de recidives que presenta aquest tumor, limitant les estratègies de rescat terapèutiques.

Això ha promogut la cerca urgent de marcadors serològics, tissulars i radiològics per tal de millorar el maneig dels pacients cirròtics. És per aquest motiu que en les darreres dècades la comunitat científica centra la investigació en la cerca de nous biomarcadors diagnòstic i pronòstic de CHC.

El biomarcador ideal de CHC hauria de complir les següents característiques: 1) ser una molècula fàcilment identificable per tal de garantir la mínima invasió de cara al pacient; 2) demostrar una alta sensibilitat, és a dir, la capacitat de detectar el CHC, inclús en un estadi precoç, entre els pacients cirròtics sense tumor; 3) tenir una alta especificitat, és a dir, la capacitat de distingir el CHC d'altres nòduls hepàtics tant benignes com malignes; 4) reflectir la resposta al tractament per tal de monitoritzar el pacient i poder detectar fracassos de tractament i recidives; i 5) tenir una bona reproductibilitat i cost-efectivitat. Per altra banda, és important distingir el marc clínic en el qual s'utilitza el biomarcador: avaluació del risc de desenvolupament de la neoplàsia, eina pel cribratge i/o diagnòstic precoç del CHC, avaluació pronòstica o avaluació de la resposta terapèutica.

En els darrers anys s'han proposat un gran nombre de biomarcadors associats al CHC com a eina atractiva per la seva baixa invasió, objectivitat i reproductibilitat. Però desafortunadament, la majoria d'ells no han assolit la precisió suficient per establir-ne la seva utilitat a la pràctica clínica. El *National Cancer Institute's Early Detection Research Network (EDRN)* ha desenvolupat unes directrius basades en diferents fases per la identificació de biomarcadors en càncer i així assegurar la fiabilitat dels resultats¹³⁷.

La dificultat per desenvolupar un biomarcador altament sensible i específic rau en dos aspectes fonamentals: l'heterogeneïtat molecular característica de cada individu i l'heterogeneïtat molecular del tumor. Per tant, existeix una limitació per establir el valor "normal" per cada marcador.

Tradicionalment, els biomarcadors eren proteïnes detectades en sèrum o plasma. Gràcies als avenços en tecnologia molecular, s'han pogut caracteritzar diferents vies implicades en la carcinogènesi humana i això ha permès identificar altres tipus de biomarcadors.

És important distingir el marc clínic en el qual s'utilitza el biomarcador: avaluació del risc de desenvolupament de la neoplàsia, eina pel cribratge i/o diagnòstic precoç del CHC, avaluació pronòstica o avaluació de la resposta terapèutica.

En les darreres dècades hi ha hagut un enorme desenvolupament i millora en les tecnologies anomenades “òmiques” com la genòmica, transcryptòmica, proteòmica i epigenòmica. Aquestes tècniques basades en l'anàlisi molecular massiva, enlloc de l'anàlisi individual, ha liderat les investigacions dirigides no només a l'aprofundiment del coneixement dels mecanismes moleculars associats a la malaltia sinó també a la identificació de nous biomarcadors. En la recerca oncològica traslacional, els biomarcadors han millorat la detecció precoç dels tumors, la seva estratificació, monitorització de la progressió, predicció de recidiva i el disseny de teràpies personalitzades dels pacients amb càncer. Tradicionalment, els biomarcadors eren proteïnes detectades en sèrum o plasma. Gràcies als avenços en tecnologia molecular, s'ha millorat el coneixement dels mecanismes involucrats en la patogènesi de la transformació i progressió neoplàsica i això ha permès identificar diferents tipus de biomarcadors com ara mutacions, hipermetilacions i signatures genètiques o proteiques.

La síntesi proteica és un procés complex i dinàmic. Des de la informació genètica original fins al producte final que exerceix una determinada funció, es desenvolupen una multitud de processos que van amplificant les opcions fenotípiques del producte final en cada condició, com es mostra a la Figura 9.

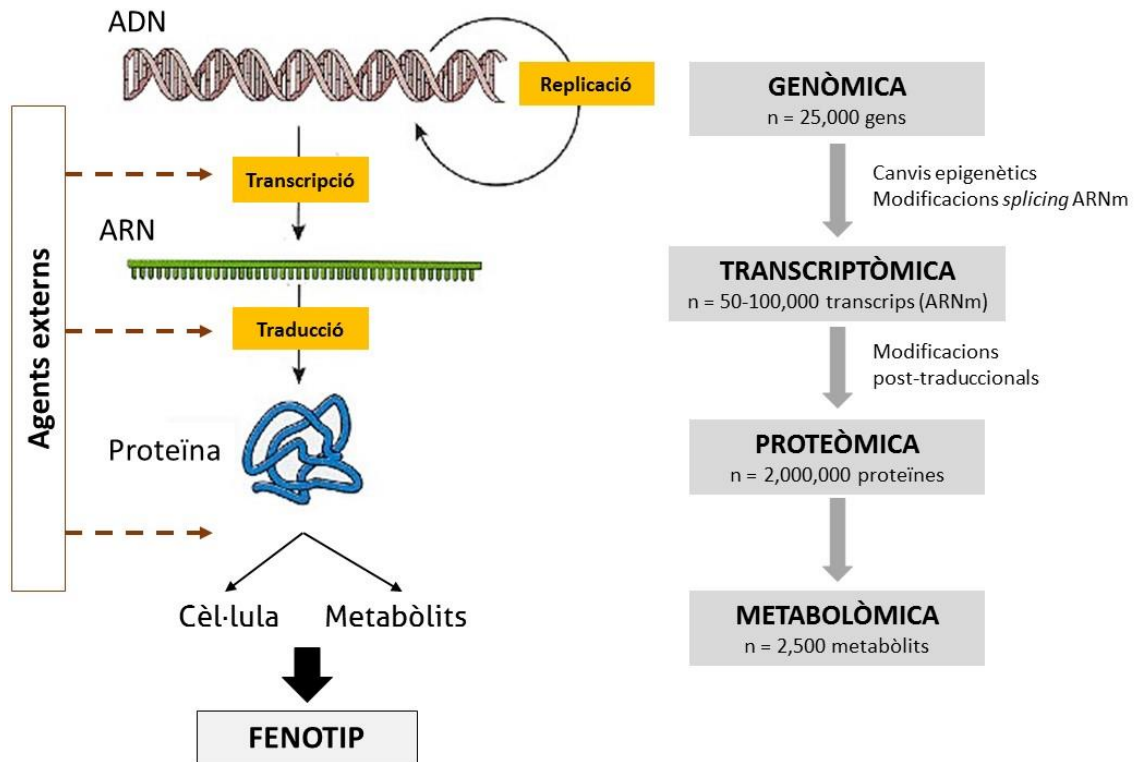


Figura 9: Augment de la complexitat i el nombre de productes des del genoma al proteoma i metaboloma. La diversitat del nombre de productes originats d'un gens deu al mecanisme de *splicing*, de regulació transcripcional i de les modificacions post-traduccionals de les proteïnes. Es preveu que el genoma humà conté de l'ordre de 25,000 gens, dels quals cada un d'ells es transcriu en uns 5-6 mARN de mitja. Cada un d'aquests ARNm es tradueix a proteïna, generant de l'ordre d'unes 8-10 formes modificades de cadenes polipeptídiques. En conseqüència, s'estima que a partir del genoma humà es produeixen uns 2 milions de proteïnes diferents¹³⁸.

Gràcies a la seqüenciació completa del genoma humà l'any 2001¹³⁹, s'ha fet un gran pas en el coneixement dels canvis genètics i les aberracions moleculars que són causants de malalties com el càncer.

Però el procés oncològic ve determinat no només per la codificació genètica. Cal tenir en compte tant els factors interns de transcripció, translació, com factors exògens, per exemple la dieta, l'ambient i el tabac, que afecten a processos moduladors de l'expressió dels gens. Un d'aquests processos moduladors és l'epigenètica, la informació de la qual no es trona codificada a la seqüència de l'ADN i pot contribuir a la fisiopatologia del càncer¹⁴⁰.

L'ADN expressat a la cèl·lula es transcriu a ARN missatger (ARNm) el qual es traduirà finalment a proteïna. La transcriptòmica és la branca que estudia l'expressió del ARNm. Aquesta ciència té l'avantatge que utilitza una tecnologia simple, automatitzada i d'alt rendiment com són els xips d'ADN que aporten informació biològica sobre l'expressió

gènica. Però, per contra, la informació que aporta la transcriptòmica no sempre es correlaciona directament amb el fenotip final a nivell de proteïna¹⁴¹, donades les possibles modificacions post-traduccionals que poden patir les proteïnes un cop sintetitzades (p. ex. fosforilació, acetilació i desaminació)¹⁴².

Després dels grans avenços en la genòmica i transcriptòmica, l'àrea de la proteòmica ha adquirit protagonisme en l'era post-genòmica. El conjunt de proteïnes condicionen el fenotip d'un procés biològic, com per exemple el càncer, i l'estudi de la proteòmica ajuda a entendre aquest estat patològic, complementant la informació aportada per la genòmica i la transcriptòmica¹⁴³. Per tant, podem dir que, la proteòmica fa de pont entre la informació genètica i el fenotip de la malaltia¹⁴⁴.

1.2.1 Proteòmica

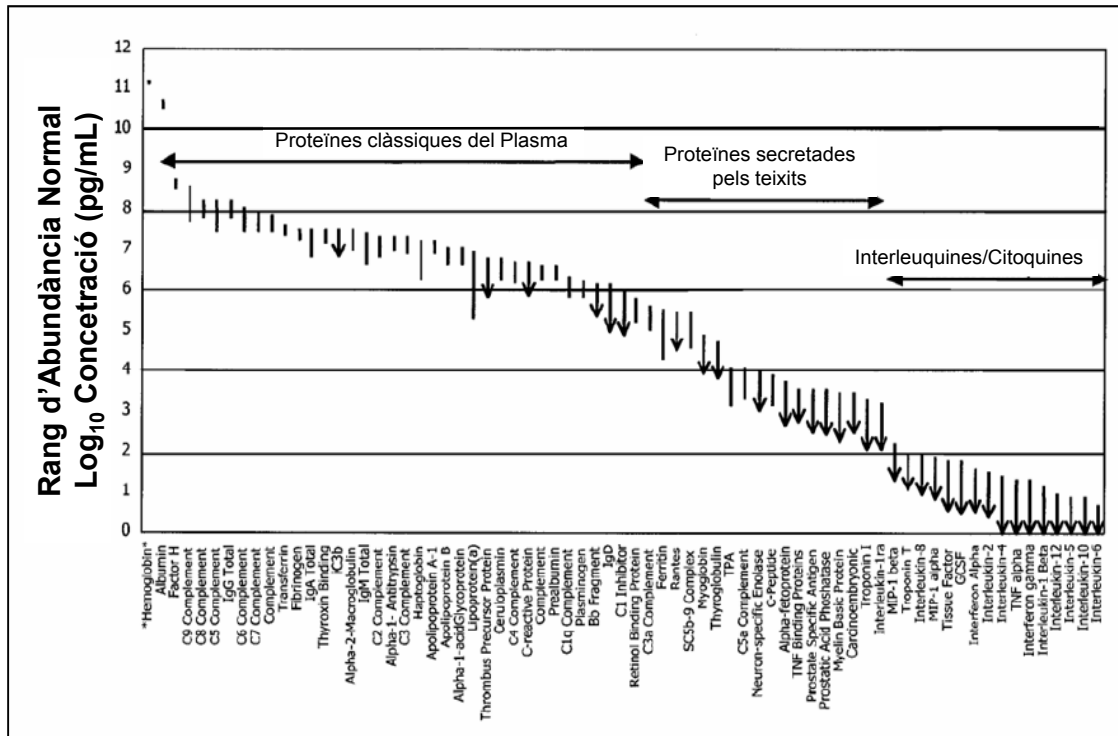
La proteòmica és la ciència que estudia el proteoma, terme que fa referència al conjunt de proteïnes expressades en una cèl·lula, teixit, organisme o fluid biològic en un moment determinat sota unes condicions específiques. El terme proteoma va ser utilitzat per primera vegada pel professor Marc R. Wilkins l'any 1994, com a equivalent lingüístic al de genoma. L'estudi dels nivells d'expressió de les proteïnes, distribució, modificacions postraduccionals i funcions és necessari per comprendre millor el funcionament de la cèl·lula i els seus estats biològics.

L'estudi del proteoma es pot aplicar a diferents substrats com línies cel·lulars i teixits i fluids proximals (p. ex. àcids biliars, suc pancreàtic) orina i sang (plasma o sèrum). Segons el material biològic escollit, existeixen uns avantatges o limitacions a tenir en compte. Treballar *in vitro* usant línies cel·lulars té l'avantatge que disminueix l'heterogeneïtat en les mateixes condicions experimentals i augmenta la qualitat dels extractes proteïcs. Per contra, els resultats *in vitro* no sempre es reproduïen en condicions reals *in vivo*. A nivell tissular, la concentració de proteïnes és molt elevada la qual cosa facilita la identificació de biomarcadors, però la seva obtenció precisa d'una intervenció invasiva (biòpsia o cirurgia), que limita la disponibilitat de mostra. L'atractiu que aporta l'anàlisi de sang pel diagnòstic d'una malaltia és la facilitat i la mínima invasió que suposa l'obtenció d'aquesta. El sistema sanguini perfon tots els teixits del cos i per tant, és susceptible d'incloure tota la informació de les alteracions cel·lulars de tot el cos en un

moment determinat. Així doncs, es considera el biofluid més òptim pel descobriment de biomarcadors¹⁴⁴.

Tot i això, la proteòmica té com a desavantatge la gran complexitat que suposa l'estudi del proteoma. Tal com hem vist, les proteïnes són el resultat de modulacions genètiques, ambientals, i de transformacions postraduccionals. Aquestes múltiples modificacions comporten que la xifra estimada de proteïnes humanes sigui de més d'un milió¹³⁸. A banda, el proteoma té una alta capacitat dinàmica degut a les variacions de localització de les proteïnes, la seva vida mitja i la resposta a estímuls com la malaltia o els tractaments, fets que també dificulten el seu estudi¹⁴⁵. A més, les funcions de les proteïnes estan regulades per complexos sistemes intracel·lulars i intercel·lulars de comunicació entre cèl·lules i el microambient¹⁴⁴.

La gran limitació de l'anàlisi proteòmica del plasma és l'ampli rang dinàmic de concentració de les proteïnes, de l'ordre de 10^{12} (Figura 10). La presència de proteïnes molt abundants com l'albumina (35–50 mg/mL) i les immunoglobulines (5–18 mg/mL) dificulten la detecció de proteïnes minoritàries, com per exemple la interleuquina 6 amb rangs de concentració en sang menors (0-5 pg/mL)¹⁴⁶. Aquesta limitació s'ha vist minimitzada amb l'aplicació de tècniques per deplecionar les proteïnes plasmàtiques més abundants. D'aquesta manera s'aconsegueix l'enriquiment de la mostra amb proteïnes minoritàries entre els quals es trobarien els potencials biomarcadors, la majoria dels quals es troben en concentracions baixes¹⁴⁷.



En l'àrea de la biomedicina, la descripció del proteoma entre dos estats biològics com és el de malaltia i no malaltia, aporta informació d'alteracions a nivell de proteïna, que poden esdevenir potencials biomarcadors de malaltia.

El procés d'identificació de nous biomarcadors utilitzant la tècnica de la proteòmica es pot dividir en 4 fases suggerides per Rifai et al.¹⁴⁸: una primera fase de descobriment, on s'identifiquen i classifiquen les proteïnes plasmàtiques amb diferent abundància. Posteriorment, una segona fase on s'apliquen filtres per obtenir un subconjunt de potencials biomarcadors dels quals se n'escull una selecció per tal de validar-se mitjançant l'ús d'una tècnica complementària com pot ser *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) en sang o immunohistoquímica en teixit. Durant aquest procés de descobriment de biomarcadors, el nombre de mostres que s'han d'analitzar augmenta mentre que el nombre de candidats potencials biomarcadors disminueix.

En general, les diferents tècniques proteòmiques segueixen una metodologia que es basa en:

- Extracció de les proteïnes d'una mostra biològica complexa (cèl·lula, teixit o fluid). Si la mostra és plasma o sèrum, normalment es realitza un primer tractament per deplecionar les proteïnes majoritàries.
- Digestió enzimàtica de les proteïnes per obtenir compostos més simples (pèptids) utilitzant enzims proteolítics (proteases). Normalment s'utilitza la tripsina.
- Separació de les proteïnes o pèptids en diferents fraccions. Aquest fraccionament es pot dur a terme en un gel d'electroforesi o una columna de cromatografia líquida. El primer separa els components de la mostra, normalment proteïnes, en una o dues dimensions: en funció del seu pes molecular quan s'aplica un gradient elèctric continu (electroforesi d'una dimensió, 1-DE) i en funció del pes molecular i del seu punt isoelèctric de pH de forma perpendicular (electroforesi de dues dimensions, 2-DE)¹⁴⁹. La cromatografia líquida es basa en la separació de pèptids digerits segons les seves diferents propietats físiques i químiques, utilitzant diversos tipus de suport cromatogràfic (intercanvi iònic, afinitat, etc). Per exemple, la cromatografia líquida d'alt rendiment (*High Performance Liquid Chromatography – HPLC*), de forma anàloga a la 2-DE, combina dos tipus diferents de cromatografia mitjançant la connexió de dues columnes, una primera columna d'intercanvi iònic (separació per càrrega) i una segona fase reversa (separació per hidrofobicitat)¹⁵⁰.
- Seqüenciació peptídica en un espectròmetre de masses, on s'identifica el pèptid en funció de les seves qualitats físico químiques (massa/càrrega)
- Identificació proteica comparant les seqüències peptídiques resultants amb una base de dades teòrica, per tal d'identificar la proteïna detectada.

En proteòmica es poden definir múltiples estratègies de treball, i segons l'estratègia escollida, s'utilitzen unes tècniques i instruments determinats per poder dur a terme el flux de treball adequat¹⁵¹. Escollir una o altra estratègia dependrà del nombre de mostres a analitzar, el mètode de separació emprat i l'experiència del laboratori

encarregat del procés. Les tècniques més utilitzades en proteòmica es basen en l'electroforesi i en l'espectrometria de masses.

- **Tècniques per l'anàlisi global del proteoma i separació les seves proteïnes, basades en electroforesi.** La tècnica de l'electroforesi bidimensional (2-DE) ha estat des de fa temps la tècnica més utilitzada per la identificació de biomarcadors. Aquest mètode es base en la separació per pes molecular i càrrega de les proteïnes mitjançant la matriu d'un gel de poliacrilamida 2-DE. Com a resultat s'obté un mapa de *spots* (taques proteiques), cada un dels quals conté una o varies proteïnes¹⁴⁹. Aquest mètode permet l'estudi de les modificacions postraduccionals, ja que aquestes confereixen un patró isoelèctric i una massa a les proteïnes diferent de l'original, però és una tècnica amb baixa sensibilitat, baixa reproductibilitat i poca resolució¹⁴⁴. Un avenç recent ha sigut la incorporació de la tècnica de marcatge (*labeling*) de les proteïnes per tal d'incrementar la reproductibilitat i la fiabilitat de l'anàlisi d'expressió diferencial entre mostres. La tècnica 2D-DIGE (*Difference gel electrophoresis*) aplica colorants fluorescents que s'uneixen a les proteïnes, permetent comparar dues mostres independents corregudes en el mateix gel¹⁵².

Posteriorment els *spots* d'interès (diferencials entre mostres) observats en el gel es poden extreure del gel, digerir-se enzimàticament per tal d'obtenir fragments més petits (pèptids) els quals es poden analitzar per un espectròmetre de masses i així identificar la proteïna que s'ha vist diferencialment abundant al gel. A la figura 11 es mostra un exemple del procés metodològic.

- **Tècniques per l'estudi de les proteïnes, basades en espectrometria de masses.** Aquestes tècniques més novadores s'anomenen anàlisis d'alt rendiment (*high-throughput analysis*), i permeten l'anàlisi individual de les proteïnes. L'espectrometria de masses (*mass spectrometry* - MS) és actualment la tècnica analítica principal per la identificació proteica gràcies a la seva elevada sensibilitat i precisió¹⁵³. Existeixen diversos tipus d'espectròmetres de massa com per exemple el MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight*)¹⁵⁴, SELDI-TOF-MS (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time Of*

Flight Mass Spectrometry)¹⁵⁵, *MS/MS (Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)*¹⁵⁶. La MS mesura la relació massa-càrrega (m/z) i l'abundància d'ions presents en una barreja de compostos (pèptids). Es basa en la conversió dels pèptids en ions en fase gasosa els quals es separen en funció de la seva m/z després de ser ionitzats. Les senyals produïdes pels camps electromagnètics són captades pel detector que identifica el pèptid segons la seva m/z , obtenint l'empremta peptídica (més conegut com *peptide mass fingerprint*), característica per cada proteïna¹⁵⁷. Aquesta empremta es compara amb unes mesures teòriques de cadenes d'aminoàcids conegudes identificant així la proteïna¹⁵⁸.

Anàlogament a la tècnica 2D-DIGE, les tècniques de MS també es poden classificar en funció si utilitzen marcatge (anomenades *labeling*) o no utilitzen marcatge (anomenades *label free*). En el cas del *labeling*, es marca un tipus d'aminoàcid amb un marcatge químic o metabòlic. Exemples d'aquesta metodologia són iTRAQ (*Isotope tags for relative and absolute quantitation*)¹⁵⁹ i SILAC (*stable isotope labeling with aminoacid in cell culture*)¹⁶⁰. La comparació amb *label free* entre les mostres es realitza calculant l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic o comptant el nombre d'espectres per la proteïna generada al MS/MS el qual s'anomena *spectral counting*, assumint que la intensitat de l'ió es correlaciona amb l'abundància del pèptid¹⁶¹⁻¹⁶².

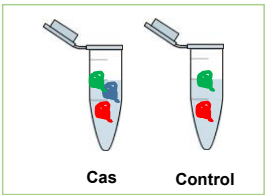
El mètode de la quantificació sense marcatge té l'avantatge que no modifica les proteïnes al no incloure un producte extern a la mostra, és més ràpid i molt més econòmic de portar a terme al minimitzar els passos de preparació, millorant de manera crítica la reproductibilitat de la tècnica. Per contra, es considera un mètode semi-quantitatiu. Tot i això aquesta estratègia és àmpliament utilitzada en anàlisis oncoproteòmiques¹⁶¹.

S'anomena *shotgun proteomics* a la combinació d'una columna de cromatografia líquida i un espectròmetre de masses en tàndem. Aquesta tecnologia permet l'anàlisi d'una barreja complexa de pèptids generada per la proteòlisi de mostres que contenen gran quantitat de proteïnes. El resultat és la identificació de milers de proteïnes^{163,164}. A la figura 11 es mostra un exemple del procés metodològic.

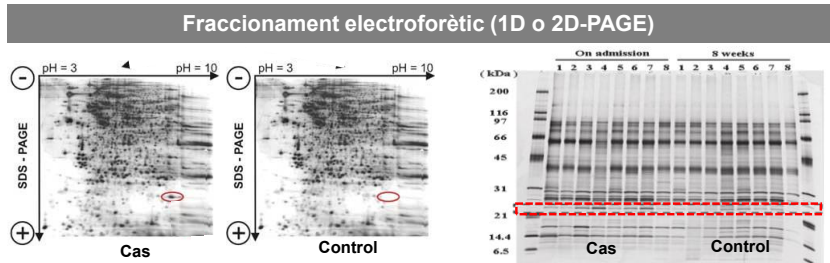
Existeixen diferents programes informàtics per la interpretació de les dades generades a partir de la MS com per exemple el SEQUEST¹⁶⁵, MASCOT¹⁶⁶, PEAKS¹⁶⁷. Tots ells comparen els espectres observats experimentalment obtinguts a partir del MS i els espectres esperables a partir de la informació disponible d'una base de dades, com per exemple Swissprot, Uniprot. Cada programa assigna una puntuació donada per diferents algorismes.

Figura 11 de la pàgina següent: Resum de les opcions metodològiques per l'anàlisi de proteïnes plasmàtiques. Les proteïnes plasmàtiques es poden fraccionar inicialment per electroforesis en una o dues dimensions (1D o 2D-PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*). A la imatge veiem la comparativa de dos gels 2D-PAGE sense marcatge (a l'esquerra) on es ressalta una taca proteica diferencial entre les dues mostres. A la dreta, una altra mostra d'un gel unidimensional (1D-PAGE) sense marcatge amb diferents mostres de cada grup cos o control corregudes segons pes molecular on es marca en un requadre vermell la proteïna diferentment abundant entre totes les mostres. Tant la taca proteica identificada al gel 2D-PAGE com les bandes diferencials de cada mostra correguda en el gel 1D-PAGE s'extreuen i es digereixen enzimàticament per obtenir fraccions més senzilles, els pèptids. Aquesta mescla de pèptids senzilla procedent de les proteïnes digerides extretes de la taca proteica o de la banda diferencial s'analitzen posteriorment per espectrometria de masses en tàndem (MS/MS). A la figura es mostren únicament dos exemples d'espectrometres de masses per la seqüenciació peptídica, el mètode *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight* (MALDI-TOF) o l'espectròmetre de masses en tàndem (MS/MS).

A la dreta de la il·lustració es mostra l'altra metodologia possible, anomenada *shotgun proteomics*, ja que seqüencia la totalitat de la mostra digerida previ un fraccionament per cromatografia líquida d'alta resolució (HPCL) de la mostra peptídica complexa abans de la seqüenciació peptídica a MS/MS. En aquest



Separació proteïca

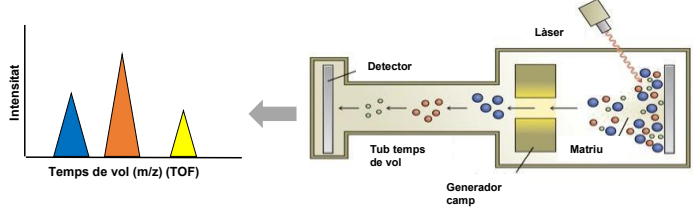


Digestió proteïca



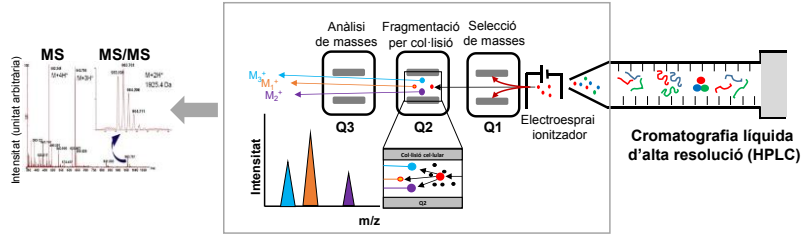
Seqüenciació peptídica

Ionització i anàlisi peptídica per MALDI-TOF



Principles of Biochemistry, 4e
© 2006 Pearson Prentice Hall, INC

Fraccionament cromatogràfic i anàlisi peptídica (MS/MS)



<https://www.waksman.rutgers.edu/dismukes/pages/instruments>

1.2.2 Biomarcadors de càncer identificats per proteòmica

Gràcies a la introducció de la proteòmica en la recerca traslacional, s'ha ampliat la comprensió de les bases moleculars de diverses malalties com el càncer. Això ha permès la identificació de potencials biomarcadors candidats en la vigilància, el diagnòstic, l'estratificació de la malaltia i la resposta al tractament. Per exemple, aplicant MS s'han identificat marcadors diagnòstic de càncer de mama¹⁶⁸, ovari¹⁶⁹, pàncreas^{170,171}, pulmó¹⁷², colangiocarcinoma¹⁷³. També s'han identificat biomarcadors pronòstic predictors de metàstasi, com per exemple en el cas de l'adenocarcinoma de pulmó, on Wen et al. va identificar l'índex de fucosilació de E-cadherina com a predictor de metàstasi amb la tècnica 2D-DIGE i MS/MS¹⁷⁴. També s'han identificat marcadors útils en el control de resposta al tractament quimioteràpic^{175,176}.

Més específicament en CHC, múltiples estudis han utilitzat la proteòmica com a mètode per la identificació de biomarcadors.

Utilitzant la metodologia d'electroforesi, recentment un grup espanyol ha publicat un panell de potencial biomarcador diagnòstic de CHC en pacients amb cirrosi per VHC utilitzant el 2D-DIGE amb un espectròmetre de masses MALDI-TOF/TOF, i posteriorment validant els resultats amb la tècnica d'ELISA^{177,178}.

El sistema DIGE també s'ha utilitzat per comparar el perfil proteic de teixit tumoral i no tumoral de CHC, observant múltiples proteïnes diferencialment abundants que posteriorment s'han identificat per MS/MS^{179,180,181}. Lee et al. va identificar la sobreexpressió de la proteïna 14-3-3γ en 8 teixits amb CHC comparat amb teixit no tumoral adjacent amb 2D-DIGE combinat amb cromatografia líquida acoblat a MS/MS¹⁷⁹. El grup de Megger et al. l'any 2013 va identificar 51 proteïnes diferentment expressades en teixit tumoral i no tumoral (7 CHC i 7 teixit no tumoral) analitzades amb dues tècniques: 2D-DIGE amb la identificació de les proteïnes per MALDI-TOF-MS i una tècnica sense marcatge utilitzant cromatografia líquida acoblada a MS/MS.

Altres grups han identificat marcadors tissulars relacionats amb la predicció precoç de recidiva i metàstasi de CHC després d'una hepatectomia o trasplantament hepàtic¹⁸²⁻

¹⁸³. El grup de Tan et al. ha publicat recentment un panell de biomarcadors tissulars de CHC predictors de recidiva identificats per MS¹⁸⁴.

Darrerament s'ha utilitzat una tecnologia més novedosa per identificar i quantificar potencials biomarcadors, com és la metodologia amb marcatge iTRAQ que ha permès identificar el factor de von Willebrand com a potencial biomarcador entre pacients amb cirrosi per VHB amb i sense CHC i voluntaris sans¹⁸⁵. Amb tècniques de quantificació sense marcatge amb cromatografia líquida acoblada a MS/MS, s'ha identificat un perfil proteic diferencial entre grups de pacients amb diferents graus d'hepatopatia crònica amb i sense CHC d'una població africana de 339 subjectes¹⁸⁶.

Cap d'aquests marcadors però, s'ha validat de manera àmplia i representativa per poder-se aplicar a la pràctica clínica. El biomarcador identificat per tècniques de proteòmica que més ha transcendit a nivell experimental i més grups han validat en cohorts independents ha sigut l'osteopontina (OPN). L'OPN és una fosfoproteïna glicosilada que actua com a citocina. Està induïda pel factor de creixement hepàtic (*Hepatic Growth Factor, HGF*) i contribueix en el creixement i invasió tumoral¹⁸⁷. L'OPN s'ha observat que està sobreexpressada en múltiples càncers¹⁸⁸. Shang et al. l'any 2012 van identificar aquesta proteïna en plasma a partir d'un anàlisi de HPLC-MS/MS¹⁸⁹. Inicialment van identificar l'OPN en mostres de plasma procedents de 17 CHC i 18 cirròtics i posteriorment van validar els resultats per la tècnica d'ELISA en 312 mostres de plasma (131 CHC dels quals 18.3% eren BCLC 0/A, 76 cirròtics, 52 hepatitis cròniques, 53 sans). La capacitat diagnòstica de l'OPN per detectar CHC va ser del 74%-93% i una especificitat del 61%-66% amb punt de tall de 91 ng/mL. Per tumors inicials, la sensibilitat i especificitat es van mantenir, sent del 75% i 62% respectivament.

Posteriorment, diferents grups han estudiat la capacitat diagnòstica de l'OPN, observant-ne una alta sensibilitat diagnòstica fins al 98%, inclús per tumors inicials, però amb molt baixa especificitat (61%), no acceptable per un marcadors diagnòstic de càncer^{93,95}. Exceptuant el grup de Makaren et al. que va obtenir especificitats del 100%, resultats no reproduïts posteriorment¹⁹¹.

A més, el grup de Shang et al. va demostrar la capacitat de predir el CHC precoçment, mostrant un increment dels nivells d'OPN en sèrum en 10 de 12 pacients (83%) entre 6 i 12 mesos abans del diagnòstic de CHC¹⁸⁹. A nivell pronòstic, un altre grup va observar

una relació positiva dels nivells plasmàtics d'OPN i una major recidiva i disminució de supervivència després de la resecció quirúrgica¹⁹². Tot i això, en l'estudi, la cohort de pacients que van sotmetre's a resecció quirúrgica presentava CHC en estadis avançats (52% CHC > 50 mm de diàmetre, 34% \geq 2 nòduls i 22% metastatitzats). A nivell histològic, la sobreexpressió d'OPN a nivell tumoral també s'ha associat amb recurrència precoç¹⁹³. Un meta-anàlisi recent ha establert que l'OPN és una eina comparable a AFP pel diagnòstic de CHC, essent difícil establir la seva utilitat per la poca quantitat d'estudis realitzats sobre aquest biomarcador¹⁹⁴.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

2 HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesis de treball:

- El perfil proteic del plasma de pacients amb malaltia hepàtica sense tumor és diferent al perfil proteic de pacients amb tumor hepàtic.
- El perfil proteic del plasma de pacients amb CHC en estadi inicial és diferent al perfil proteic de pacients amb CHC disseminat.
- Utilitzant la tècnica d'anàlisi semiquantitativa d'espectrometria de masses sense marcatge es poden identificar proteïnes diferencialment enriquides entre diferents estats de la malaltia.

La present tesi va dirigida a estudiar el plasma dels pacients cirròtics amb carcinoma hepatocel·lular (CHC) amb l'objectiu final d'identificar biomarcadors diagnòstic que ajudin al maneig clínic del pacient amb càncer de fetge. A continuació, es detallen els diferents objectius específics.

- **OBJECTIU 1: Estudi del perfil proteic del plasma de pacients amb diferents graus de malaltia hepàtica amb i sense tumor mitjançant una tècnica proteòmica d'alta resolució.**
- **OBJECTIU 2: Identificació i validació de potencials biomarcadors plasmàtics diagnòstic de CHC.**

MATERIAL I MÈTODES

3 MATERIAL I MÈTODES

3.1 Establiment d'una col·lecció de mostres de plasma de pacients amb diferents graus de malaltia hepàtica amb i sense tumor i voluntaris sans.

3.1.1 Inclusió de pacients

Al llarg de la duració de l'estudi (2010-2014), es van obtenir mostres biològiques de pacients i voluntaris sans diagnosticats en el servei d'hepatologia de 6 hospitals universitaris nacionals (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona, Hospital del Mar de Barcelona, Hospital Parc Taulí de Sabadell, Hospital Dr Josep Trueta de Girona, Hospital La Fe de Valencia i Hospital Puerta de Hierro de Majadahonda). Es van reclutar tots aquells pacients que acudien de manera consecutiva a consultes externes d'Hepatology o ingressaven al servei de Digestiu dels 6 hospitals col.laboradors. Es van incloure pacients amb malaltia hepàtica crònica en diferents estadis de la malaltia, de qualsevol etiologia amb i sense CHC i voluntaris sans. El diagnòstic de cirrosi es va establir per criteris clínics (descompensacions de la cirrosi com ascites, antecedents d'hemorràgia digestiva per hipertensió portal), analítics (hipertransaminasèmia, plaquetopènia, hipoalbuminèmia, hiperbilirubinèmia, alteració coagulació), dos o més mètodes serològics no invasius diagnòstics de fibrosi avançada (APRI, FORNS, FIB4) i/o histologia hepàtica per biòpsia. La presència d'hipertensió portal deguda a cirrosi es va determinar per endoscòpia (presència de varices esofàgiques, gastropatia de la hipertensió portal) o per criteris ecogràfics (superfície hepàtica i ecoestructura irregulars, nodularitat del parènquima hepàtic, hipertròfia del lòbul caudat, hepatomegàlia, esplenomegàlia, circulació col.lateral, dilatació del sistema portal, disminució de la velocitat de flux portal i/o presència de ascites). A tots els participants se'ls va realitzar una anamnesi detallada i una anàlisi completa per estudiar la causa d'hepatopatia crònica: consum d'alcohol diari; índex de massa corporal;

estudi farmacològic habitual; immunoglobulina G (IgG) contra el VHC, antigen de superfície del VHB; IgG VIH; anticossos antinuclears, anti múscul llis, anti mitocondrial, anti microsomal del ronyó i fetge tipus 1; ferritina i saturació transferria per estudi d'hemocromatosi hereditària, ceruloplasmina per estudi malaltia de Wilson; determinació alfa-1 antitripsina; tiroxina i tirotròfina per malaltia tiroïdal.

Es van excloure aquells pacients amb hepatitis crònica o cirrosi que es trobessin en un brot agut de la malaltia; amb tractament antiviral del VHC en el moment de la inclusió; antecedent de qualsevol neoplàsia i pacients amb una malaltia hepàtica o extrahepàtica greu amb una expectativa de vida de menys d'un any.

Els pacients que es van incloure en l'estudis van classificar en diferents grups (Figura 12):

- **GRUP "SA":** Voluntaris sans a nivell de malaltia hepàtica, d'edat i sexe similar als pacients inclosos a l'estudi. A tots se'ls va descartar malalties concomitants o malaltia hepàtica o lesions hepàtiques mitjançant una anamnesi detallada, analítica general i una ecografia abdominal en el moment de la inclusió.
- **GRUP "HC":** Pacients amb hepatitis crònica activa sense cirrosi, d'etiologia VHC. Es va descartar la presència de CHC o altres nòduls hepàtics mitjançant ecografia en el moment de la inclusió. En cas de fibrosi avançada es van realitzar ecografies trimestrals durant el seguiment per tal de descartar l'aparició de CHC segons el programa de cribratge.
- **GRUP "CIR":** Pacients amb cirrosi de qualsevol etiologia, sense CHC. En aquests casos, la presència de CHC s'exclouia mitjançant ecografia abdominal en el moment del diagnòstic i semestralment durant el seguiment per tal de descartar l'aparició de CHC segons el programa de cribratge.
- **GRUP "LOE":** Pacients amb cirrosi de qualsevol etiologia als quals es va diagnosticar una lesió ocupant d'espai (LOE) hepàtica que amb les tècniques disponibles actuals (TC/RM o biòpsia) no es va poder establir el diagnòstic, bé fos per la mida tumoral reduïda, patró de captació de contrast no diagnòstic o anatomia patològica no concluent. Aquests pacients es van seguir de manera prospectiva amb prova d'imatge cada 3 mesos com indiquen les guies clíniques per tal d'establir el diagnòstic.

seguiment a consultes externes d'hepatologia es diagnostica d'un CHC inicial, moment en el qual se li extreu mostra plasmàtica (M2). Es realitza tractament curatiu amb radiofreqüència i al cap de 3 mesos es constata la resposta completa, extraient-se nova mostra de plasma (M3). Al llarg de seguiment fins el moment actual es manté lliure de malaltia sense evidenciar-se recidiva tumoral.

Cada voluntari sa i pacient inclòs a l'estudi, convenientment informat, va firmar el consentiment informat aprovat pel comitè ètic de cada hospital col·laborador. Per la inclusió dels pacients a la col·lecció es va seguir la *Ley de investigación biomédica 14/2007*, i es va aplicar la protecció de dades i confidencialitat segons la declaració de Helsinki i la legislació espanyola vigent de protecció de dades de caràcter personal (*Ley Orgánica 15/1999*). Finalment les mostres col·leccionades es van gestionar pel Biobanc de l'Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol (IGTP) que va garantir la correcta preservació de les mateixes.

3.1.2 Extracció i emmagatzematge de mostres de plasma

L'extracció de mostres de plasma es va dur a terme per un equip d'infermeria especialitzat en investigació de cada centre. En concret, pel que fa a les mostres procedents de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol es van utilitzar els serveis de la Unitat Polivalent d'Investigació Clínica (UPIC). Els diferents equips s'encarregaven de rebre el pacient a consultes externes d'hepatologia o bé, es desplaçava a l'habitació on hi havia el malalt ingressat. Al ser un estudi multicèntric, en que l'obtenció del plasma es realitzava per diferents professionals en els diferents hospitals, es van utilitzar tubs d'extracció que contenen inhibidors de les proteases (BD™ P100 Blood Collection Tubes, *referència 366456*) i així assegurar la màxima preservació de les proteïnes plasmàtiques i minimitzar la variabilitat experimental.

Immediatament després de la obtenció d'uns 8.5mL de sang, la separació del plasma s'obtenia centrifugant els tubs BD™ P100 a 1300 g durant 30 minuts a 4°C. Dels 4,5mL de mitja de plasma que s'obtenien per cada extracció de sang, es feien alíquotes de 1,5mL en 3 microtubs Eppendorf® Safe-Lock de 2mL (*ref. 0030.120.094*). Les mostres es mantenien en congeladors a -80°C de cada centre fins l'enviament al centre coordinador (IGTP) on s'emmagatzemaven també a -80°C fins la seva utilització.

3.1.3 Registres de paràmetres clínics i anatomopatològics

Paral·lelament a l'obtenció de mostres biològiques, es va recollir la informació clínica completa de les característiques clíniques i analítiques dels pacients inclosos a l'estudi, i les característiques tumorals dels informes d'anatomia patològica. Els responsables de cada centre participant recullen les dades en formularis dissenyats per l'estudi, els quals s'enviaven al centre coordinador (IGTP) per centralitzar-les en una base de dades global. Els paràmetres evolutius s'actualitzaven periòdicament en cada centre enviant-se la informació al centre coordinador.

Es van enregistrar els algoritmes de marcadors serològics no invasius de fibrosi hepàtica: Forns¹⁹⁵, FIB4¹⁹⁶ i APRI¹⁹⁷, on valors majors a 6.9, 3.25 i 1.5 indiquen fibrosi significativa respectivament (Figura 13).

$$\text{Forns} = 7.811 - 3.131 \times (\text{Plaquetes}) + 0.781 \times (\text{GGT}) + 3.467 \times (\text{Edat}) - 0.014 \times \text{Colesterol}$$

$$\text{FIB4} = \frac{\text{Edat} \times \text{AST}}{\text{Plaquetes} \times \sqrt{\text{ALT}}}$$

$$\text{APRI} = \frac{\text{AST (UI/L)} / \text{LSN AST (UI/L)}}{\text{Plaquetes (10}^9\text{L)}} \times 100$$

Figura 13: Algoritmes dels tres marcadors serològics no invasius de fibrosi hepàtica analitzats: Forns, FIB4 i APRI. ALT: Alanina Aminotransferasa; APRI: *AST to Platelet Ratio Index*; AST: Aspartat Aminotransferasa; FIB4: Fibrosi-4; GGT: Gamma Glutamiltransferasa; LSN: Límit superior de la Normalitat

3.1.4 Anàlisi estadística de les dades clíniques

Per la descripció de la informació clínica i patològica dels pacients inclosos a l'estudi, les dades de les variables categòriques es van presentar mitjançant freqüències relatives mentre que les dades de les variables contínues es van mostrar mitjançant mediana i rang interquartil (RIQ). Per valorar diferències significatives bivariades es van utilitzar proves de t-student, xi-quadrat o F-Fisher segons conveniència. Per valorar l'AFP com a biomarcador diagnòstic es van utilitzar corbes ROC, determinant l'àrea sota la corba en diferents combinacions de casos i controls.

3.2 OBJECTIU 1: Estudi del perfil proteic del plasma de pacients amb diferents graus de malaltia hepàtica amb i sense tumor mitjançant una tecnologia proteòmica d'alt rendiment.

3.2.1 Selecció de pacients per l'anàlisi proteòmica

Per dur a terme l'estudi de biomarcadors plasmàtics per tècniques de proteòmica, es va seleccionar un grup de 30 mostres de plasma procedents de 30 pacients de la col·lecció amb diferents graus d'hepatopatia hepàtica així com individus sans. Per aquesta selecció es van escollir els pacients de cada grup de la manera més homogènia possible per facilitar la identificació de biomarcadors tumorals i reduir la variabilitat biològica entre mostres d'un mateix grup. En aquest sentit, es van tenir en compte característiques demogràfiques i clíniques com el sexe, edat, etiologia de l'hepatopatia, grau d'insuficiència hepàtica i estadi tumoral per tal que els grups estiguessin el màxim compensats possible.

Les 30 mostres seleccionades per l'estudi proteòmic provenien de 3 voluntaris sans (grup anomenat "SA"); 3 pacients amb hepatitis crònica (grup anomenat "HC"); 9 pacients cirròtics sense CHC (grup anomenat "CIR"); i 15 pacients cirròtics amb CHC de diferents estadis tumorals (grup anomenat "CHC"). Els pacients amb CHC es van subdividir en 2 grups: 9 pacients amb CHC inicial (estadi BCLC 0/A) (grup anomenat "CHC-i"); i 6 pacients amb CHC avançat (estadi BCLC C/D) definit per la presència de disseminació vascular (grup anomenat "CHC-a"). És important assenyalar que en tots els pacients cirròtics sense CHC, la presència d'un nòdul hepàtic es va descartar amb al menys 3 ecografies abdominals trimestrals consecutives.

Es van excloure de la selecció aquells pacients amb antecedent o presència de neoplàsies o malalties autoimmunes concomitants, insuficiència renal o diabetes mellitus que poguessin enmascarar els resultats obtinguts.

3.2.2 Tractament del plasma per l'anàlisi proteòmica

El disseny i posada a punt dels protocols pel tractament de mostres de plasma per tal de ser analitzades per MS/MS es va realitzar en el laboratori de l'IGTP. El flux de treball seguit es resumeix a la figura 14 i s'explica en detall al llarg d'aquest apartat.

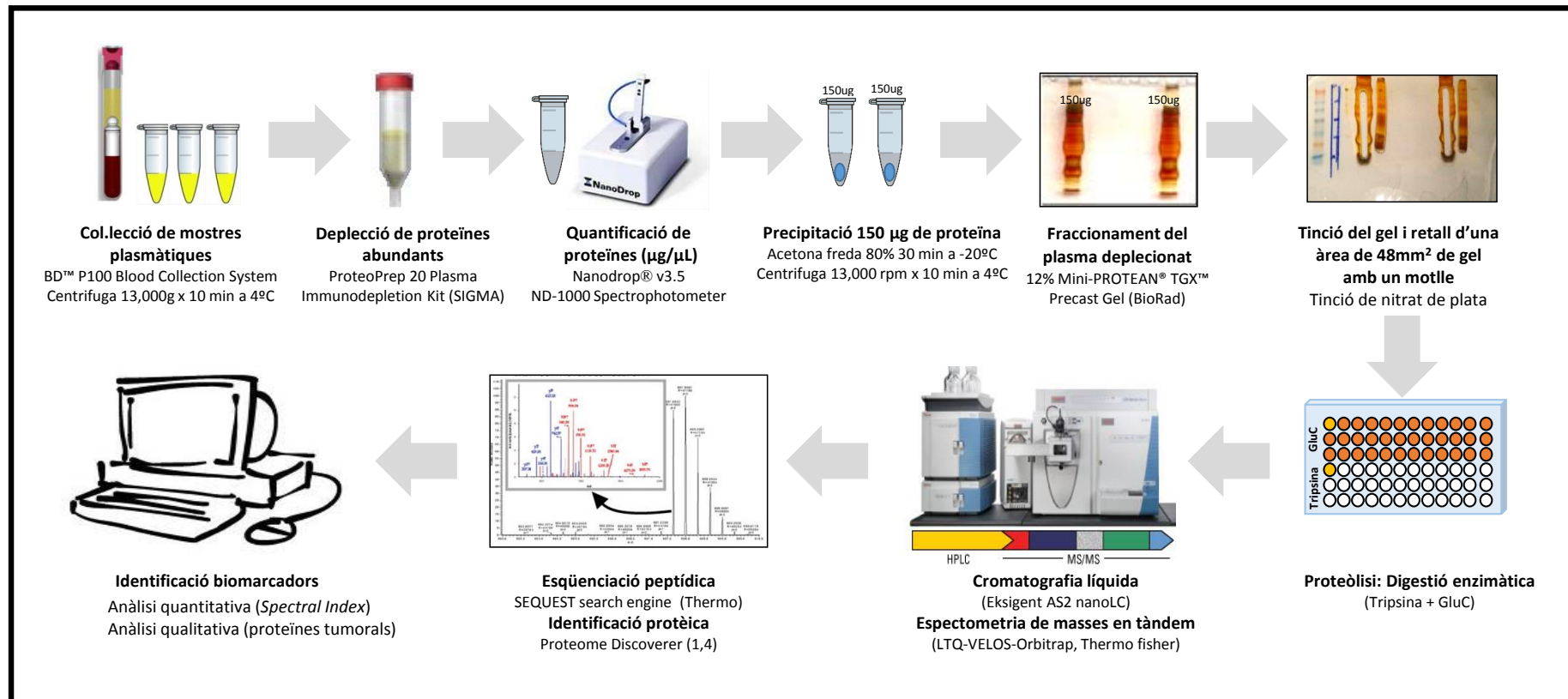


Figura 14. Diagrama il·lustratiu del procés metodològic seguit pel tractament del plasma per l'anàlisi per MS/MS. Inclou des de la col·lecció de mostres plasmàtiques emmagatzemades a -80°C, la depleció de proteïnes majoritàries per tal d'enriquir el plasma dels potencials biomarcadors, la quantificació de proteïnes pel mètode NanoDrop® i la precipitació de 150ug micrograms de proteïna mitjançant acetona freda. El primer fraccionament de 150ug de proteïnes plasmàtiques es va realitzar per electroforesi unidimensional d'acrilamida al 12%, la tinció posterior d'aquest gel amb nitrat de plata, l'extracció d'una àrea homogènia de 48mm² de gel d'acrilamida en la que les proteïnes plasmàtiques estaven fraccionades segons pes molecular i la digestió proteolítica de 46 fragments d'aquest gel que contenen diferents fraccions de les proteïnes amb dos enzims proteolítics diferents (tripsina + GluC). El segon fraccionament es va realitzar per cromatografia líquida altament sensible (HPLC) acoblada a l'espectròmetre de masses en tàndem (MS/MS) el qual realitza la seqüenciació peptídica i identificació de proteïnes. Finalment, es va procedir a un exhaustiu anàlisi bioinformàtica de resultats mitjançant un anàlisi quantitatiu utilitzant el test bioestadístic *Spectral Index*, i un anàlisi qualitatiu analitzant les proteïnes únicament identificades en les mostres de tumor.

3.2.2.1 Depleció de les proteïnes majoritàries del plasma

Tal com s'ha comentat anteriorment, el plasma és una mostra biològica complexa d'analitzar degut a que té unes proteïnes que són molt abundants i dificulten l'estudi d'aquelles que no ho són tant. L'albumina per exemple, es troba en una concentració habitual de 35-40mg/dL i és la proteïna més abundant al plasma, sent el 80% del total de proteïnes en la sang. Per tal d'eliminar aquestes proteïnes majoritàries del plasma i poder identificar les proteïnes que es troben en una concentració inferior, es va utilitzar el kit comercial "Proteoprep 20 Immunodepleted" Kit de Sigma Aldrich®, seguint el protocol esquematitzat a la figura 15. Aquest kit és capaç de deplecionar el 99% de les 20 proteïnes més abundants del plasma: albumina i pre-albumina, transferrina, alfa1-glicoproteïna àcida, proteïnes del grup del Complement C1q, C3 i C4, fibrinogen, ceruloplasmina, alfa2-macroglobulina, alfa1-antitripsina, plasminogen, haptoglobina, grup de les immunoglobulines IgG, IgA, IgM i IgD i apoproteïnes A-I, A-II, B.

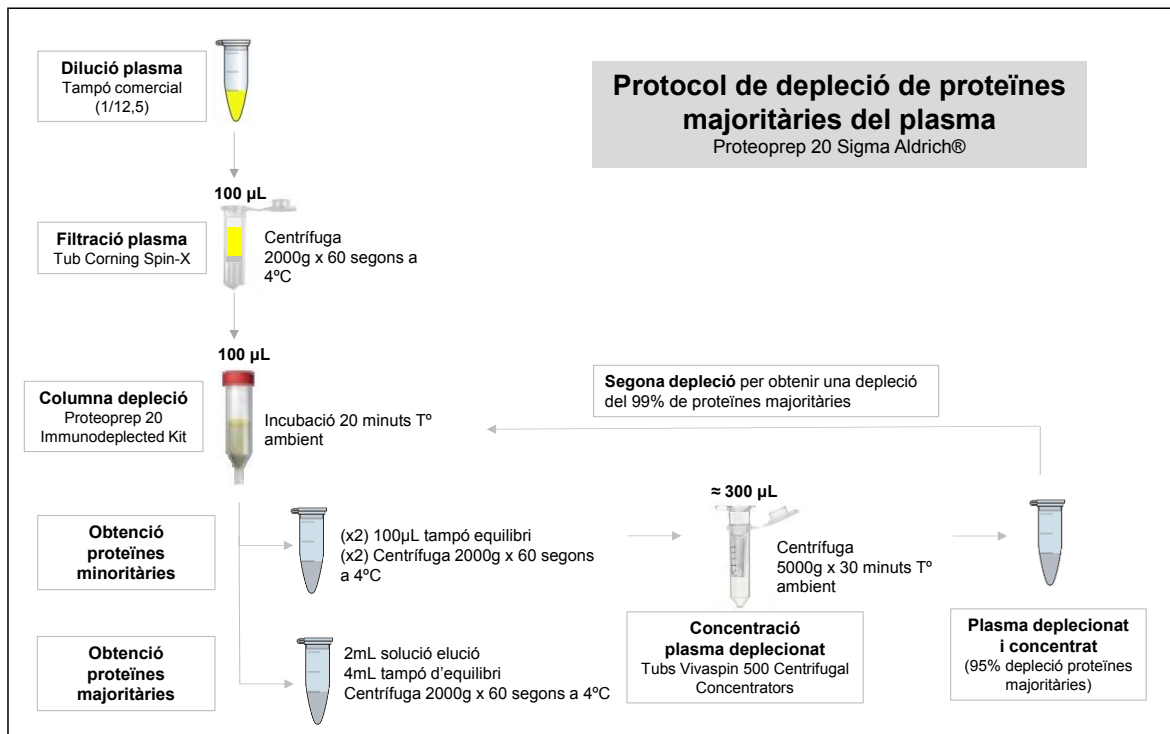


Figura 15: Protocol de depleció de proteïnes majoritàries utilitzant la columna comercial Proteoprep 20 de Sigma Aldrich®, incorporant amb les variacions estandarditzades al laboratori IGTP.

La columna conté una barreja d'IgG policlonals purificades unides a la columna d'agarosa les quals per afinitat s'uneixen a les proteïnes majoritàries citades anteriorment. Després

de cada utilització de la columna, aquesta es renta amb una solució de rentat que permet alliberar les proteïnes majoritàries unides als anticossos i permetre una nova depleció de plasma, com es mostra a l'esquema de la figura 16.

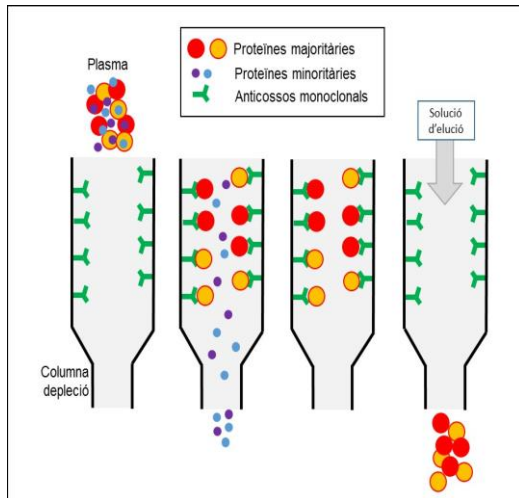


Figura 16. Esquema del principi d'immuno-depleció de les columnes Proteoprep 20 Immunodepleted Kit de Sigma Aldrich®. La resina de la columna conté anticossos monoclonals específics per les 20 proteïnes majoritàries a deplecionar. Durant la incubació del plasma a la resina, les proteïnes majoritàries s'uneixen als corresponents anticossos. Amb el rentat de la columna, es recuperen les proteïnes minoritàries en un primer moment. Per tal d'alliberar els anticossos de les proteïnes majoritàries i així poder reutilitzar la columna, s'injecta una solució d'elució que trenca les unions anticòs-proteïna permetent l'elució de les proteïnes majoritàries.

Seguint les normes de manufactura del kit, es va seguir el següent procediment. Inicialment, abans de la depleció, el plasma es va filtrar per tal d'obtenir una mostra més purificada.

- Es va diluir el plasma 1/12,5 amb el tampó d'equilibri comercial del kit (tampó fosfat salí amb 50% glicerol i 0.0015% de l'antimicrobial Kathon® CG/ICPII).
- Cada 100 µL de mostra diluïda es va filtrar a través d'un filtre de 0,2mm Corning Spin-X Centrifuge Tube Filter, (ref. CLS8160) centrifugant-los a 2000g durant 60 segons. Per tal d'obtenir el màxim rendiment durant el procés de filtració es va optimitzar filtrant només 300 µL de plasma diluït per cada tub Corning Spin-X, enlloc de 500 µL màxims com estava establert per protocol, un cop estudiat el rendiment obtingut en el nostre laboratori.

El procés de depleció de proteïnes majoritàries del plasma diluït es realitzà en les columnes de depleció proporcionades pel kit comercial.

- Cada 100 µL de mostra diluïda filtrada es dispensaven a la resina de la columna i es deixaven reposar durant 20 minuts a temperatura ambient per tal que les proteïnes majoritàries s'unissin als anticossos de la resina.
- Posteriorment, es centrifugava la columna (2000g x 60 segons a 4°C) obtenint en primer lloc un eluït de proteïnes minoritàries que no s'havien unit a la columna.

MATERIAL I MÈTODES

- Per tal d'obtenir el màxim rendiment, la columna es rentava dues vegades amb 100 μL de tampó d'equilibri diluït (10X) i centrifugant-la (2000g x 60 min a 4°C) després de cada rentat recuperant l'eluit obtingut (aproximadament 300 μL).
- S'eliminaven les proteïnes majoritàries unides als anticossos de la resina, amb la injecció de 2mL de solució d'elució (10X) composta per 0.1 M Glicina-HCl, pH 2.5, a través de la columna durant un minut.
- Seguidament, i en el menor temps possible, es netejava la columna injectant 4 mL de tampó d'equilibri (10X) per tal de neutralitzar l'acidesa de la solució d'elució, eliminant tot el contingut amb una centrifugació 2000g x 60 min a 4°C.
- El plasma deplecionat col·leccionat es concentrava filtrant-lo en tubs amb microfiltres de (Vivaspin 500 Centrifugal Concentrators (*ref. Z614009*) a 5000g x 30 minuts a temperatura ambient. Així s'aconseguia reduir el volum inicial a la meitat (per cada 150 μL de plasma deplecionat obteníem 75 μL de plasma deplecionat concentrat).

Aquest procés es repetia per cada 100 μL de plasma que es volien deplecionar. En total es van deplecionar 700 μL de plasma per cada pacient/individu control. Amb aquesta primera depleció de 20 minuts, s'aconseguia un rendiment teòric de depleció de proteïnes majoritàries del 95%. Per tal de millorar la depleció, es va repetir tot el procés de depleció una segona vegada pel plasma inicial deplecionat i concentrat. Seguint la teoria que aquest segon plasma només comprenia un 5% de proteïnes majoritàries, i per tant la saturació dels anticossos distribuïts per la resina de la columna de depleció havia de ser menor, després de cada 100 μL de plasma deplecionat, no es procedia a l'elució d'aquest 5% de proteïnes majoritàries sinó que només es rentava la columna amb 200 μL de tampó d'equilibri col·leccionant-ne tot l'eluit. Després de la darrera depleció de cada mostra sí que es realitzava la neteja de la resina amb la solució d'elució i posterior neutralització, per tal de ser utilitzades posteriorment per noves mostres.

3.2.2.2 Quantificació proteica de la mostra deplecionada

Una vegada obtingut el plasma deplecionat segons la metodologia de l'apartat anterior, la concentració de proteïnes totals es va obtenir mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop® ND-1000 tenint en compte que 1 unitat d'absorbància a 280 nm equival a una concentració proteica aproximada de 1 mg/mL.

Es va escollir aquest mètode per la poca quantitat de mostra necessària (2 µL) i la rapidesa que comporta a diferència d'altres mètodes com per exemple el Bradford que precisa construir un banc de dilucions de la mostra amb un colorant per establir la concentració precisa. Un cop quantificat el plasma deplecionat, es precipitava la quantitat exacte de proteïna desitjada i la resta de plasma deplecionat es congelava al mateix moment a -80°C per tal d'evitar al màxim la congelació i descongelació del plasma que afavoreix la degradació de les proteïnes.

3.2.2.3 Precipitació de proteïnes

Es van precipitar 300 µg de proteïna total de cada mostra de plasma separats en dues alíquotes amb 150 µg cada una. La precipitació de les proteïnes es va aconseguir utilitzant un 80% d'acetona freda durant 30 minuts a -20°C i posteriorment centrifugant a 15.700g durant 10 minuts a 4°C. Un cop eliminat el sobrenedant, es van obtenir els pèl·lets de proteïnes, és a dir agregats de proteïnes precipitades deshidratades.

Es va escollir el mètode de precipitació amb acetona freda enlloc de la precipitació amb àcid tricloroacètic (TCA) donat que l'acetona és òptima quan les concentracions de la dilució són majors de 0.5 µg/µL, i en canvi el TCA és òptim amb concentracions inferiors. En el present projecte, les concentracions obtingudes mitges eren de l'ordre de 0.6 µg/µL. A banda, es va escollir acetona per evitar l'acidesa del TCA que interfereix en la digestió enzimàtica amb tripsina, enzim utilitzat en el projecte.

3.2.2.4 Separació de proteïnes segons el seu pes molecular per electroforesi amb gel de poliacrilamida

Abans d'analitzar les mostres deplecionades per MS/MS es va realitzar un primer fraccionament del plasma a partir d'una electroforesi unidimensional. Aquesta tècnica permet separar les proteïnes en funció del seu pes molecular al llarg d'un gel de poliacrilamida a partir de l'aplicació d'un camp elèctric.

Inicialment, els pèl·lets obtinguts a partir de les 150 µg proteïnes precipitades, es van resuspendre per poder obtenir una mescla soluble i poder carregar els gels d'electroforesi:

- Cada pèl·let es va resuspendre en un volum de 14 µL amb 10% DL-Ditiotreitol (DTT) + 25% Tampó de mostra (TMx2) ajustat amb aigua ultrapura

$$(14 \mu\text{L} = 3.5\mu\text{L TMx2} + 9.1 \mu\text{L H}_2\text{OmiliQ} + 1.4 \mu\text{L DTT})$$

MATERIAL I MÈTODES

El DTT redueix els enllaços disulfur de les proteïnes permetent el seu desplegament i afavorint d'aquesta manera la seva mobilitat durant l'electroforesi d'acord amb el seu pes molecular. El tampó equilibra elèctricament la mostra i conté blau de bromoferol, el qual és un marcador que indica el recorregut de la mostra a través del gel de poliacrilamida.

- Es va mantenir la mostra durant 10 minuts a 70°C.

Per portar a terme l'electroforesi es van utilitzar gels comercials d'electroforesi al 12% de poliacrilamida (BIORAD 12% Tris-Glycine SDS-PAGE) per aconseguir la màxima homogeneïtat dels diferents gels seguint els protocols habituals:

- Es van col·locar els gels a la cubeta i es va afegir el tampó de correguda (*running buffer*) compost per x10 25mM Tris, 192 mM Glicina, 0.1% de dodecilsulfat sòdic (SDS), a pH 8.3, agent més habitual per desnaturalitzar proteïnes. Aquest tampó carregat elèctricament permet la migració de les proteïnes al llarg del gel en el moment que s'aplica una corrent elèctrica (Figura 17).

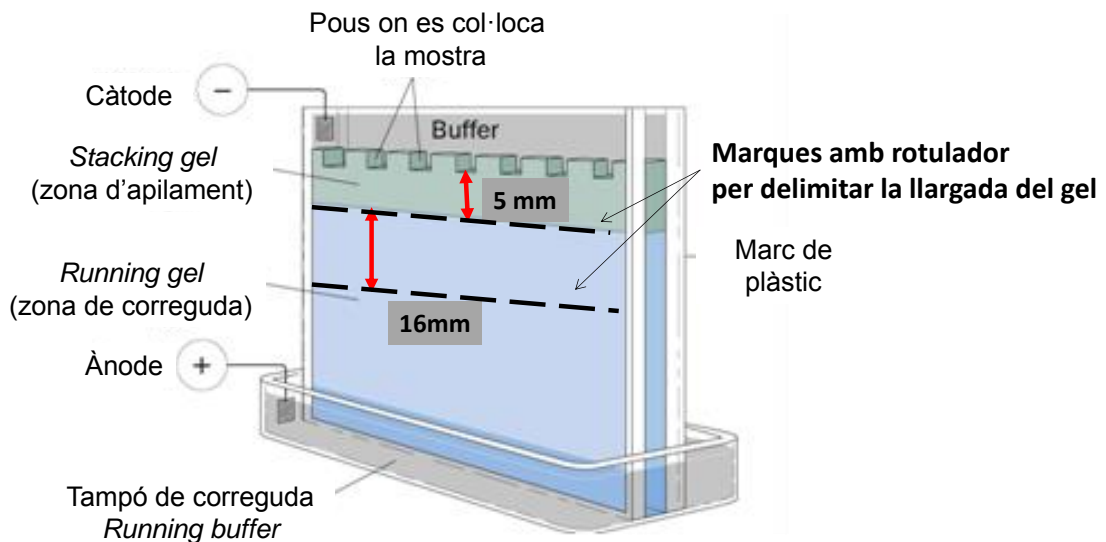


Figura 17: Descripció gràfica del gel de poliacrilamida d'electroforesi unidimensional.

- Es va afegir un marcador de referència de pes molecular de les proteïnes (Standard SeeBlue 3.5 µL).
- Es van injectar els 14 µL de mostra a cada pou utilitzant unes puntes de pipetes especials (Miniflex Round Sterile de Sorenson, ref. 15110) i així evitar la contaminació dels pous contigus i la pèrdua de mostra.

- L'electroforesi es va dur a terme durant 1 hora a 50W constants, condicions necessàries perquè el front blau de bromofenol avancés 1.8 cm en una solució de tampó *running buffer*. Després de l'electroforesi, cada gel es va fixar durant 2 hores amb 200 mL de solució de fixació (30% etanol, 10% d'àcid acètic i 60% d'aigua ultrapura), a rotació constant. El temps prolongat de fixació es va establir per assegurar la màxima fixació de les proteïnes al gel.

3.2.2.5 Tinció dels gel de poliacrilamida amb nitrat de plata

Una vegada fixades les proteïnes al gel, es va procedir a la seva tinció. Existeixen molts protocols de tinció (Comassie, Flamingo, Plata, etc). Per aquest projecte es va optar per la tinció amb nitrat de plata per la seva alta sensibilitat, la qual ens permetia comprovar la pèrdua de proteïna per contaminació en el gel i per la mínima interferència posterior del nitrat de plata amb l'anàlisi per MS/MS. Durant cada etapa del protocol de tinció, els gels es submergien en la solució corresponent, en recipients de vidre adequats de mida i es mantenien en agitació constant sobre un agitador orbital. Durant tot el procés de tinció es van complir rigorosament els temps de rentat, tinció, revelat, per tal de mantenir les mides del gel estàndards i evitar la variabilitat entre gels.

- Es va rentar els gels submergits en la solució de fixació, utilitzant 3 rentats de 20 minuts cada un amb el 30% d'etanol i posteriorment 3 rentats amb aigua ultra pura de 20 segons cada un.
- Després d'aquests rentats, els gels es van preparar per la tinció amb 250mL de solució de sensibilització (0.02% Tiosulfat Sòdic) durant un minut.
- Posteriorment es va rentar el gel tres vegades amb aigua ultra pura durant 20 segons cada rentat.
- A continuació, es va deixar incubar el gel en 200mL de solució de tinció amb nitrat de plata (0.4g de AgNO₃ en 200mL H₂O) durant 20 minuts, protegit de la llum.
- Posteriorment es va eliminar l'excés de nitrat de plata amb aigua ultra pura fent 3 rentats de 20 segons cada un.
- Es va revelar la tinció deixant incubar el gel amb 100 mL de solució de revelat (6% Carbonat Sòdic + 0.0004% Tiosulfat Sòdic + 18.5% formaldehid 37%) durant 5 minuts fins que les bandes del gel es va veure que apareixien.

- Per parar el revelat es va rentar el gel amb aigua ultra pura fent 2 rentats de 2 minuts cada un.
- Finalment es va fixar la tinció amb la mateixa solució de fixació anterior (30% etanol, 10% d'àcid acètic i 60% d'aigua ultrapura) durant 10 minuts. Posteriorment els gels es van escanejar en escàners convencionals per tal de tenir un control individual de cada mostra.

3.2.2.6 Retall de les proteïnes de la mostra

Immediatament després de la tinció dels gels i revelat, es va procedir a retallar les proteïnes de cada gel. Es va dissenyar un motlle d'acer inoxidable a mida de 16x3 mm (48mm²), amb l'objectiu d'obtenir la major quantitat del plasma fraccionat de la manera més homogènia entre tots els gels. Cada carril es va dividir en 48 fraccions cúbiques, de 1 mm³ (mida òptima per una digestió peptídica en placa), i cada fracció es va dispensar en un pouet d'una placa de digestió de 96 pous (Isogen Life Science, *ref. PRO10003*), com es mostra a la figura 18.

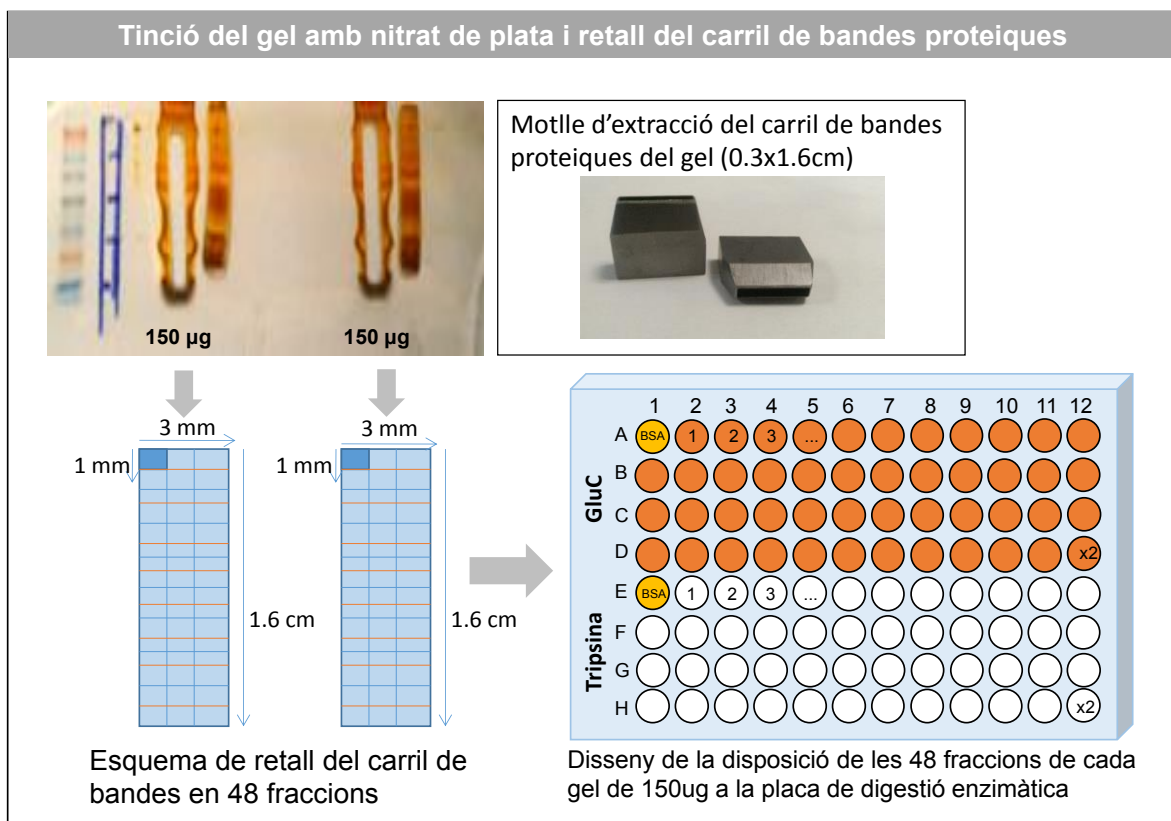


Figura 18. Protocol extracció del carril de bandes proteiques del gel de poliacrilamida amb el motlle dissenyat pel laboratori IGTP. Esquema del retall en 48 fraccions i disposició estratègica de cada fracció cúbica dels 2 gels de 150ug a la placa de digestió enzimàtica per la proteòlisi amb dos enzims (tripsina + gluC). Anotar que en el darrer pouet es van col·locar dues fraccions per tal de distribuir les 48 fraccions en 47 pouets més l'albumina sèrica bobina (BSA).

3.2.2.7 Digestió peptídica

Per tal d'obtenir el màxim nombre de fragments peptídics a analitzar, es va procedir a la digestió enzimàtica de les proteïnes mitjançant enzims proteolítics anomenats peptidases. La digestió enzimàtica es va realitzar amb dos enzims diferents (tripsina i GluC) amb l'objectiu d'obtenir el màxim rendiment i assegurar la detecció del màxim nombre de proteïnes diferents per MS/MS. Es va utilitzar tripsina porcina (Promega, *ref. V511A*), enzim pancreàtic que trenca els enllaços peptídics arginina o lisina de la cadena. Aquest enzim actua en un medi amb unes condicions específiques de pH 8.0 i temperatura 37°C. Per tal d'aconseguir aquestes condicions el medi s'ha de tamponar amb una solució de bicarbonat amoni (ABC) a pH 8, 50mM. La GluC és una endoproteïnasa (*Staphylococcus aureus* Protease V8 expressada al *Bacillus subtilis*) del grup de les serines que s'uneix selectivament als pèptids C-terminal dels residus d'àcid glutàmic i àcid aspàrtic. Les millors condicions d'actuació d'aquest enzim és en un medi a pH 7.8 i a 37°C. Per tal d'aconseguir aquest pH el medi es condiona amb una solució de tampó fosfat a pH 7.8 a 0.1M. La digestió enzimàtica es va realitzar en les 30 mostres de manera manual i no automatitzada, per assegurar l'òptima digestió de cada fragment de gel. Tot el procediment es va realitzar sota una campana d'aire a pressió negativa, per assegurar al màxim les condicions d'asèpsia i evitar la contaminació. El protocol de digestió es detalla a continuació.

- Les 48 fraccions cúbiques del gel de poliacrilamida es col·locaven en una placa de digestió de 96 pous, de manera que una mateixa placa permetia digerir una mostra amb dos enzims diferents al mateix moment (48 fraccions de gel per tripsina i 48 fraccions de gel per GluC). Per cada digestió, es digerien a més 800 fmols d'albúmina sèrica bovina (ABS) com a control. Anotar que en el darrer pouet es van col·locar dues fraccions per tal de distribuir les 48 fraccions en 47 pouets més el BSA.
- Les fraccions obtingudes de cada gel es van sotmetre a uns rentats per acondicionar el medi i una posterior deshidratació amb acetonitril (ACN):
 - primer rentat amb 250 µL de tampó ABC a 25 mM i pH 8 o tampó fosfat 0.1 M i pH 7.8 segons si l'enzim utilitzat per a la digestió era tripsina o GluC respectivament.
 - deshidratació de les fraccions proteiques amb 250 µL d'acetonitril 100% (ACN) durant 15 minuts

- novament 4 rentats alterns de 50 μL de tampó condicionador i 50 μL d'ACN 100% de 10 minuts cada un.
- Després dels rentats repetits, les fraccions de gel s'incubaven 1 hora amb 10 μL de DTT (1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 10mM) a 60°C
- Seguidament s'incubaven amb 10 μL de iodoacetamida (18.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 100mM) durant 30 minuts a temperatura ambient i protegits de la llum, amb l'objectiu de bloquejar els ponts disulfur.
- Posteriorment, el gel es tornava a sotmetre a 6 rentats repetits amb 100 μL dels tampons condicionadors (ABC 50 mM pH 8 o tampó fosfat 0.1 M pH 7.8) alterns amb 100 μL d'ACN 100%.
- Abans d'afegir els enzims proteolítics, el gel es va assecar durant 10 minuts a 37°C per assegurar la màxima evaporació de les possibles restes d'ACN.
- Seguidament es van rehidratar els trossets de gel amb 10 μL de solució d'enzim proteolític (20 μg enzim liofilitzat de tripsina amb 1300 μL ABC 25 mM pH 8, o 15 μL GluC a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ amb 985 μL tampó fosfat 100 mM pH 7.8) juntament amb 10 μL de tampó condicionador (25 mM ABC pH 8 o 0.1 M tampó fosfat pH 7.8) i es va deixar actuar la reacció proteolítica durant 14h a 37°C.
- La digestió es va aturar amb l'acidificació i disminució de temperatura del medi amb àcid fòrmic al 1% (5 μL) a 4°C durant 5 minuts.

Els pèptids digerits es van extreure mitjançant una solució d'extracció (10 μL de 50% ACN i 50% àcid fòrmic) durant 10 minuts i posteriorment amb 10 μL d'àcid fòrmic al 1% durant 10 minuts. Els pèptids s'assecaven utilitzant la centrifuga al buit. Els pèl·lets de pèptids es reconstituïen amb àcid acètic al 1% (10 μL) unint-se el contingut de les dues digestions amb els dos enzims abans del següent pas.

3.2.2.8 Fraccionament dels pèptids digerits amb cromatografia líquida

Una vegada obtinguts els composts de pèptids procedents de les proteïnes digerides, es va procedir a un segon fraccionament de la mostra mitjançant cromatografia líquida. Es va utilitzar un aparell de cromatografia líquida d'alt rendiment (*High-performance liquid chromatography*, HPLC) NanoLC-ULTRA-AS2-EKSIGENT, el qual estava acoblat a una columna preanalítica C18-PepMap-300 μm ID-5mm-5 μm i una columna analítica Easy column-L10cm-ID75 μm -3 μm -120^a. Els pèptids digerits i resuspendos en àcid acètic

s'injectaven (8 uL) a la nano-columna de fase reversa C-18 i es separaven utilitzant un gradient lineal de 120 minuts passant de 5 a 100% del solvent A (3% Acetonitril-0,1% àcid fòrmic) al solvent B (97% Acetonitril-0,1% àcid fòrmic) aplicant-se un flux de 400 nL/minut.

3.2.2.9 Anàlisi proteòmic per espectrometria de masses i identificació proteica

Les diferents fraccions de pèptids eluïts de la nano-columna es van analitzar per MS/MS utilitzant el l'aparell Orbitrap (LTQ-VELOS-Orbitrap, Thermo Fisher) a una resolució de 30000 FWHM a m/z de 400 i utilitzant el rang d'anàlisi de 400 a 1500 m/z. Els espectres identificats es van caracteritzar utilitzant el motor de cerca SEQUEST, el qual es va configurar per fer la cerca a la base de dades pública UniProt_Release2012_03/HUMAN_UP_SP_r_2012-03. Es va limitar la cerca a proteïnes humanes (taxonomia *homo sapiens*). Els paràmetres SEQUEST utilitzats foren els resumits a la taula 5. Per validar les identifications de pèptids i proteïnes de l'anàlisi de MS/MS es va utilitzar el programa Proteome Discoverer software v1.4 (Thermo). S'acceptaren aquells pèptids dels quals la probabilitat d'identificació era major del 99%.

Taula 5: Paràmetres SEQUEST	
Enzims de proteòlisi*	Tripsina i GluC
Possibles errors de trencament dins el pèptid (<i>missed cleavage</i>)	2
Llargada del pèptid	7 aa
Modificacions fixes	Carbamidometilació a C
Modificacions variables	Oxidació a M, AEBS a H,K,S,Y (+183.035 Da)
Tolerància dels fragments	0.8 Da
Tolerància de massa del precursor	25ppm
Diferencial màxim de modificacions per aminoàcid	2
Score Delta CN	0.05
Mínim nombre de pics en un espectre	10
Relació entre soroll de fons i pic identificat (<i>signal to noise</i>)	10

* Les cerques es feien amb dos enzims diferents indicant que l'enzim era tripsina o tripsina + GluC

Per tal de ser el màxim rigorosos i evitar la identificació de proteïnes compostes amb pèptids compartits en més d'una proteïna, es va restringir l'anàlisi a només aquelles proteïnes identificades amb almenys 2 pèptids únics. Es va treballar en tot moment amb proteïnes desagrupades per evitar falsos positius en les comparacions. Tres exemples de selecció es mostren a la figura 19.

Proteïnes	Pèptid únic	Pèptid únic	Pèptids compartits, redundants	Pèptid únic
P08603	SQYTYALKE -TGDEITYQCR	CLHPCVISR	RPYFPVAVGK - CYFPYLENGYNQNYGR - EIMENYNIALR	
Q02985			RPYFPVAVGK - CYFPYLENGYNQNYGR	
Q03591		CLHPCVISR	EIMENYNIALR -TGSAEFVCK

Figura 19. Exemple de 3 proteïnes amb pèptids compartits o redundants i pèptids únics: la primera proteïna P08603 identificada amb 6 pèptids, 2 d'ells únics, es va incloure a l'estudi proteòmic; la proteïna Q02985 identificada amb dos pèptids redundants compartits amb una altra proteïna, no es va incloure a l'estudi proteòmic; i la proteïna Q03591 identificada amb 3 pèptids, dos dels quals eren redundants amb altres proteïnes i un era únic, tampoc es va incloure. Tots els pèptids contenien almenys 7 aminoàcids com es van establir als paràmetres de cerca.

3.2.2.10 Anàlisi de les dades proteòmiques del plasma obtingudes per HPLC-MS/MS

La part de l'anàlisi bioestadística es va dur a terme al departament de proteòmica de la Universitat de Barcelona i es va completar al Department of Liver Cancer a l'Hôpital Hépatobiliaire Paul Brousse de Villejuif, França. El processat i l'anàlisi de dades es va realitzar amb el programa de càlcul Excel 2013 per Windows on es va exportar tota la informació de cada proteïna identificada amb el nombre de pèptids i espectres assignats procedent del programa Proteome Discoverer versió 1.4. Es va construir una macro Excel que relacionava les dades obtingudes de cada una de les 30 mostres.

Inicialment es va realitzar una normalització dels espectres de cada proteïna pels espectres totals de cada mostra, amb l'objectiu de minimitzar les variacions entre mostres¹⁹⁸. Aquestes possibles variacions de la mostra podien ser degudes a varis factors com ara al fet que cada mostra estava fraccionada en 47 parts, l'anàlisi de les quals comprenia més de 72 hores totals per la seqüenciació de pèptids, marge molt ampli que podia afavorir les variacions internes del procés automàtic.

Posteriorment, es va obtenir els espectres per cada proteïna a partir dels pèptids identificats. Aquest pas es va realitzar sumant els espectres de cada pèptid únic identificat de cada proteïna, com s'esquematitza a la figura 20.

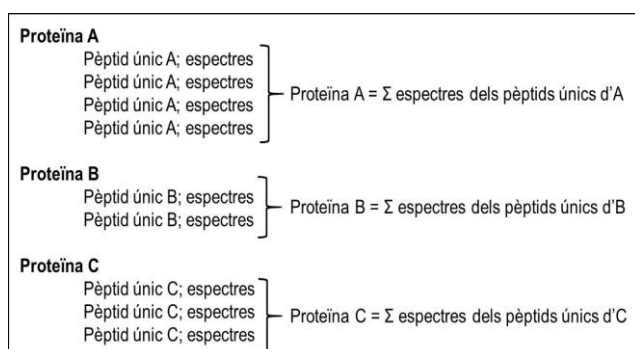


Figura 20. Esquema representatiu de l'obtenció d'espectres totals de cada proteïna identificada amb mínim dos pèptids únics. Per obtenir la suma total d'espectres de cada proteïna es van sumar els espectres de cada pèptid únic de cada proteïna.

3.2.3 Estudi de les dades proteòmiques del plasma: estudi dels diferents perfils proteics

3.2.3.1 Anàlisi no supervisada de les dades

Es va estudiar si les dades obtingudes per HPLC-MS/MS eren capaces de separar de manera no supervisada els grups de mostres i agrupar en funció de les diferents característiques (segons funció hepàtica i estadi tumoral). Inicialment es va realitzar un anàlisi de clúster o d'agrupació jeràrquica (*Hierarchical clustering*) calculat amb la distància de correlació de Pearson's de les dades transformades a logaritme 2. L'anàlisi es va realitzar utilitzant el programa R (v 3.1.1) amb el paquet estandarditzat Scatterplot3d. A banda es van representar les mostres agrupades en un espai de dues dimensions mitjançant un anàlisi de components principals (ACP). Per realitzar l'ACP dels resultats es va utilitzar el programa STATAtransfer per transformar les dades en format excel a format .txt i el programa STATA versió 11 per la realització dels ACP.

3.2.3.1 Anàlisi supervisada de les dades

Es van comparar els 5 grups de l'estudi per tal d'identificar perfils proteics diferencials entre controls/voluntaris sans, pacients amb diferents graus d'hepatopatia crònica amb i sense tumor. Els grups comparats van ser els següents:

➤ **Marcadors de malaltia hepàtica**

Es van realitzar tres comparatives per tal d'identificar un conjunt de proteïnes diferencials segons el grau de funció hepàtica. Així, es va comparar el grup "SA" amb el grup de pacients amb hepatitis crònica "HC"; el grup "HC" amb el grup de pacients cirròtics sense tumor "CIR" Child Pugh A i el grup cirròtic Child Pugh B.

➤ **Marcadors tumorals de CHC**

Es va comparar el grup de pacients amb cirrosi sense tumor "CIR amb el grup de pacients cirròtics amb CHC, tant inicial com avançat. Amb l'objectiu d'acotar i poder distingir un perfil proteic de tumor inicial diferent al perfil proteic de tumor avançat es van comparar dos subgrups de pacients seleccionats.

- **Marcadors de tumor inicial:** pacients cirròtics sense tumor ("CIR") comparat amb pacients cirròtics amb tumor inicial ("CHC-i")

- **Marcadors de tumor disseminat:** pacients cirròtics amb tumor inicial (“CHC-i”) comparat amb pacients cirròtics amb tumor avançat (“CHC-a”).

La diferència d’abundància de les proteïnes identificades entre les condicions biològiques d’estudi es va establir utilitzant el mètode *Spectral Index* (Spl), proposat per Heinecke i col·laboradors¹⁹⁹. Aquest mètode es va desenvolupar en el context de la quantificació sense marcatge utilitzant tècniques de *spectral count* o quantificació d’espectres. La fórmula de Spl que es va seguir es representa a la figura 21 amb dos exemples d’anàlisi:

$$\text{a) Spectral Index} = \left(\frac{S_{\text{CHC-i}}}{S_{\text{CHC-i}} + S_{\text{CIR}}} \times \frac{N_{\text{CHC-i}}}{NT_{\text{CHC-i}}} \right) - \left(\frac{S_{\text{CIR}}}{S_{\text{CHC-i}} + S_{\text{CIR}}} \times \frac{N_{\text{CIR}}}{NT_{\text{CIR}}} \right)$$

$$\text{b) Spectral Index} = \left(\frac{S_{\text{CHC-a}}}{S_{\text{CHC-a}} + S_{\text{CHC-i}}} \times \frac{N_{\text{CHC-a}}}{NT_{\text{CHC-a}}} \right) - \left(\frac{S_{\text{CHC-i}}}{S_{\text{CHC-a}} + S_{\text{CHC-i}}} \times \frac{N_{\text{CHC-i}}}{NT_{\text{CHC-i}}} \right)$$

Figura 21: Fórmula utilitzada del mètode bioestadístic *Spectral Index* per identificar per exemple biomarcadors diagnòstic de CHC inicial (fórmula a) i CHC disseminat (fórmula b). S: mitja d’espectres per cada proteïna identificada; N: nombre de subjectes on s’identificava la proteïna analitzada; NT: nombre total de subjectes de cada grup. Grups analitzats: CIR: grup de pacients cirròtics sense tumor Child Pugh A; CHC-a: grup de pacients cirròtics amb carcinoma hepatocel·lular (CHC) avançat Child Pugh A; CHC-i: grup de pacients cirròtics amb carcinoma hepatocel·lular (CHC) inicial Child Pugh A.

El valor de Spl es localitzava en un rang entre -1 o +1; indicant els valors pròxims a zero una abundància relativa de la proteïna igual entre els dos grups d’anàlisi. En canvi, valors positius suggerien un enriquiment de les proteïnes d’interès al grup de pacients cas (p. ex. pacients amb CHC), i pel contrari, valors negatius suggerien enriquiment de les proteïnes del grup control (p. ex. pacients cirròtics sense CHC).

Distingir la diferència real entre l’abundància proteica entre grups i la variació experimental d’espectres és important perquè els anàlisis d’alt rendiment proteic (*shotgun analysis*) identifiquen centenars de pèptids i hi ha molts factors que poden afectar aquesta identificació. El mètode Spl no estableix cap suposició estadística sobre la distribució, per tant es va utilitzar l’anàlisi de permutació per distingir entre un veritable canvi en l’abundància de proteïnes i establir intervals de confiança per a l’expressió diferencial de proteïnes. Per abordar aquest tema, es va determinar al freqüència de distribució dels Spl per les proteïnes detectades al plasma de les 30 mostres analitzades, on les cues de la

distribució indicaven les proteïnes selectivament enriquides en els dos grups estudiats. Per determinar el punt de tall vàlid significatiu de Spl, es va realitzar un anàlisi de permutació aleatoritzada per construir la distribució nul·la. El perfil proteic de cada grup d'anàlisi es va permutar 1000 vegades, i el Spl de cada proteïna es va calcular per cada permutació. Posteriorment es van seleccionar els Spl que es trobaven fora de l'interval de confiança del 95% i 99%, que era igual a la mitja dels Spl de les dades originals ± 1.96 i ± 2.57 vegades la desviació estàndard de les dades permutades, respectivament (Figura 22).

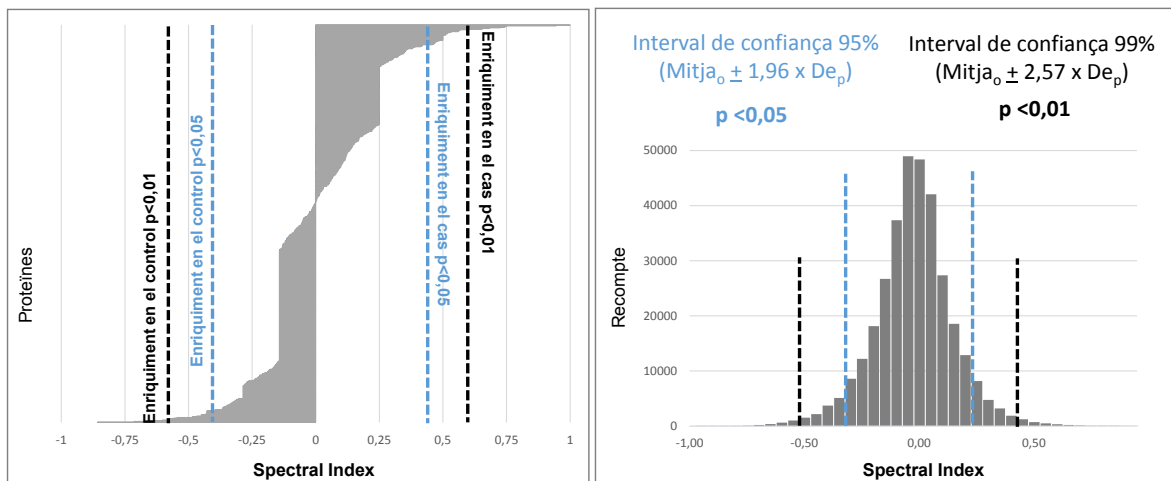


Figura 22. Exemple d'una distribució nul·la amb els límits que inclouen l'interval de confiança del 95% i 99% dels Spl, calculats a partir de la mitja de les dades originals ± 1.96 i ± 2.57 vegades la desviació estàndard de les dades permutades respectivament (DE_p).

Les proteïnes diferencials entre els grups es van representar en una matriu gradual de colors utilitzant un mapa de calor (*heatmap*) amb el programa dChip 2007.

3.2.2.11 Anàlisi d'enriquiment funcional

L'anàlisi de processos biològics basats en *Gene Ontology* (GO) es va realitzar utilitzant els recursos bioinformàtics i programes d'accés públic GeneCodis3 (<http://genecodis.cnb.csic.es/webservices>) i DAVID v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>). La localització cel·lular de cada proteïna es va establir utilitzant les bases de dades públiques NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), UniProt (<http://www.uniprot.org/>), GeneCodis3 i de QIAGEN Redwood City. Es va utilitzar utilitzat l'eina *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA®) (www.ingenuity.com) per identificar les vies de senyalització i els principals reguladors d'aquestes més rellevants a partir del llistat de proteïnes diferencialment

identificades a partir de l'anàlisi supervisada entre els grups de mostres amb diferents graus de malaltia hepàtica així com entre pacients amb i sense tumor. Les dades publicades sobre cada marcador es van extreure de la base de dades pública PubMed.

3.3 OBJECTIU 2: Identificació i validació de potencials biomarcadors plasmàtics diagnòstic de CHC

3.3.1 Identificació de biomarcadors de CHC a partir de l'estudi dels perfils proteics

Es van realitzar dues aproximacions metodològiques (anàlisi qualitativa i anàlisi quantitativa) per tal d'identificar potencials biomarcadors de diagnòstic precoç i de malaltia disseminada.

3.3.1.1 Anàlisi quantitativa

Per tal d'identificar marcadors de CHC precoç es va comparar el perfil proteic de les mostres de pacients cirròtics sense tumor ("CIR") vers mostres de pacients cirròtics amb CHC inicial ("CHC-i"). I per tal d'identificar marcadors de CHC avançat es va comparar el perfil proteic de les mostres de pacients amb CHC inicial ("CHC-i") vers CHC avançat ("CHC-a").

Per identificar les diferències d'abundància entre grups es va aplicar el mètode Spl anteriorment explicat, i un anàlisi de permutació per tal d'establir la distribució nul·la i seleccionar els punts de tall significatius.

Tot i que el mètode Spl té en compte l'abundància relativa de proteïnes detectades dins un grup d'anàlisi, a l'hora d'escollir els millors biomarcadors per validar amb la tècnica d'ELISA, es van aplicar filtres arbitraris per acotar el nombre de biomarcadors i assegurar uns resultats més robustos: a) es van seleccionar només aquelles proteïnes que s'identificaven en més del 50% de les mostres del grup on estava enriquida la proteïna, seguint el principi que el CHC és un tumor heterogeni i per tant només eren d'interès les proteïnes constantment abundants, i per abolir el factor atzar de la detecció per HPLC-MS/MS; b) es van seleccionar els biomarcadors que s'identificaven de manera més abundant en el

plasma de pacients on la proteïna es trobava enriquida, establint arbitràriament el punt de tall d'un enriquiment del doble (≥ 2 o ≤ 0.5).

3.3.1.2 Anàlisi qualitativa

Es van identificar els marcadors potencialment secretats directament pel tumor, restringint l'anàlisi a aquelles proteïnes només identificades en el plasma de pacients cirròtics amb CHC inicial i CHC avançat. Amb l'objectiu d'identificar aquells marcadors de CHC inicial, es van seleccionar només aquells marcadors que es representaven com a mínim en un 30% dels CHC inicials (3/9 CHC-i). Amb l'objectiu d'identificar marcadors de CHC disseminat es van seleccionar aquells marcadors que s'identificaven en al menys al 50% dels tumors avançats ($\geq 3/6$ CHC avançat).

3.3.2 Validació dels biomarcadors mitjançant la tècnica ELISA

El nivell plasmàtic dels biomarcadors escollits es va determinar utilitzant la tècnica d'ELISA. Es van utilitzar els anticossos específics contra la proteïna a detectar, seguint rigorosament les especificacions del comerciant. En general, per la majoria d'ELISAs es segueixen els passos següents:

- Inicialment es va sembrar l'anticòs de captura a la placa (100 μ L/pou) diluït amb tampó carbonat (2 μ g/mL) i es va deixar incubar tota la nit a 4°C.
- Completada la incubació, es va netejar la placa evocant el sobrenedant i rentant cada pou 3 vegades amb 200 μ L de 0.05% Tween[®]20 en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4).
- A continuació es van bloquejar les unions no específiques de l'anticòs administrant 200 μ L/pou d'ABS al 1% en PBS pH 7.2-7.4 (10x).
- Es va deixar incubar 1 hora a temperatura ambient tapant la placa amb parafilm per evitar l'evaporació.
- Es va netejar la placa seguint els mateixos passos anteriorment descrits
- Es van administrar 100 μ L/pou de mostra o corba estàndard, i es va deixar incubar 2 hores a temperatura ambient.
- Novament es va netejar la placa seguint els mateixos passos anteriorment descrits

- Es van administrar 100 µL/pou de l'anticòs de detecció diluït en ABS al 1% en PBS pH 7.2-7.4 (10x) (200 ng/mL) i es va deixar incubar 1 hora a temperatura ambient.
- Es va netejar la placa seguint els mateixos passos anteriorment descrits
- Es van afegir 100uL/pou de *Streptavidin* HRP (dissolta en ABS al 1% en PBS pH 7.2-7.4 10x a 1:200) i es va deixar incubar 20 minuts a temperatura ambient.
- Es va tornar a netejar la placa seguint els mateixos passos anteriorment descrits, aquesta vegada repetint el protocol 4 vegades per assegurar la neteja total.
- Seguidament es van administrar 50uL/pou de *Tetramethylbenzidine* i es va deixar incubar 20 minuts a temperatura ambient i protegit de la llum.
- La reacció es va aturar administrant 50uL/pou d'àcid sulfúric directament sense diluir.

Les incubacions es van realitzar a temperatura ambient i agitació suau, tapant la placa amb parafilm per evitar l'evaporació.

La lectura de la placa es va fer al Varioskan a dues longituds d'ona per la correcció del plàstic de la placa (450 i 570) durant 10 milisegons.

3.3.2.1 Anàlisi estadística dels resultats d'ELISA

Per la descripció de les dades obtingudes a partir de l'estudi d'ELISA es van descriure les variables categòriques mitjançant freqüències relatives i les contínues mitjançant la mitja i desviació estàndar (DE). Per valorar diferències significatives bivariades es va utilitzar el test no paramètric U-Mann Whithney davant la poca quantitat de mostres analitzades, on no es podia garantir la distribució normal de la mostra. Pels biomarcadors escollits es van utilitzar corbes ROC, determinant l'àrea sota la corba en diferents combinacions de casos i controls. Es va escollir el punt de tall òptim que donava màxima sensibilitat i especificitat per a cada marcador.

RESULTATS

4 RESULTATS

4.1 Establiment d'una col·lecció de mostres de plasma de pacients amb diferents graus de malaltia hepàtica amb i sense tumor així com de voluntaris sans

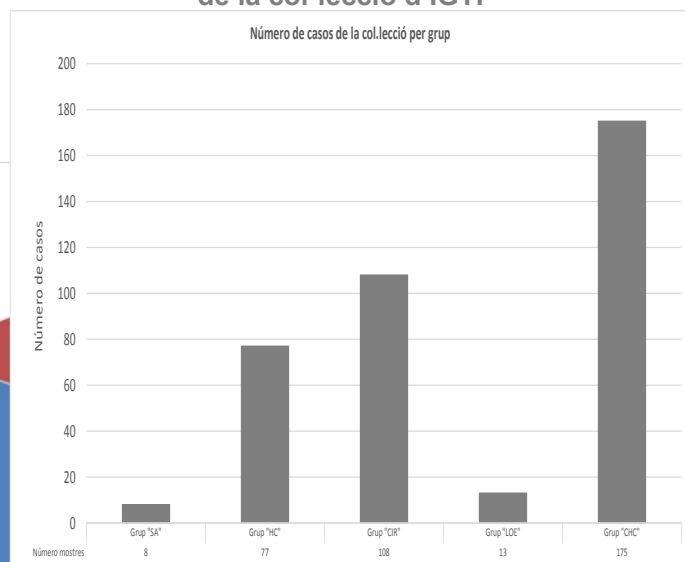
L'establiment d'aquesta col·lecció va ser clau per poder complir els objectius 1 i 2 d'aquesta tesi. En aquest sentit, gràcies a la col·lecció d'un gran nombre de mostres, es van poder escollir els millors grups de pacients a partir dels quals fer l'estudi proteòmic i la identificació de potencials biomarcadors diagnòstic del CHC.

4.1.1 Descripció de la col·lecció de mostres de plasma.

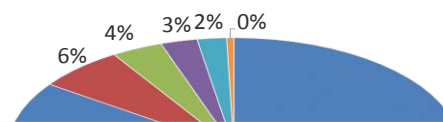
Es van incloure un total de 373 pacients amb diferents graus d'hepatopatia crònica amb i sense CHC i 8 voluntaris sans (figura 23). A la Taula 6 es descriuen les característiques clíniques de cada grup de pacients. En el moment inicial de la inclusió a l'estudi, 185 pacients tenien malaltia hepàtica sense tumor, dels quals 108 pacients presentaven una cirrosi establerta. Cent setanta-cinc pacients (45.9%) tenien un CHC diagnosticat *de novo* en el moment de la inclusió, i 13 pacients presentaven un nòdul hepàtic no diagnosticat ni per tècniques d'imatge ni histològiques. La majoria de pacients inclosos eren homes (68.38%), i edat mitja de 63.4 anys. L'etiologia de la malaltia hepàtica més prevalent va ser el VHC (58%) seguit del consum d'acohol únicament (18%) o concomitant amb VHC (7%). Tots els pacients amb hepatitis crònica estaven infectats per VHC, ja que la inclusió d'aquests pacients es realitzava a consultes externes durant el seguiment després del fracàs del tractament antiviral o a l'espera d'iniciar tractament en pacients naïve. Respecte el grau d'alteració de la funció hepatocel·lular, destacar que la majoria de pacients presentaven una disfunció lleu (Child Pugh A 72%). Referent als pacients amb CHC (Taula 7), més de la meitat dels pacients amb diagnòstic de CHC en el moment de la inclusió presentaven un CHC en estadi molt inicial o inicial (57.1%), 30 dels quals eren nòduls únics de menys de 20mm de diàmetre i 54 CHC entre 20 i 50 mm de diàmetre. Van rebre tractament curatiu 73 pacients.

RESULTATS

Nombre de mostres de plasma de la col·lecció d'IGTP



Procedència de les mostres de plasma de la col·lecció d'IGTP



Procedència de les m

- HUGTIP (n=323)
- H. Dr Josep Trueta, Girona (n=24)
- H. Parc Taulí, Sabadell (n=14)
- H. del Mar, Barcelona (n=10)
- H. Puerta de Hierro, Majadahonda (n=8)
- H. La Fe, València (n=2)

Procedència de les mostres de plasma

- HUGTIP (n=323)
- H. Dr Josep Trueta, Girona (n=24)
- H. Parc Taulí, Sabadell (n=14)
- H. del Mar, Barcelona (n=10)
- H. Puerta de Hierro, Majadahonda (n=8)
- H. La Fe, València (n=2)

Figura 23: Nombre de mostres de plasma de cada grup de la col·lecció de l'IGTP (histograma de l'esquerre), i procedència de les mostres (figura de la dreta).

Taula 6: Descripció de les característiques clíniques dels 381 participants a partir dels quals es van obtenir mostres biològiques

	GRUP "SA"	GRUP "HC"	GRUP "CIR"	GRUP "LOE"	GRUP "CHC"
	SANS N=8 (%)	HEPATITIS CRÒNICA N=77 (%)	CIRROSI N=108 (%)	LESIÓ EN ESTUDI N=13 (%)	CARCINOMA HEPATOCEL·LULAR N=175 (%)
Homes	4 (50)	47 (61.0)	62 (57.4)	10 (76.9)	143 (81.7)
EDAT, mitjana en anys (RIQ)	59 (52-66.5)	58 (46.5-65)	64.5 (55-72)	63 (54.5-71)	68 (60-75.7)
Característiques clíniques					
CHILD PUGH:					
A			80 (74.1)	12 (92.3)	137 (78.3)
B			28 (25.9)	1 (7.7)	34 (19.4)
C			0 (0)	0 (0)	4 (2.3)
Etiologia de la cirrosi:					
VHC		71 (92.2)	70 (64.9)	5 (38.4)	80 (45.7)
VHB		-	1 (0.9)	1 (7.7)	8 (4.6)
Alcohol		-	14 (13.0)	3 (23.1)	53 (30.2)
MMNA		-	4 (3.7)	0 (0)	7 (4)
Altres*		-	2 (1.8)	1 (7.7)	5 (2.8)
VHC + VHB		-	-	-	1 (0.6)
VHC + alcohol		5 (6.5)	12 (11.1)	3 (23.1)	7 (4)
VHB + alcohol		-	3 (2.8)	-	3 (1.7)
VHC + VHB + alcohol		-	-	-	1 (0.6)
VHC + VIH		1 (1.3)	2 (1.8)	-	9 (5.1)
VHB + VIH		-	-	-	1 (0.6)

RESULTATS

Paràmetres de laboratori, mitjana (RIQ)					
AFP ng/mL (ND=32)	3.7 (2.6-5.9)	3.4 (2.3-5.0)	5.0 (3.1-10.0)	6.0 (4.8-13.6)	13.2 (4.3-76.6)
GGT U/L (ND=14)	19.5 (14.7-25.2)	56.5 (32.2-95.2)	69 (41-149)	96 (64.5-152)	105 (64.5-203.5)
AST U/L (ND=12)	18.5 (17.2-23.5)	40 (29.5-63.2)	61 (45.5-96.7)	47 (31.5-94)	57 (38-102)
ALT U/L (ND=5)	17.5 (16-26.2)	53 (35.2-83.2)	54 (28-107)	30 (24-94.5)	50 (31-87.7)
FA U/L (ND=10)	64 (54-71)	68 (58-80)	89 (71-122)	94 (83.5-160)	100 (75.7-141.2)
Bilirubina total mg/mL (ND=7)	0.45 (0.28-0.61)	0.5 (0.4-0.7)	0.9 (0.7-1.4)	1.05 (0.64-1.42)	0.88 (0.60-1.40)
Plaquetes mil/ μ L (ND=4)	214 (183-311)	201 (161-235)	97 (72-135)	107 (78-142.5)	119 (78.2-172.7)
Estimació dany hepàtic					
Índex de fibrosi:					
APRI (ND=62)		0.57 (0.39-0.93)	1.9 (1.1-3.1)	1.2 (0.7-2.7)	1.4 (0.7-3.1)
Forns (ND=107)		6.1 (5.4-6.9)	9.4 (7.8-10.1)	8.3 (7.2-9.1)	8.8 (7.3-10.2)
FIB4 (ND=64)		1.7 (1.2-2.4)	5.7 (3.7-8.1)	3.8 (2.3-5.5)	4.8 (3.0-8.3)
Fibrosi avançada:					
APRI >1.50		1 (1.3)	56 (59.6)	3 (42.9)	64 (45.1)
Forns >6.9		18 (25.0)	83 (90.2)	6 (85.7)	83 (80.6)
FIB4 >3.25		2 (2.7)	77 (88.9)	4 (66.7)	97 (68.3)

*Altres inclou: hemocromatosi, dèficit d'alfa 1 antitripsina, congestiva, criptogènica. AFP: Alfa Fetoproteïna; ALT: Alanina Aminotransferasa; APRI: *AST to Platelet Ratio Index*; AST: Aspartat Aminotransferasa; BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*; CHC: Carcinoma Hepatocel·lular; FA: Fosfatasa Alcalina; HCM: Hemocromatosi; FIB4: Fibrosi-4; GGT: Gamma Glutamil Transferasa; MMNA: Malaltia Metabòlica No Alcohòlica; N: Nombre total de casos; ND: No disponibles; RIQ: Rang Interquartil; VHB: Virus Hepatitis B; VHC: Virus Hepatitis C; VIH: Virus de la Immunodeficiència Humana.

Taula 7: Descripció de les característiques tumorals dels 175 pacients amb CHC a partir dels quals es van obtenir mostres biològiques	
Estadi BCLC: n (%)	
0	24 (13.7)
A	76 (43.4)
B	32 (18.3)
C	35 (20.0)
D	8 (4.6)
Multinodularitat: n (%)	
No (tumor solitari)	105 (60)
Sí	70 (40)
Mida tumoral: n (%) / Mitja en mm (RIQ)	
≤ 20mm	39 (22.3) / 17 (15-20)
> 20mm	126 (72) / 43 (25-50)
Difús	10 (5.7)
Trombosi portal tumoral: n (%)	20 (11.4)
Metàstasi extrahepàtica: n (%)	11 (6.3)

BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*; n: Nombre total de casos

4.1.2 Seguiment prospectiu dels pacients de la col·lecció

Durant el seguiment dels pacients cirròtics (Grup "CIR") es van diagnosticar 11 CHC amb una diferència de 16.4 mesos de mitjana (rang 7 - 41.7 mesos) entre la primera mostra (CIR) i la segona (CHC).

Dels 13 nòduls hepàtics inclosos basalment com a nòduls en estudi (Grup "LOE"), es va arribar al diagnòstic de: CHC en 5 casos (diagnosticats als 13.27 mesos de mitjana, rang 7.1-33.7); 1 colangiocarcinoma intrahepàtic i 1 hemangioma. De la resta, en 4 pacients els nòduls van desaparèixer durant el seguiment i no es va poder fer el seguiment de 2 pacients.

Un pacient addicional va incloure's basalment com a pacient cirròtic sense tumor, als 20 mesos va identificar-se una lesió hepàtica de 20 mm la qual presentava patró dinàmic radiològic atípic per CHC i no es podia accedir per biòpsia, i als 6 mesos de seguiment, es va arribar al diagnòstic de CHC, obtenint 3 mostres seriades en el temps dels diferents estadis evolutius de la malaltia.

Dels 75 pacients amb CHC que van rebre tractament curatiu es va recollir mostra de 32 d'ells als tres mesos de la intervenció després d'haver-se verificat la resposta completa; i en 3 d'ells en el moment de la recidiva (16.4 mesos de mitjana, rang 4.9 – 20.7 mesos). En total es van incloure 437 mostres de plasma procedents de 381 participants.

4.1.3 Estudi del valor diagnòstic de l'AFP a la col·lecció

Tal i com està descrit a la literatura, l'AFP va demostrar tenir una baixa capacitat diagnòstica en la sèrie. Quan es van comparar els valors d'AFP en funció de l'estadiatge tumoral BCLC (Taula 8), destacava la poca capacitat de l'AFP per diagnosticar tumors d'estadis inicials. De 38 CHC ≤ 20 mm, només 17 (45.9%) presentaven nivells elevats d'AFP, utilitzant el punt de tall de ≥ 10.9 ng/mL³⁴. En el cas dels 95 CHC solitaris, dels quals es disposava el valor d'AFP, només el 46.6% dels pacients presentaven AFP ≥ 10.9 ng/mL. Per contra, sí es va observar que els pacients amb estadis tumorals avançats tenien nivells superiors d'AFP. Dels 175 pacient amb CHC, 31 presentaven malaltia tumoral avançada amb trombosi portal tumoral i/o metàstasi extrahepàtica i més del 67% d'aquests pacients tenien l'AFP plasmàtica elevada.

Taula 8: Relació dels nivells d'AFP amb les característiques tumorals de 162 CHC de la col·lecció			
CARACTERISTIQUES TUMORALS	AFP <10.9 N=74 n (%)	AFP ≥10.9 N=88 n (%)	p_valor*
Estadi BCLC: 0/A B/C/D	52 (70.3) 22 (29.7)	39 (44.3) 49 (55.7)	0.0014
Multinodularitat: No (tumor solitari) Si	54 (73) 20 (27)	41 (46.6) 47 (53.4)	0.0008
Mida tumoral: ≤ 20mm > 20mm i difús	20 (27) 54 (73)	18 (20.5) 70 (79.5)	0.356
Trombosi portal tumoral	7 (9.5)	13 (14.8)	-
Metàstasi extrahepàtica	3 (4.1)	8 (9.1)	-

AFP: Alfa Fetoproteïna; BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*; CHC: Carcinoma Hepatocel·lular; N: Nombre total de casos. *Xi-quadrat

Es van realitzar corbes ROC per avaluar la utilitat de l'AFP per distingir els pacients de la col·lecció amb CHC dels pacients amb malaltia hepàtica sense tumor. Quan es van comparar pacients amb diferents graus d'hepatopatia crònica amb tots els pacients amb CHC, l'àrea sota la corba de l'AFP va ser de 0.733. Aquest valor va disminuir quan es va restringir l'anàlisi comparant els pacients amb malaltia hepàtica amb pacients amb CHC petits (≤ 20mm) sent del 0.633 (Figura 24).

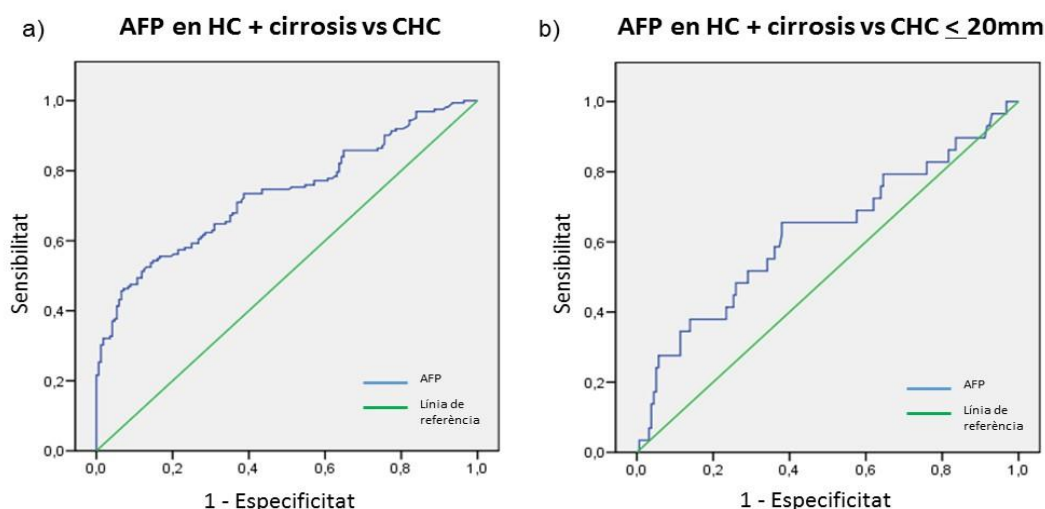


Figura 24. Corbes ROC dels nivells d'AFP plasmàtica aplicant el punt de tall 10.9 ng/ml en diferent grups de pacients. a) Corva de sensibilitat i especificitat de l'AFP per la detecció de pacients amb CHC (n=162) vers pacients amb malaltia hepàtica, inclosos malalts amb hepatitis crònica i cirrosi (n=168). b) Corva de sensibilitat i especificitat de l'AFP per la detecció de pacients amb CHC petits ≤ 20 mm (n=20) vers els pacients amb malaltia hepàtica (n=168). AFP: Alfa Fetoproteïna; CHC: Carcinoma Hepatocel·lular; HC: Hepatitis crònica; ROC *Receiver Operating Characteristics*.

4.2 OBJECTIU 1: Estudi del perfil proteic del plasma de pacients amb diferents graus de malaltia hepàtica amb i sense tumor mitjançant una tècnica proteòmica d'alt rendiment.

4.2.1 Descripció dels pacients inclosos a l'estudi proteòmic

Per tal de disminuir la variabilitat entre els individus dels diferents grups, els pacients es van seleccionar segons la seva etiologia i funció hepàtica, prioritzant-se la etiologia més freqüent en el nostre medi (VHC) i els casos amb funció hepàtica conservada, Child-Pugh A. Les característiques dels 30 casos que es van seleccionar per l'estudi proteòmic es detallen a la taula 9.

Les mostres de plasma analitzades per proteòmica es van agrupar en 2 grans grups: el grup sense tumor (voluntaris sans, pacients amb hepatitis crònica i cirrosi sense tumor) i el grup amb tumor (CHC inicial i CHC avançat). Específicament, es van incloure 3 controls sans (2 homes, edat mitja 60 anys); 3 pacients amb hepatitis crònica per VHC (2 homes, edat mitja 64 anys, i grau de fibrosi histològic moderat, METAVIR F2²⁰⁰); 9 pacients amb cirrosi sense CHC (8 dels quals eren homes, edat mitja 72 anys); i 15 pacients amb cirrosi i CHC en diferents estadis tumorals (9 amb estadi inicial i 6 amb estadi avançat). La majoria dels pacients tenien com etiologia de la cirrosi el VHC (81.5%) i una funció hepàtica preservada (85.2%).

Pel que fa al grup de pacients amb CHC, 9 pacients presentaven un CHC d'estadi inicial (BCLC 0/A) i tenien una mida tumoral mitja de 23 mm. Aquest grup es va subdividir alhora en dos subgrups segons si presentaven baixa probabilitat de presència de factors de recidiva tumoral (n=7), bé sigués perquè a la peça quirúrgica no hi havia invasió microvascular ni satel·litosi i el grau histològic era ben diferenciat (n=5) o perquè, en els casos en que no es disposava de peça quirúrgica, tenien un seguiment lliure de malaltia de més de 2 anys (n=2) i un altre grup on la presència de factors de risc era desconeguda (n=2) ja que no es disposava de peça quirúrgica ni seguiment a llarg plaç. La mitjana de seguiment total va ser de 26 mesos (rang 18-39 mesos) durant el qual no es va registrar cap recidiva tumoral. En relació al subgrup de pacients on la presència de factors de risc era desconeguda (n=2), un pacient va presentar fracàs de tractament, i l'altre recidiva tumoral després d'un tractament experimental (electroporació).

Taula 9: descripció de les 30 mostres de pacients seleccionades per l'anàlisi proteòmica

GRUP	Identificador pacient	Pacient	Edat	Sexe	Etiologia	Child Pugh	AFP (ng/mL)	Estadi BCLC	Disseminació extrahepàtica	Tumor solitari	Mida tumoral (mm)	Grau diferenciació histològic	Tractament	Seguiment (mesos)	Supervivència	Observacions del seguiment
"SA" Sans (n=3)	01-0111	SA1	68	Home	-	-	4.04	-	-	-	-	-	-	-	Viu	No nòduls (1 ECO)
	01-0120	SA2	62	Home	-	-	5.86	-	-	-	-	-	-	-	Viu	No nòduls (1 ECO)
	01-0112	SA3	61	Dona	-	-	7.34	-	-	-	-	-	-	-	Viu	No nòduls (1 ECO)
"HC" Hepatitis Crònica (n=3)	01-0172	HC1	43	Home	VHC	-	2.00	-	-	-	-	-	-	18	Viu	No nòduls (2 ECO)
	01-0194	HC2	46	Home	VHC	-	4.58	-	-	-	-	-	-	18	Viu	No nòduls (2 ECO)
	01-0247	HC3	52	Dona	VHC	-	5.04	-	-	-	-	-	-	6	Viu	No nòduls (1 ECO)
"CIR" Cirròtics sense CHC (n=9)	01-0061	CIR1	67	Home	VHC	A	3,74	-	-	-	-	-	-	28	Viu	No nòduls (4 ECO)
	01-0073	CIR2	77	Home	VHC	A	4,07	-	-	-	-	-	-	24	Viu	No nòduls (5 ECO)
	01-0085	CIR3	69	Home	VHC	A	2,94	-	-	-	-	-	-	36	Viu	No nòduls (5 ECO)
	01-0051	CIR4	78	Home	VHC	A	4,67	-	-	-	-	-	-	27	Viu	No nòduls (4 ECO)
	01-0157	CIR5	75	Dona	VHC	A	9,51	-	-	-	-	-	-	19	Viu	No nòduls (4 ECO)
	01-0098	CIR6	72	Home	VHC	A	8,57	-	-	-	-	-	-	27	Viu	No nòduls (4 ECO)
	01-0203	CIR7	70	Home	VHC	A	5,07	-	-	-	-	-	-	12	Viu	No nòduls (3 ECO)
	01-0134	CIR8	72	Home	Alcohol	B	6,58	-	-	-	-	-	-	15	Èxitus	No nòduls (3 ECO)
	01-0149	CIR9	52	Home	Alcohol	B	ND	-	-	-	-	-	-	16	Viu	No nòduls (4 ECO)
"CHC-i" Cirròtics amb CHC inicials (n=9)	01-0034	CHC-i1	63	Home	VHC	A	8,7	0	No	Sí	9	Ben	Resecció quirúrgica	37	Viu	No recidiva
	01-0094	CHC-i2	59	Home	VHC	A	14,79	A	No	Sí	24	Ben	Resecció quirúrgica	31	Viu	No recidiva
	01-0124	CHC-i3	62	Dona	VHC	A	117,6	A	No	Sí	30	Ben	Resecció quirúrgica	22	Viu	No recidiva
	03-0009	CHC-i4	76	Dona	VHC	A	ND	A	No	Sí	32	Ben	Resecció quirúrgica	18	Viu	No recidiva
	01-0217	CHC-i5	59	Home	Alcohol	A	3,52	A	No	Sí	19	Ben	Resecció quirúrgica	20	Viu	No recidiva
	01-0003	CHC-i6	69	Home	VHC	A	2,72	A	No	Sí	30	Ben	Radiofreqüència	39	Viu	No recidiva
	01-0151	CHC-i7	51	Home	VHC	A	8,6	A	No	Sí	26	ND	Radiofreqüència	26	Viu	No recidiva
	01-0214	CHC-i8	70	Home	VHC	A	23,19	A	No	Sí	20	Ben	Alcoholització	1	Viu	Recidiva tumoral
	01-0028	CHC-i9	50	Home	VHC	A	20,82	A	No	Sí	20	Ben	Electroporació	12	Viu	Fracàs tractament
"CHC-a" Cirròtics amb CHC avançats (n=6)	01-0010	CHC-a1	63	Home	VHB-OH	C	389870	D	Sí	Sí	165	ND	Cap tractament	2	Èxitus	Progressió tumoral
	01-0146	CHC-a2	76	Home	VHC	B	1675	C	Sí	No	Difús	ND	Sorafenib	3	Èxitus	Progressió tumoral
	01-0107	CHC-a3	86	Home	VHC	A	426,1	C	Sí	Sí	160	Ben	Cap tractament	26	Viu	Progressió tumoral
	01-0104	CHC-a4	73	Dona	VHC	A	28	C	Sí	Sí	23	ND	Sorafenib	14	Èxitus	Progressió tumoral
	01-0211	CHC-a5	67	Dona	VHC	A	2040	C	Sí	No	30	ND	Sorafenib	9	Èxitus	Progressió tumoral
	01-0023	CHC-a6	55	Dona	Alcohol	A	1731	C	Sí	No	Difús	Moderat	Sorafenib	10	Èxitus	Progressió tumoral

AFP: Afla Fetoproteïna; BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*; CHC: Carcinoma Hepatocel·lular; CHC-i: CHC inicials; CHC-a: CHC avançats; CIR: Cirròtic; ECO: Ecografia Abdominal; HC: Hepatitis Crònica; ND: No Disponible; VHB: Virus Hepatitis B; VHC: Virus Hepatitis C

Finalment, tots 6 pacients amb CHC avançat (BCLC C/D) presentaven disseminació vascular amb o sense metàstasi extrahepàtica; 2 d'ells amb CHC de menys de 30mm; 2 amb CHC >10cm i 2 amb CHC multinodular. Aquest grup de pacients amb CHC amb disseminació tumoral es va seleccionar expressament per facilitar la detecció de marcadors tumorals en plasma mitjançant les tècniques proteòmiques i també per poder identificar biomarcadors de malaltia disseminada.

4.2.2 Descripció dels perfils proteics de mostres de pacients amb diferents graus d'hepatopatia crònica amb i sense CHC obtinguts per HPLC- MS/MS

Al comparar el perfil proteic de les 30 mostres de plasma (15 pacients sense tumor i 15 pacients amb CHC), es va obtenir una mitja de 1232 proteïnes per mostra amb una desviació estàndard (DE) de ± 169.98 proteïnes per mostra. Es va restringir l'anàlisi a aquelles proteïnes que s'identificaven al menys amb dos pèptids únics, les quals corresponien al 19% de mitja de les proteïnes totals identificades en cada mostra (rang 14.2%-22.9%) (Figura 25_a). Utilitzant aquest criteri, es van identificar un total de 898 proteïnes diferents entre les 30 mostres amb ≥ 2 pèptids únics (235 proteïnes per mostra de mitja i DE ± 42.79 proteïnes). Aquesta mesura de restricció assegurava la fiabilitat dels resultats, ja que augmentava la confiança en la identificació de les diferents proteïnes, tal com s'havia demostrat a l'estudi de reproductibilitat.

Com es mostra al Diagrama de Venn (Figura 25_b), de les 898 proteïnes obtingudes, 91 van ser comunes en els 5 grups estudiats. En concret, 20 es van identificar únicament en el grup dels voluntaris sans, 125 proteïnes en el grup de pacients amb diferents graus malaltia hepàtica crònica sense tumor; i 321 únicament en el grup de pacients amb tumor.

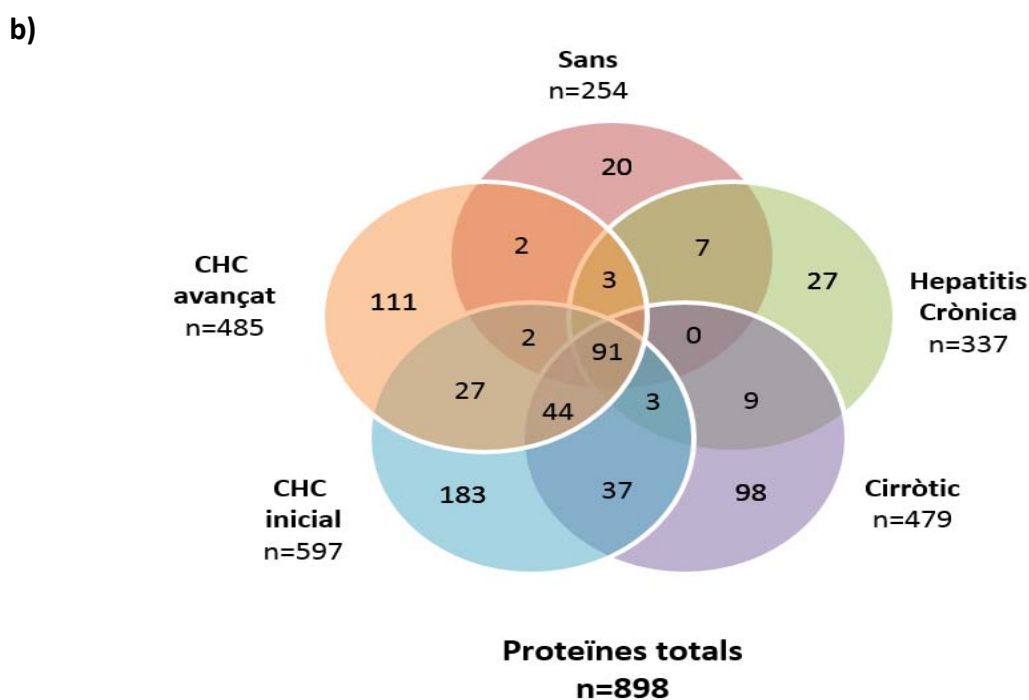
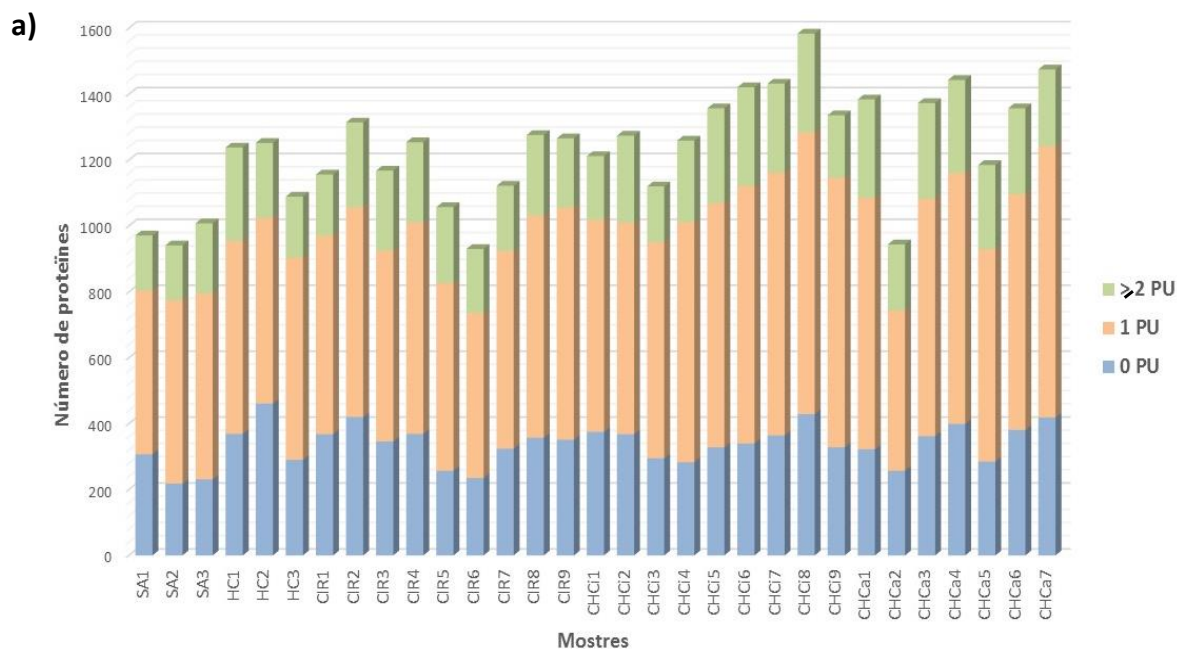


Figura 25. a) Representació del total de proteïnes identificades per grups de mostres distribuïdes en funció del nombre de pèptids únics. b) Diagrama de Venn de les 898 proteïnes totals amb 2 o més pèptids únics obtingudes en les diferents mostres. CHC: Carcinoma Hepatocel·lular; PU: Pèptids Únics

4.2.2.1 Anàlisi no supervisada

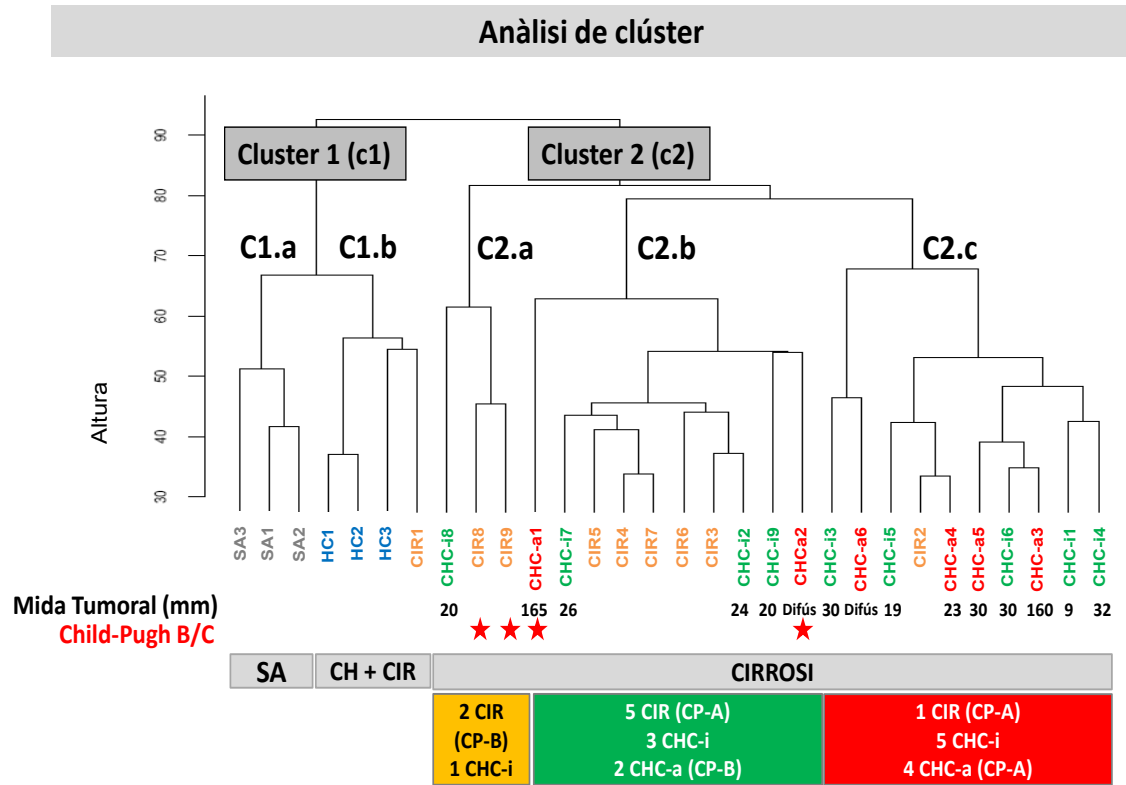
Es va realitzar un anàlisi no supervisada dels perfils proteics obtinguts de les diferents mostres, mitjançant el clúster jeràrquic (Figura 26_a) i l'anàlisi de components principals (ACP) (Figura 26_b).

Per una banda, el clúster jeràrquic no supervisat es va realitzar tenint en compte els nivells plasmàtics de 195 proteïnes. Aquestes proteïnes corresponien al 40% de les proteïnes amb major coeficient de variació (CV) d'un total de 488 proteïnes identificades en al menys dues mostres analitzades (es necessiten com a mínim 2 mostres pel càlcul del CV). Es van observar 2 grans clústers de mostres que es distingien significativament pel grau d'afectació hepàtica ($p < 0.00001$) (Figura 26_a). En concret, el clúster 1 (C1) agrupava el grup de mostres procedents d'individus sans (subclúster C1a) o els pacients amb afectació hepàtica lleu o hepatitis crònica (subclúster C1b) mentre que el clúster 2 (C2) contenia la resta de mostres procedents de pacients amb una malaltia hepàtica més avançada (cirròtics amb i sense CHC). Alhora, el clúster C2 amb mostres de 23 pacients cirròtics es subdividia en 3 subclústers: mostres de pacients amb una greu disfunció hepàtica (C2.a), pacients cirròtics sense tumor o amb CHC d'estadi inicial (C2b) i pacients cirròtics majoritàriament amb CHC d'estadi avançat (C2c).

Per altra banda, en l'estudi del ACP analitzat amb les 91 proteïnes comunes en les 30 mostres, també s'observà la separació dels diferents grups inclosos en l'estudi. En concret, es distingien tres subgrups: un grup de mostres de voluntaris sans sense afectació hepàtica, un conglomerat de pacients cirròtics sense tumor i amb CHC inicials i un conglomerat de mostres de pacients amb CHC avançat (Figura 26_b).

Tant els resultats del clúster jeràrquic com els del ACP suggerien doncs que tant la funció hepàtica com l'estadi tumoral del CHC modifiquen de manera significativa el perfil proteic del plasma.

a)



b)

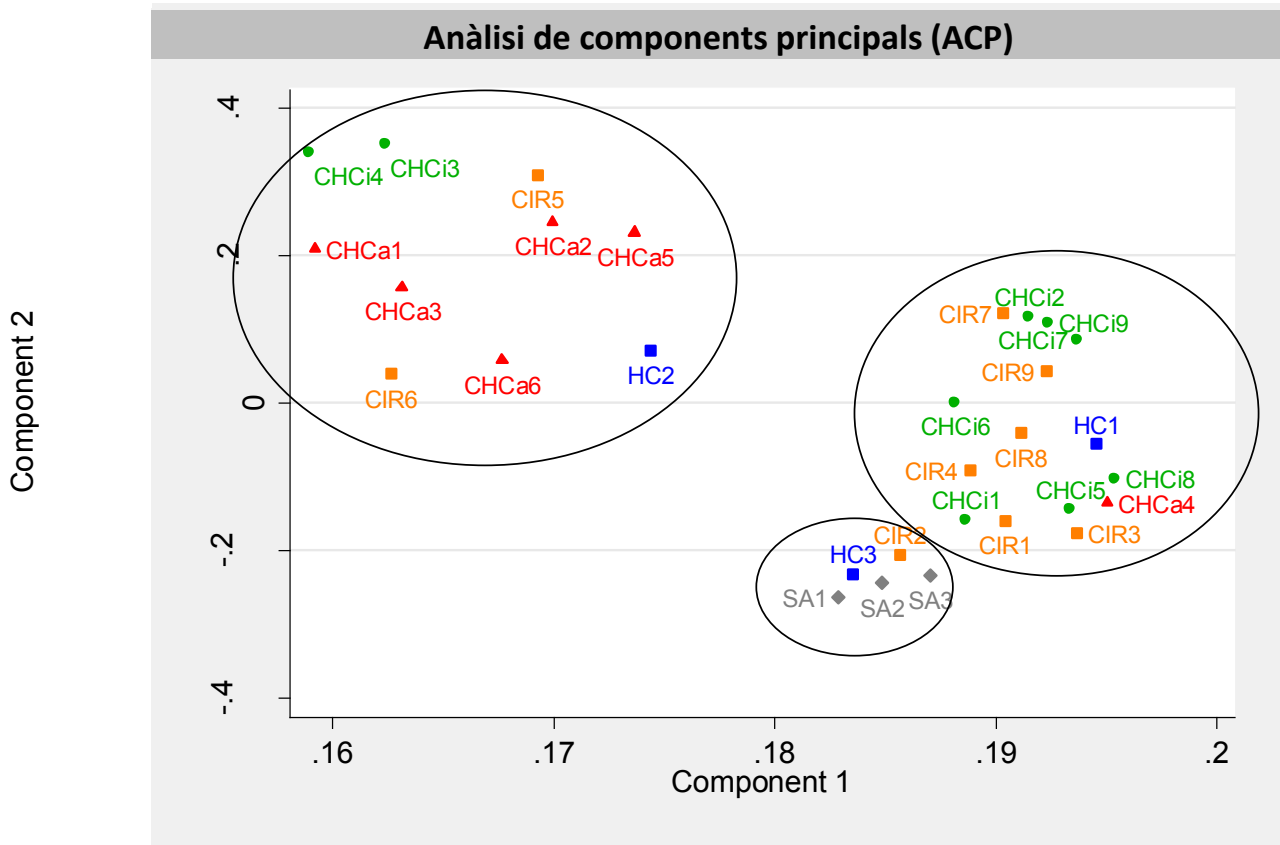


Figura 26: a) Clúster jeràrquic no supervisat. El clúster obtingut a partir del perfil proteic de 195 proteïnes plasmàtiques mostra la separació de les mostres segons el grau de dany hepàtic, observant-se per una banda, un clúster de mostres sense afectació hepàtica o afectació lleu ("SA" i "HC") en el clúster 1 i els pacients amb malaltia hepàtica més avançada, cirròtics ("CIR") sense o amb carcinoma hepatocel·lular (CHC) en el clúster 2. Alhora aquest clúster dos es subdividia en un clúster amb mostres sense tumor majoritàriament o bé amb tumors inicials (clúster 2.a i 2.b) i mostres amb tumor avançat (clúster 2.c). En el gràfic es mostra també la mida tumoral i el grau d'insuficiència hepàtica dels pacients cirròtics amb i sense tumor (Child Pugh B/C representat amb una estrella vermella). b) Anàlisi de components principals (ACP) a partir de les dades de 91 proteïnes comunes en les 30 mostres analitzades per proteòmica. El ACP mostra tres grups marcadament separats a l'espai: el grup de mostres de pacients amb CHC avançat a l'extrem superior esquerre; el grup de mostres de subjectes sans a la part inferior; i un conglomerat que incloïa els dos grups més semblants entre ells, el grup de mostres de pacients amb cirrosi sense tumor i el grup de mostres de pacients cirròtics amb CHC inicial. SA: controls sans; HC: Hepatitis crònica; CIR: pacients cirròtics sense tumor; CHC-i: pacients amb CHC inicial; CHC-a: pacients amb CHC avançat.

4.2.2.2 Anàlisi supervisada

➤ **Estudi del canvi del perfil proteòmic del plasma segons el grau d'alteració de la funció hepàtica (o dany hepàtic)**

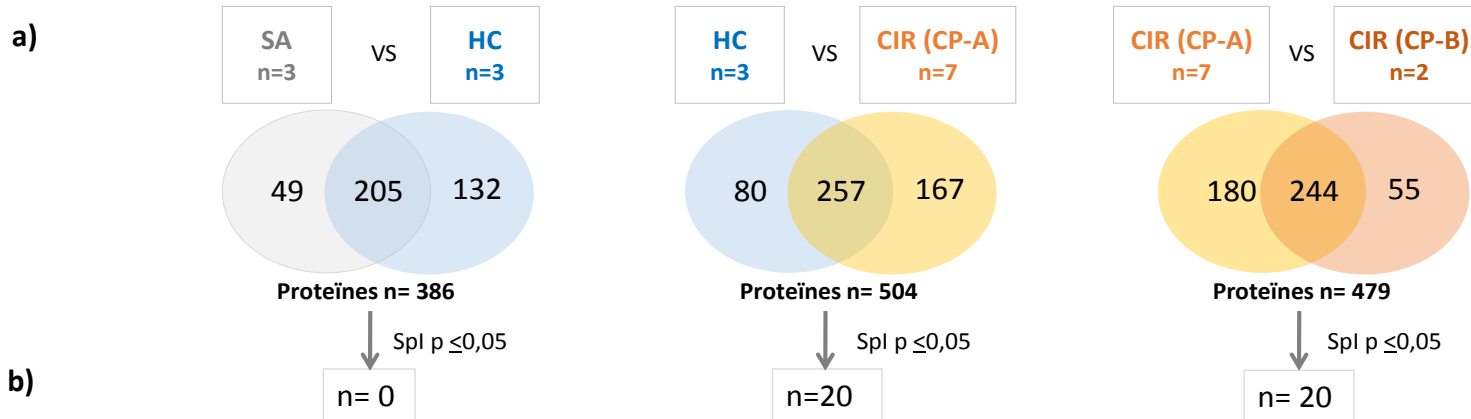
Després d'observar diferències robustes en el perfil proteic plasmàtic dels diferents grups de mostres mitjançant l'anàlisi no supervisat, es va procedir a estudiar quines eren les proteïnes diferentment presents en el plasma de pacients amb diferent grau d'hepatopatia crònica. Amb aquest objectiu es va comparar el perfil proteic del grup de controls sans sense malaltia hepàtica (n=3), amb el grup pacients amb hepatitis crònica inicial (n=3) i amb el grup de pacients amb cirrosi amb una funció hepatocel·lular bona Child Pugh A (n=7) o moderada Child Pugh B (n=2) (Figura 27_a).

En total es van identificar 31 proteïnes diferentment abundants entre els grups de mostres amb malaltia hepàtica (Spl $p < 0.05$) (Figura 27_b). Per contra, no es va identificar cap proteïna diferentment abundant entre controls sans i hepatitis crònica. És interessant destacar que la l'abundància de la majoria de proteïnes augmentava a mesura que augmentava la inflamació hepàtica (60% de proteïnes tenien una abundància més del doble de vegades entre el grup "HC i el grup "CIR" Child Pugh A), però els nivells disminuïen bruscament quan la funció hepàtica empitjorava. Només una proteïna va presentar nivells progressivament elevats associats a l'empitjorament de la funció hepàtica (BM#144), la qual pertanyia a la família de les immunoglobulines.

Aquests resultats indicaven que la funció hepàtica tenia un paper important en la secreció i síntesi de proteïnes. A més

En el mateix sentit, es va observar que 10 de les 31 (32.2%) de les proteïnes identificades estaven relacionades amb el sistema de la immunitat i la inflamació, la majoria d'elles sobreregulades en els primers estadis de la malaltia inflamatòria hepàtica (7/10) i infraregulades a mesura que empitjorava la funció hepàtica (9/10). A banda es van identificar 12 proteïnes de fase aguda en el perfil proteic de pacients amb diferents graus de dany hepàtic.

Figura 27: Canvis en el perfil d'expressió proteic segons els graus de dany hepàtic. a) Comparatives dels perfils proteics entre grups de mostres amb diferent funció hepatocel·lular, on es mostra el total de proteïnes comparades repartides entre cada grup de mostres i el nombre total de proteïnes diferencials amb un p valors $<0,05$ aplicant el test bioestadístic *Spectral Index* (Spl): cap proteïna entre grup de sans i pacients amb hepatitis crònica "HC"; 20 proteïnes al comparar el grup de "HC" amb el grup de pacients cirròtics "CIR" Child Pugh A; i 20 proteïnes al comparar mostres de pacients cirròtics "CIR" Child Pugh (CP) A vs B. b) *Heatmap* en que es representen els espectres totals de les 31 proteïnes diferencials entre grups, 9 d'elles identificades alhora en la comparativa "HC" vs "CIR" Child Pugh A i en la comparativa "CIR Child-Pugh A vers "CIR" Child-Pugh B. A la part dreta de la taula s'expressa la diferència d'abundància de cada proteïna en funció de cada comparació, marcant-se en vermell les proteïnes sobreregulades i en blau les infraregulades. En el cas que la representació fos 0%, per tal d'expressar una diferència numèrica es va multiplicar el valor màxim i mínim per una constant per tal de substituir el valor 0. Es detallen les característiques de cada proteïna (component cel·lular i funció molecular). BM#ID: Identificador del Biomarcador; CP: Child Pugh; ND: No Disponible. *Els noms de les proteïnes no s'especifiquen degut al fet que els presents resultants estan en vies d'ésser patentats.*



BM#ID	SA			HC			CIR (CP A)									CIR (CP B)	HC/SA	CIR-A /HC	CIR-B /CIR-A	Component cel.lular	Gene Ontology Funció Molecular	
	SA1	SA2	SA3	HC1	HC2	HC3	CIR-A1	CIR-A2	CIR-A3	CIR-A4	CIR-A5	CIR-A6	CIR-A7	CIR-B8	CIR-B9							
382																		1,71	0	ND	Citoplasma	Metabolisme del colesterol
282																		135,94	0	25,85	Citoplasma	Activació del complement
172																		134,76	0,01	0	Espai Extracel.lular	Resposta inflamatòria aguda
340																		5,91	0,01	1,61	Espai Extracel.lular	Resposta inflamatòria aguda
144																		1,09	6,98	25,62	Espai Extracel.lular	Transport d'oxigen
176																		0,02	215	0	Espai Extracel.lular	Mort cel.lular
320																		ND	215	0,42	Membrana Plasmàtica	Resposta inflamatòria aguda
275																		0,87	20,86	0,19	Espai Extracel.lular	Angiogènesi
187																		1,27	7,00	0,90	Espai Extracel.lular	Resposta immune adaptativa
653																		ND	215	0,19	Membrana Plasmàtica	Resposta immune
896																		ND	215	0,28	ND	Metabolisme de polisacàrids
158																		1,92	4,40	0,15	Espai Extracel.lular	Adhesió cel.lular
159																		2,97	4,53	0,10	Espai Extracel.lular	Coagulació sanguínia
341																		0,39	6,31	0,16	Espai Extracel.lular	Activació del complement
342																		0,58	7,65	0,08	Espai Extracel.lular	Metabolisme de la glucosa
97																		45,42	19,25	0,16	Espai Extracel.lular	Metabolisme de la fructosa
264																		0,26	23,06	0,17	Espai Extracel.lular	Senyalització intercel.lular
169																		0,81	107,39	0,01	Citoplasma	Regulació d'apoptosi
193																		0,22	213,13	0,08	Espai Extracel.lular	Resposta immune
54																		0,02	215	0,02	Espai Extracel.lular	Transport d'oxigen
160																		2,41	3,67	0,13	Espai Extracel.lular	Coagulació sanguínia
464																		1,18	0,29	0,02	Espai Extracel.lular	Resposta immune adaptativa
463																		0,94	0,50	0,05	Citoplasma	Regulació de l'homeostasi
526																		1,05	0,53	0,08	Espai Extracel.lular	Resposta inflamatòria aguda
92																		1,67	0,65	0	Citoplasma	Reducció Oxidació
274																		135,94	0,72	0	Espai Extracel.lular	Resposta immune adaptativa
468																		1,65	1,09	0,16	Citoplasma	Metabolisme de fosfolípids
428																		10,26	1,13	0	Espai Extracel.lular	Metabolisme del colesterol
207																		1,40	0,93	0,10	ND	Coagulació sanguínia
472																		1,72	1,45	0,25	Espai Extracel.lular	Metabolisme de polisacàrids
213																		6,32	2,57	0	Citoplasma	Resposta inflamatòria

Proteïnes de malaltia hepàtica (p<0,05)

Proteïnes de malaltia hepàtica avançada (p<0,05)

➤ **Estudi del canvi del perfil proteòmic del plasma en pacients cirròtics segons la presència o no de càncer de fetge i l'estadi tumoral dels CHCs.**

Es va estudiar també si hi havia diferències a nivell del proteoma entre les mostres de pacients cirròtics amb i sense CHC, i si aquest perfil proteic canviava a mesura que augmentava el grau de malaltia tumoral, és a dir, en el tumor disseminat. Per això es va comparar inicialment el perfil proteic del grup 9 de mostres de pacients amb cirrosi sense tumor (Grup "CIR") amb el grup de 15 mostres de pacients cirròtics i CHC (Grup "CHC"). Es van identificar 46 proteïnes diferencialment abundants (Spl $p < 0.05$) entre els dos grups, 26 infra-regulades en pacients amb CHC i 20 sobre-regulades en CHC. Seguidament, es va comparar entre el grup de mostres de CHC inicial (n=9) i CHC avançat (n=6). Es van identificar 35 proteïnes diferentment abundants (Spl $p < 0.05$), 31 sobre-regulades i 4 infra-regulades en CHC avançat.

Es va utilitzat l'eina *d'Ingenuity Patways Analysis* (IPA) per estudiar si les proteïnes identificades en les diferents comparatives pertanyien a una via de senyalització específica. En concret, es va realitzar un anàlisi IPA tenint en compte un total de 114 proteïnes els nivells dels quals diferien entre els diferents grups "HC", "CIR", "CHC-i" i "CHC-a".

L'anàlisi de vies canòniques va identificar 4 vies de senyalització diferentment activades entre els diferents grups estudiats (Taula 10). En concret, es va veure un enriquiment de les proteïnes relacionades amb la resposta aguda (p valor $< 1 \times 10^{-17}$, z score 2) en els primers estadis d'afectació hepàtica, al comparar mostres de pacients amb hepatitis crònica i cirrosi Child Pugh A. Aquest sistema es mantenia enriquit al comparar pacients cirròtics amb i sense tumor (p valor $< 1 \times 10^{-6}$, z score 1). A més, és interessant assenyalar que es va observar un increment en l'activitat de la producció d'òxid nítric en pacients cirròtics amb tumor vers cirròtics sense tumor (p valor $< 1 \times 10^{-4}$, z score 1). Finalment, quan es van analitzar les proteïnes diferencialment identificades en malaltia tumoral

disseminada es va veure un enriquiment significatiu de la via d'activació del sistema LXR/RXR, amb un p valor $< 1 \times 10^{-4}$ i un z score de 2 (Taula 10 i Figura 28).

Taula 10: vies de senyalització activades

Vies Canòniques	CIR (CP-A)/HC		CHC/CIR		CHC-a*/CHC-i**	
	p valor	z score	p valor	z score	p valor	z score
Activació del sistema LXR/RXR	1×10^{-10}	0,38	1×10^{-11}	0,71	1×10^{-4}	2
Producció d'òxid nítric	1×10^{-4}	0	1×10^{-4}	1	1×10^{-3}	
Resposta aguda	1×10^{-17}	2	1×10^{-6}	1	1×10^{-2}	

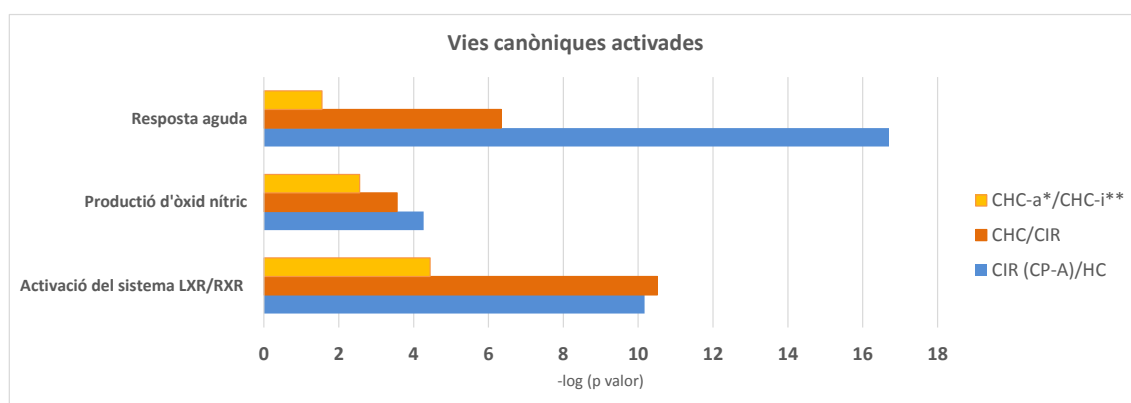


Figura 28: Relació de les diferents vies de senyalització activades en funció del grau de malaltia hepàtica i classificació tumoral. CIR: cirrosi; CHC-i: CHC inicial; CHC-a: CHC avançat; HC: Hepatitis Crònica. * n=4 pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC avançat; ** n=7 pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC inicial sense factors de recidiva tumoral

Un altre anàlisi interessant realitzat amb el programa IPA va ser l'anàlisi de reguladors *upstream* de les vies canòniques. Aquesta eina prediu quins són els reguladors *upstream* de les vies de senyalització que estan activats o inhibits basat de nou amb les llistes de proteïnes diferentment identificades en el plasma dels diferents grups de pacients estudiats.

Els resultats experimentals obtinguts van predir una activació de 5 reguladors en tumors disseminats respecte tumors inicials (al comparar mostres de pacients cirròtics amb CHC inicial i avançat) resumit a la taula 11 i figura 29. No es va predir l'activació/inhibició de cap *upstream regulator* en les llistes de proteïnes diferentment presents en plasma de pacients sense tumor però amb diferents graus de dany hepàtic, suggerint que els *upstream regulators* identificats són específics de tumor.

Els resultats van predir una activació de l'oncogen MYC en tumors disseminats vers tumors no disseminats (p valor $< 1 \times 10^{-4}$ i z score 2.18), resultat que es mantenia quan es realitzava una comparativa més estricta, acotant-se els dos grups de pacients segons

funció hepàtica i absència de factors de recidiva tumoral (4 pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC avançat vers 7 pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC inicial sense factors de recidiva tumoral). A més els resultats van predir l'activació d'altres reguladors en tumors disseminats: *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) (z score 1) , *Vascular Endotelial Growth Factor* (VEGF) (z score 1), *CCAAT/enhancer binding protein* (CEBPA) (z score 1.40) i *Hepatocyte Nuclear Factor A1* (HNF1A) (z score 1.07).

Taula 11: Reguladors upstream				
Reguladors	CHC-a/CHC-i		HC-a*/CHC-i**	
	p valor	z score	p valor	z score
MYC	1×10^{-4}	2,18	1×10^{-3}	1,29
HGF	1×10^{-4}		1×10^{-2}	1,00
Vegf	1×10^{-3}		1×10^{-4}	1,00
CEBPA			1×10^{-4}	1,40
HNF1A			1×10^{-4}	1,07

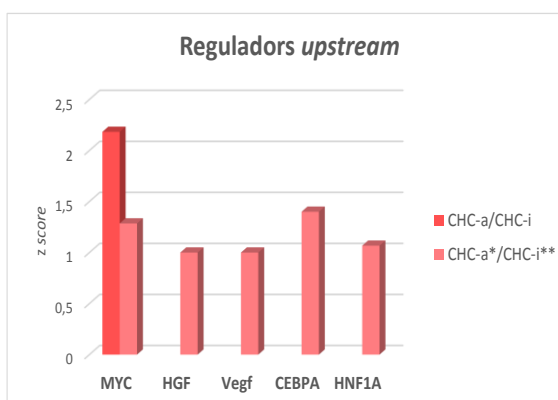


Figura 29: Diagrama de barres on s'expressa el valor de z score dels diferents reguladors upstream predits com a activats en funció del perfil proteic diferencial obtingut entre pacients cirròtics amb CHC avançat i inicial. (*) selecció de 4 pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC avançat; (**) Selecció de 7 pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC inicial sense factors de recidiva a la peça quirúrgica o amb un seguiment de més de 24 mesos lliure de malaltia tumoral després d'un tractament percutani.

4.3 OBJECTIU 2: Identificació i validació de potencials biomarcadors plasmàtics de CHC

4.3.1 Identificació de biomarcadors de CHC a partir de l'estudi dels perfils proteics

4.3.1.1 Identificació de putatius biomarcadors diagnòstic precoç de CHC

A) Anàlisi quantitativa

En base al que s'havia observat a l'estudi anterior que la funció hepàtica tenia un paper important en el perfil proteic es va decidir excloure de l'anàlisi de marcadors de CHC les mostres de pacients amb funció hepàtica alterada (Child Pugh B/C): 2 mostres del grup

de pacients cirròtics (mostra CIR-A8 i CIR-A9) i 2 mostres del grup de CHC avançats (CHC-a1 i CHC-a2).

Al comparar el perfil proteic de 7 pacients cirròtics sense tumor amb funció hepàtica conservada (Child Pugh A) amb el de 9 pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC inicial (BCLC 0/A), es van identificar 696 proteïnes (Figura 30_a). D'aquestes, 54 proteïnes es trobaven de manera significativa diferentment abundants entre els dos grups de pacients (Spl $p < 0.05$). Per tal d'obtenir biomarcadors més robustos, es van aplicar diferents filtres (representació en al menys el 50% de mostres i abundància major al doble de vegades). D'aquestes 54 proteïnes, 37 es van trobar representades com a mínim en el 50% de mostres del grup on el biomarcador es trobava enriquit. Vint-i-set de les 37 proteïnes presentaven una abundància 2 vegades superior en el grup enriquit: 10 proteïnes tenien nivells més elevats en el grup de pacients cirròtics amb tumor mentre que unes altres 10 proteïnes es van observar amb uns nivells més elevats pacients sense tumor. A la figura 32 es detallen les característiques de les 27 proteïnes.

B) Anàlisi qualitativa

Per tal d'identificar aquells biomarcadors que podien estar secretats directament pel tumor, es va fer un anàlisi qualitatiu restringint l'anàlisi a aquelles proteïnes identificades de manera exclusiva en les mostres de plasma de pacients cirròtics amb CHC i que per tant, no s'observaven en el grup de mostres de voluntaris sans, pacients amb hepatitis crònica ni cirròtics sense tumor. De les 321 proteïnes exclusives de tumor, es van identificar 4 proteïnes com a potencials biomarcadors diagnòstic precoç de CHC ja que es trobaven majoritàriament en pacients amb CHC inicial (en 3 mostres de les 9 del grup "CHC-i"), ressaltats a la figura 32 en verd i subratllats.

Es van estudiar les característiques biològiques dels 31 biomarcadors diagnòstic identificats per les dues aproximacions (27 a partir de l'anàlisi quantitativa i 4 a partir de l'anàlisi qualitativa). El 51% dels marcadors es localitzaven a l'espai extracel·lular, el 26% es localitzaven al citoplasma i el 13% a la membrana plasmàtica. Un terç (32%) de les proteïnes estaven relacionades amb la resposta immune i inflamatòria i un 16% relacionades amb l'adhesió cel·lular, la majoria de les quals es van veure infra regulades en el grup de CHC inicial. Quan es va revisar la literatura descrita de cada biomarcador

identificat es va observar que el 29% dels biomarcadors ja s'havia descrit anteriorment en altres càncers inclòs el CHC, el 36% s'havia descrit només en altres càncers però mai en CHC; 1 biomarcador (BM#180) s'havia relacionat en CHC i no en altres càncers i el 32% dels biomarcadors identificats no s'havien relacionat mai anteriorment en càncer.

4.3.1.2 Identificació de putatius biomarcadors de disseminació tumoral

A) Anàlisi quantitativa

En aquest anàlisi també es van seleccionar els pacients cirròtics que presentaven una funció hepatocel·lular conservada Child Pugh A. A més, es van excloure els dos pacients amb CHC inicial dels quals es desconeixia la presència de factors de risc de recidiva tumoral perquè o es disposava de la peça quirúrgica i en el seguiment un pacient havia recidivat durant el seguiment abans de l'any de tractament (CHC-i8) i l'altre pacient havia fracassat al tractament als 12 mesos (CHC-i9). Per tant, per a la identificació de marcadors de disseminació tumoral es va comparar el perfil proteic de 4 pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC disseminat (100% amb metàstasi) amb 7 pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC inicial i sense factors de risc de recidiva tumoral (5 pacients tractats amb cirurgia on es descartava la presència de factors de recidiva com la satel·litosi, invasió microvascular i grau bona diferenciació histològica; i 2 pacients tractats amb tractament percutani i amb un seguiment lliures de malaltia major de 2 anys). En total de les 11 mostres estudiades d'aquests pacients, es van identificar 610 proteïnes, de les quals 46 proteïnes es trobaven en una abundància estadísticament diferent entre grups (Spl $p < 0.05$). Es van aplicar novament els filtres per reduir el nombre de potencials biomarcadors (presència del marcador com a mínim en el 50% de mostres on el marcador es trobava enriquit i amb un abundància major del doble). De les 46 proteïnes, 40 s'identificaven en $\geq 50\%$ de mostres del grup enriquit ($\geq 4/7$ mostres de CHC inicial o $\geq 2/4$ mostres de CHC avançat) i es trobaven amb una abundància diferencial del doble en el grup enriquit (Figura 30_b i 32).

B) Anàlisi qualitativa

Per tal d'identificar potencials marcadors de malaltia disseminada a partir de l'anàlisi qualitativa, es va restringir l'anàlisi aquelles proteïnes únicament identificades en al menys el 50% dels tumors avançats ($\geq 3/6$), independentment si es trobaven o no en mostres de pacients amb CHC inicial. Es van identificar 5 potencials marcadors de malaltia disseminada, ressaltats a la figura 32 en verd i subratllats. Tres d'aquests marcadors ja s'havien identificat anteriorment com a marcadors de malaltia disseminada a partir de l'anàlisi qualitativa.

Es van escollir 7 dels millors potencials biomarcadors obtinguts per validar els seus nivells plasmàtics per la tècnica d' *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) (remarcats en vermell a la figura 30_a). Observar que el BM#460 es va identificar com en l'anàlisi de possibles marcadors diagnòstic de CHC inicial com de malaltia disseminada.

Novament es van estudiar les característiques biològiques dels 42 biomarcadors diagnòstic identificats per les dues aproximacions (40 a partir de l'anàlisi quantitativa i 5 a partir de l'anàlisi qualitativa, tres marcadors identificats en les dues aproximacions). El 49% dels marcadors es localitzaven a l'espai extracel·lular, el 27% al citoplasma i el 17% a la membrana plasmàtica. Destacar que 5 dels 42 biomarcadors de malaltia tumoral disseminada estaven relacionats amb el metabolisme del colesterol i 3 dels marcadors relacionats amb processos biològics relacionats amb la capacitat de creixement i metastàtica de les cèl·lules tumorals: activitat de receptor VEGF del marcadors BM#16, per tant relacionat amb l'angiogènesi, procés de migració cel·lular del marcadors BM#395, procés de proliferació cel·lular del marcadors BM#100 i procés creixement cel·lular del marcadors BM#327.

Quan es va revisar la literatura descrita de cada biomarcador identificat es va observar que més de la meitat (52%) dels biomarcadors ja s'havia descrit anteriorment en altres càncers inclòs el CHC, el 31% s'havia descrit només en altres càncers però mai en CHC; i el 17% dels biomarcadors identificats no s'havien relacionat mai anteriorment en càncer.

Tal com es pot veure al quadre de la figura 32, en total es van identificar 67 proteïnes com a potencials marcadors diagnòstic de CHC ($p < 0.05$), 31 proteïnes de diagnòstic inicial i 42 proteïnes de disseminació tumoral, 9% identificades en les dues comparatives.

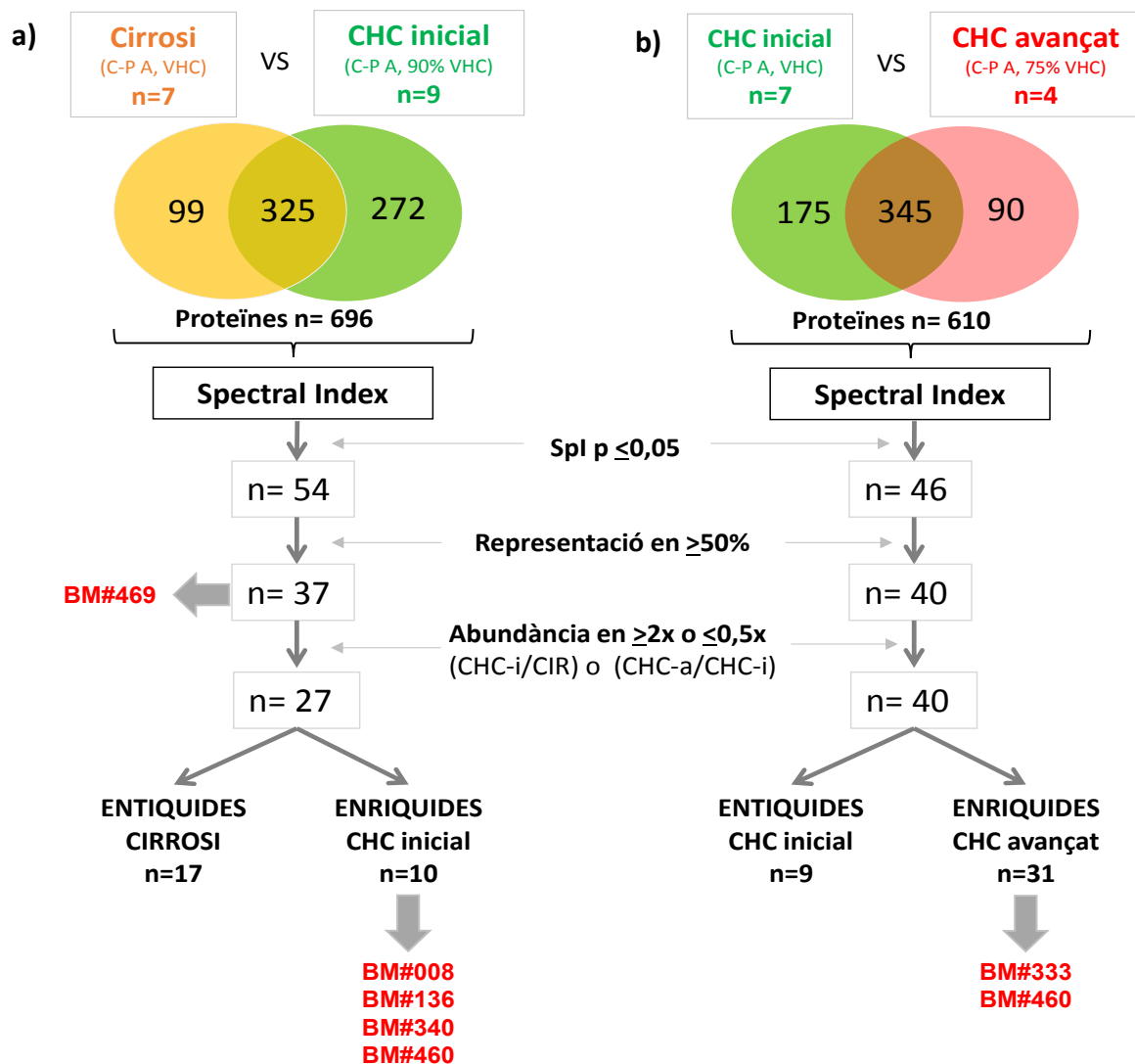


Figura 30: Esquema de procés metodològic utilitzat en l'anàlisi quantitatiu de comparació dels perfils proteics per a la identificació de biomarcadors diagnòstic de malaltia inicial (a) i malaltia disseminada (b) mitjançant el test bioestadístic *Spectral Index* (Spl). Es van aplicar 2 filtres per acotar el nombre de potencials biomarcadors i obtenir resultats més robustos: per una banda, es va tenir en compte la representació de més del 50% de mostres en el grup enriquit i per l'altra, l'abundància de més del doble en el grup enriquit. En vermell s'assenyalen els biomarcadors escollits per validar per *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). BM# indica l'identificador del biomarcador. Els noms de les proteïnes no s'especifiquen degut al fet que els presents resultants estan en vies d'ésser patentats.

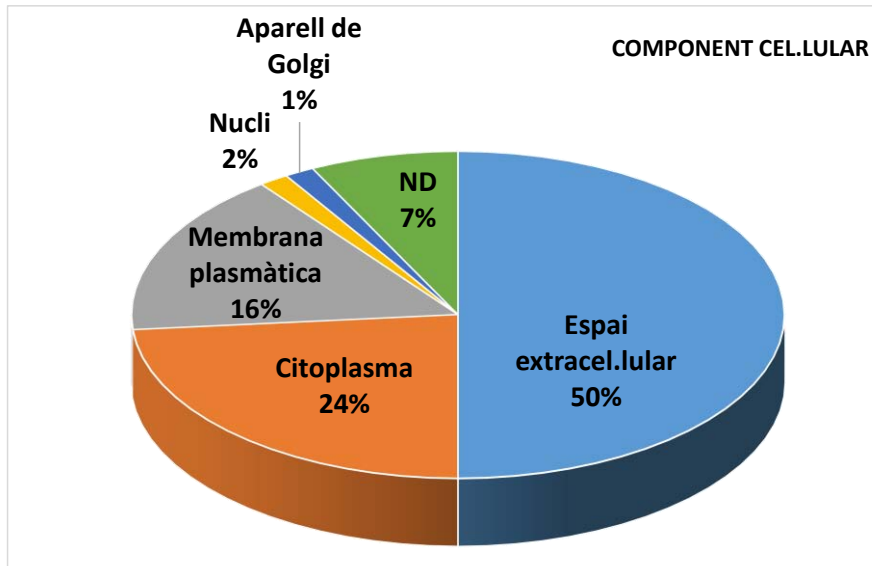
En general, de les 67 proteïnes identificades com a potencials marcadors diagnòstic de CHC, tant inicial com disseminat, un 50% de les proteïnes es trobaven localitzades a l'espai extracel·lular, és a dir, eren proteïnes secretades al plasma, un 24% es trobaven localitzades al citoplasma de la cèl·lula i un 16% a la membrana extracel·lular, un 2% al nucli cel·lular i un 1% a l'aparell de Golgi, la resta de proteïnes no es van identificar a les bases de dades públiques i per tan no es van poder catalogar (Figura 31_a).

Es va trobar que 15 de les 67 proteïnes (22.4%) estaven relacionades amb la resposta immune o inflamatòria; un 12% estaven relacionades amb l'adhesió cel·lular; un 7.4% estaven relacionades amb el metabolisme del colesterol; 4 proteïnes relacionades amb el creixement cel·lular i angiogènesi identificades totes elles en tumors disseminats. Destacar que 16 dels 67 biomarcadors (9%) eren proteïnes de la família de les immunoglobulines.

Quasi la meitat dels marcadors identificats (43%) ja s'havien relacionats anteriorment amb altres càncers i amb CHC, un 34% dels marcadors s'havien relacionat en altres càncers però no en CHC, un marcadors (1%) s'havia relacionat amb CHC i 21% dels marcadors no s'havia vist mai relacionat mai amb càncer (Figura 31_b) .

Un dels biomarcadors identificats va ser l'AFP (BM#177), tant en l'anàlisi quantitativa com qualitativa, ja que no es va detectar el biomarcador ni en mostres de pacients sense tumor ni en mostres de pacients amb CHC inicial. Per tant, seria un marcadors que actuaria com a control de la tècnica aplicada ja que es correlacionarien els seus nivells plasmàtics amb el nombre d'espectres detectats per proteòmica.

a)



b)

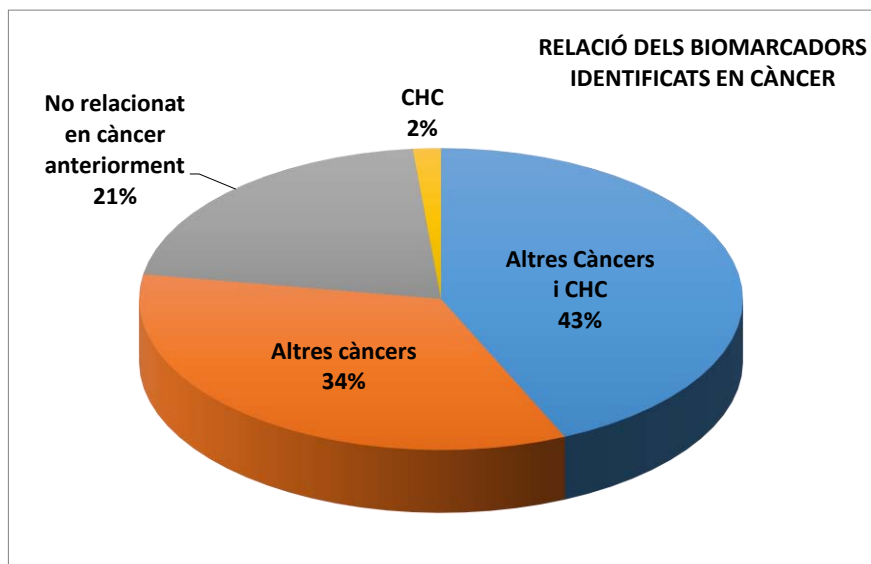


Figura 31: Distribució dels potencials biomarcadors diagnòstic de CHC identificats per tècniques de proteòmica segons el component cel·lular basats en l'anàlisi de *Gene Ontology*. b) Estudi del grau de associació dels biomarcadors identificats i el càncer segons la base de dades pública PubMed

BM#ID	Component cel.lular	Gene Ontology Procés Biològic	Gene Ontology Funció Molecular	Vies de senyalització KEGG	Relacionat amb CHC i/o altres càncers	Núm entrades PubMed
511	Membrana plasmàtica	Senyalització intracel.lular	Activitat fosfoproteïna fosfatasa		Altres i CHC	2
351	Espai extracel.lular	Adhesió cel.lular	Unió a ions	Interacció MEC-R	Altres	2
303	Citoplasma	Proteòlisi	Unió a ions		Altres	8
319	Membrana plasmàtica	Adhesió cel.lular	Activitat estructural molecular		No	-
180	Espai extracel.lular	Resposta inflamatòria aguda	Unió a ions		CHC	1
150	Citoplasma	Organització del citoesquelet	Activitat estructural molecular		No	-
452	Espai extracel.lular	Resposta inflamatòria	Activitat lisozima		Altres i CHC	20
484	Membrana plasmàtica	Adhesió cel.lular	Unió a ions		Altres	40
489	Espai extracel.lular	Proteòlisi	Activitat peptidasa		Altres	1
468	Citoplasma	Metabolisme de fosfolípids	Activitat fosfolipasa		Altres	2
401	Espai extracel.lular	Adhesió cel.lular	Unió a factors de creixement		Altres i CHC	16
267	ND	ND	ND		No	-
211**	Espai extracel.lular	Resposta immune	Unió a antigen		No	-
8*	Espai extracel.lular	Activació del complement	Unió a ions	Coagulació i coagulació	Altres i CHC	25
142**	Espai extracel.lular	Resposta immune	Unió a antigen		No	-
145**	Espai extracel.lular	Resposta immune	Unió a antigen		Altres	1
564	Espai extracel.lular	Regulador producció citoquines	Activitat citoquina	Senyal PPAR	Altres i CHC	200
144**	Espai extracel.lular	Resposta immune	Unió a antigen		Altres	1
340*	Espai extracel.lular	Resposta inflamatòria aguda	ND		Altres i CHC	14
1**	Espai extracel.lular	Resposta immune	Unió a antigen		No	-
136*	Membrana plasmàtica	Receptor de senyals	Receptor d'immunoglobulina polimèrica		Altres i CHC	50
105**	ND	ND	ND		No	-
575	Citoplasma	Regulador senyal proteïna quinasa A	Unió de proteïnes		Altres	1
296	Espai extracel.lular	Adhesió cel.lular	Unió a factors de creixement	Interacció MEC-R	Altres	20
67	Citoplasma	Organització del citoesquelet	Unió a calmodulina		Altres	2
294	Espai extracel.lular	Transport de lípids	Transportador de colesterol		No	-
444	Citoplasma	Metabolisme de carbohidrats	Activitat GlcNAc		Altres	1
488	Citoplasma	Desenvolupament de l'epidermis	Activitat estructural molecular		No	-
472	Espai extracel.lular	Mort cel.lular	Unió a ions		Altres i CHC	28
896	ND	ND	ND		No	-
460*	Citoplasma	Resposta inflamatòria aguda	Unió a factors de transcripció		Altres i CHC	63
157	Espai extracel.lular	Metabolisme del colesterol	Transportador de lípids	Senyal PPAR	Altres i CHC	6
101	Espai extracel.lular	Regulador negatiu del catabolisme	Activitat inhibició enzimàtica		Altres i CHC	12
297	Espai extracel.lular	Adhesió cel.lular	Activitat inhibició enzimàtica	Interacció MEC-R	Altres i CHC	29
179	Espai extracel.lular	Resposta immune	Activitat de creixement cel.lular		Altres	22
305	Membrana plasmàtica	Adhesió cel.lular	Unió de proteïnes		Altres i CHC	2000
92	Citoplasma	Regulador de l'hemostàsia	Unió a ions		Altres	90
189	Membrana plasmàtica	Metabolisme del colesterol	Unió a ions		Altres i CHC	200
325	Membrana plasmàtica	Desenvolupament de l'epidermis	Unió a proteïnes del citoesquelet		Altres i CHC	500
536	Citoplasma	Organització del citoesquelet	Unió a nucleòtids		Altres	2
464	Espai extracel.lular	Transport d'oxigen	Unió a ions		Altres	3
390	Citoplasma	Resposta inflamatòria aguda	Activitat antioxidant		Altres i CHC	50
16	Membrana plasmàtica	Angiogènesi	Activitat VEGFR		Altres i CHC	170
815	Espai extracel.lular	Regulació negativa d'unió al receptor	Unió a ions		Altres	1
71	Nucli	Metabolisme de monosacàrids	Activitat lactat dehidrogenasa		Altres i CHC	140
847	Aparell de Golgi	Transport de proteïnes intracel.lular	Activitat fosfotransferasa		Altres	1
154	Espai extracel.lular	Metabolisme del colesterol	Transportador de lípids	Senyal PPAR	Altres i CHC	22
309	Citoplasma	Desenvolupament de l'epidermis	Activitat estructural molecular		Altres i CHC	26
155	Espai extracel.lular	Metabolisme del colesterol	Transportador de lípids		Altres	12
174	Espai extracel.lular	Metabolisme proteic	Activitat hormonal		No	-
247	Citoplasma	Regulador de la transcripció	Unió a proteïnes del citoesquelet		Altres i CHC	60
526	Espai extracel.lular	Metabolisme del colesterol	Transportador de lípids		Altres	2
724	Citoplasma	Resposta a estímuls hormonals	Activitat peptidasa		Altres i CHC	70
165	Espai extracel.lular	Resposta immune adaptativa	Unió a ions	Coagulació i coagulació	No	-
333*	Espai extracel.lular	Regulador del creixement cel.lular	Unió a factors de creixement		Altres i CHC	400
395	Espai extracel.lular	Migració cel.lular	Unió a ions		Altres	26
374	Membrana plasmàtica	Resposta immune adaptativa	Unió a col.lagen		Altres	100
549	Espai extracel.lular	Adhesió cel.lular	Unió a ions		Altres i CHC	180
48	Citoplasma	Organització del citoesquelet	Unió a proteïnes del citoesquelet		Altres i CHC	14
321	Membrana plasmàtica	Resposta immune	Receptor de virus		Altres i CHC	60
436	Citoplasma	Resposta immune	Unió a proteïnes		No	-
76	Espai extracel.lular	Coagulació sanguínia	Unió a ions	Coagulació i coagulació	Altres	4
459	ND	Metabolisme de l'ADN	Unió a pèptids		No	-
220	Espai extracel.lular	Coagulació sanguínia	Unió a ions	Coagulació i coagulació	Altres	3
177	Espai extracel.lular	Regeneració orgànica	Unió a ions		Altres i CHC	6000
327	Membrana plasmàtica	Regulador del creixement cel.lular	Unió a col.làgen	Interacció MEC-R	Altres i CHC	5000
100	Espai extracel.lular	Regulador de la proliferació cel.lular	Activitat inhibició enzimàtica		Altres i CHC	350

Figura 32: *Heatmap* en que es representen els espectres totals de les 67 proteïnes identificades com a potencials marcadors de CHC. Es van identificar 31 potencials biomarcadors diagnòstic precoç de CHC, 27 a partir de l'anàlisi quantitativa i 4 marcadors addicionals a partir de l'anàlisi qualitativa (ressaltats en verd subratllats). A més, es van identificar 42 potencials marcadors de disseminació tumoral, 40 a partir de l'anàlisi quantitativa i 5 a partir de l'anàlisi qualitativa (ressaltats en verd subratllats), 3 dels quals ja identificats quantitativament. Sis de les proteïnes es van identificar paral·lelament com a marcadors diagnòstic inicial i com a marcadors de disseminació tumoral. S'especifica la diferència d'abundància entre mostres i la representació de la proteïna en cada grup de mostres expressat en %. En el cas que la representació fos 0%, per tal d'expressar una diferència numèrica es va multiplicar el valor màxim i mínim per una constant per tal de substituir el valor 0. Es detallen les característiques de cada proteïna (component cel·lular, procés biològic i funció molecular). S'especifica per cada proteïna la seva relació amb càncer en general i específicament amb CHC segons les referències bibliogràfiques trobades al PubMed. Les proteïnes ressaltades en vermell i (*) són els potencials biomarcadors escollits per validar la seva concentració plasmàtica per la tècnica d'ELISA. Les proteïnes ressaltades en lila (**) són de la família de les immunoglobulines. GlcNAc: alfa-N-acetilglucosaminidasa. ND: no disponible. *Els noms de les proteïnes no s'especifiquen degut al fet que els presents resultants estan en vies d'ésser patentats.*

4.3.2 Validació de potencials biomarcadors plasmàtics per ELISA

Dels biomarcadors identificats a partir de l'estudi del perfil proteòmic del plasma per HPLC-MS/MS, la present tesi inclou els resultats de la validació per la tècnica d'ELISA de 5 d'aquests biomarcadors. L'ELISA és una tècnica complementària, més fàcil d'aplicar de manera rutinària, menys costosa i més sensible per determinar els nivells plasmàtics dels biomarcadors. La validació es va realitzar utilitzant els mateixos pacients analitzats per la tècnica proteòmica (Taula 10). Es van escollir els biomarcadors en funció de diferents característiques: significació estadística; abundància diferencial i representació en les mostres analitzades; identificació anterior de la proteïna en càncer i/o CHC tant en teixit com en plasma; disponibilitat comercial de l'anticòs; funció de la proteïna. Els resultats de l'ELISA dels diferents biomarcadors es mostren a la figura 33.

Biomarcadors diagnòstic de CHC

Biomarcadors de disseminació tumoral

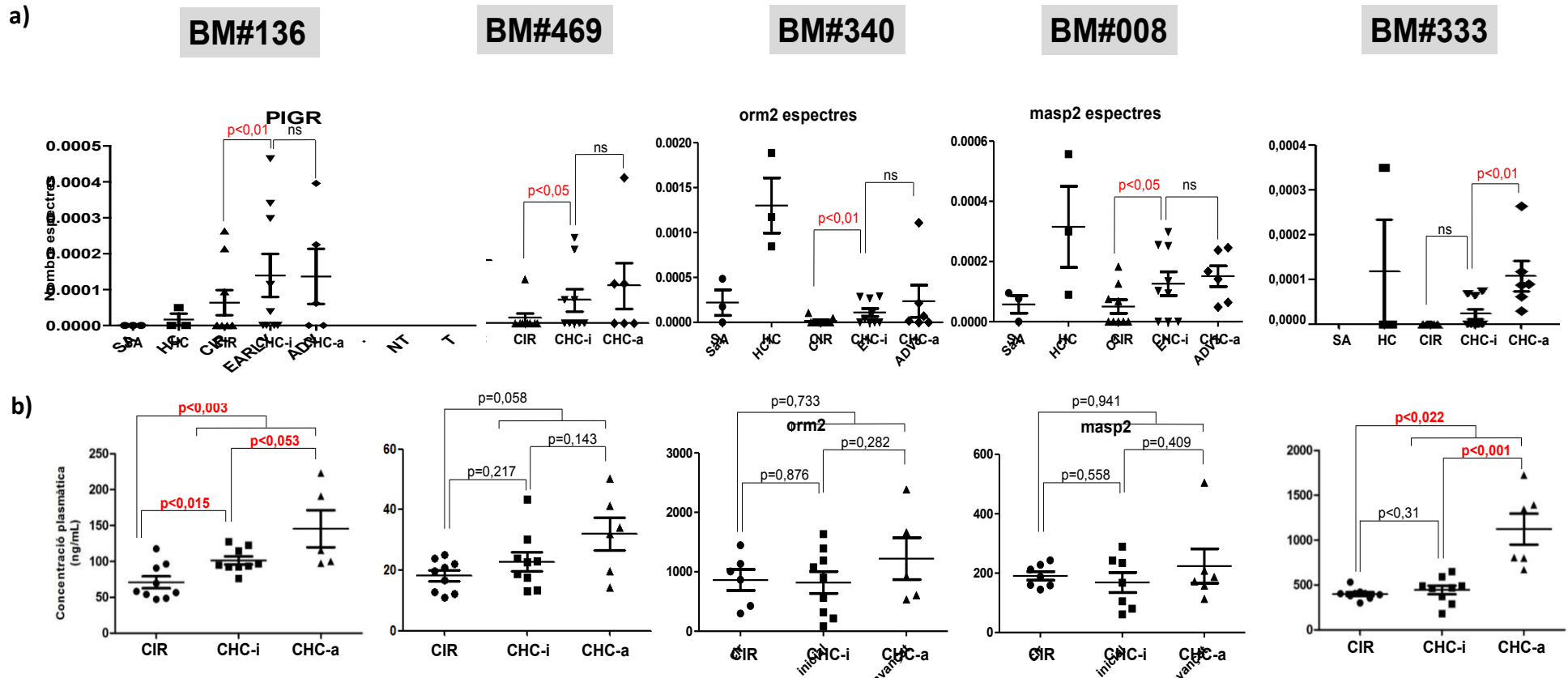


Figura 33. a) Representació quantitativa de l'abundància d'espectres en plasma de 5 biomarcadors identificats per proteòmica seleccionats per validació amb la tècnica d'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). La diferència significativa ($p < 0.05$ o $p < 0.01$) de l'abundància d'espectres es va establir amb el mètode bioestadístic *Spectral Index* entre els grups analitzats. Tal com es mostra, els primers quatre biomarcadors (BM#136, BM#469, BM#340, BM#008) es van identificar com a potencials biomarcadors diagnòstic de CHC inicial al presentar una diferència significativa d'abundància entre mostres de pacients cirròtics Child Pugh A sense tumor vers pacients cirròtics Child Pugh A amb un tumor inicial. En canvi, el BM#333 es va identificar com a potencial biomarcador de disseminació tumoral de CHC al presentar una diferència d'abundància significativa entre mostres de pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC avançat i disseminat vers pacients cirròtics Child Pugh A amb CHC inicial sense factors de recidiva tumoral a la peça quirúrgica. b) Representació quantitativa de les concentracions plasmàtiques per la tècnica d'ELISA dels 5 biomarcadors identificats per proteòmica i seleccionats per validar els nivells plasmàtics. Tal com es mostra, es van validar els nivells plasmàtics del BM#136 observant un increment de les concentracions del marcador entre mostres de pacients cirròtics sense CHC i amb CHC en diferents estadis tumorals. Cal destacar que el BM#469 va mostrar una tendència ($p < 0.058$) d'increment de concentració entre mostres de pacients cirròtics sense CHC i pacients cirròtics amb CHC. A més, es va validar el BM#333 demostrant un augment de la seva concentració plasmàtica en pacients amb CHC disseminat vers pacients cirròtic sense CHC o amb CHC inicial, resultats similars als obtinguts per proteòmica. *Els noms de les proteïnes no s'especifiquen degut al fet que els presents resultants estan en vies d'ésser patentats.*

4.3.2.1 Validació de putatius biomarcadors diagnòstic inicial de CHC

En concret, es van validar 5 putatius biomarcadors diagnòstic, tots ells identificats a l'anàlisi quantitativa. Un d'aquests, del biomarcador BM#136, va mostrar concentracions plasmàtiques estadísticament més elevades en pacients amb CHC (inicials i avançats) que en pacients cirròtics sense CHC 117.1 ± 41 vs 71 ± 24.8 ng/mL ($p < 0.003$), respectivament. A més, les concentracions plasmàtiques van ser més elevades en pacients amb CHC avançat que en CHC inicial que en pacients cirròtics sense CHC (mitja \pm DE): 145.4 ± 57.8 ng/mL vs 101.3 ± 16.7 ng/mL ($p < 0.053$) vs 71 ± 24.8 ng/mL ($p < 0.015$), respectivament (Figura 37). Quan es va comparar el grup de pacients amb CHC (inicial i avançat) amb el grup de pacients cirròtics sense tumor, la corba ROC pel BM#136 va mostrar un punt de tall òptim de 91.50ng/mL (àrea sota la corba 0.873, sensibilitat 92.9% i especificitat 77.8%).

És interessant senyalar que per aquest biomarcador es van estudiar els nivells en 14 mostres aparellades sense i amb tumor procedent de 7 pacients (Figura 34). El temps mig entre la inclusió del pacient a l'estudi (Grup "cirrosi") i el diagnòstic de CHC va ser de 25.38 mesos de mitja amb un rang de 12 a 42 mesos. Com es pot veure a la figura 36, els nivells plasmàtics del biomarcador augmentaven en 4 de 7 pacients amb l'aparició del CHC (*fold change* 1.3-2.1). Tres de 7 dels pacients amb CHC presentaven nivells superiors de concentració al punt de tall òptim segons corba ROC de 91.5 ng/mL. Destacar que el pacient que presentava nivells inicials > 91.5 ng/mL se li va detectar el CHC en el menor temps de seguiment de la sèrie (12mesos), dada que podria fer sospitar de la possible presència del tumor en la primera mostra tot i no detectar-se per tècniques d'imatge en el control semestral en el programa de cribratge. A banda és important ressaltar que 3 dels 4 pacients que van presentar valors menys elevats del marcador al moment del diagnòstic del CHC, presentaven un tumor únic petit menor de 30mm. L'únic cas amb els nivells més baixos de BM i mida tumoral de 36mm va resultar ser un tumor amb una molt bona diferenciació histològica en què el diagnòstic a la peça quirúrgica no es va poder diferenciar entre un CHC ben diferenciat i una hiperplàsia nodular focal. En canvi, 2 dels pacients que presentaven valors del marcador per sobre el punt de tall de 91.5 ng/mL van resultar ser multinodulars i/o moderadament diferenciats.

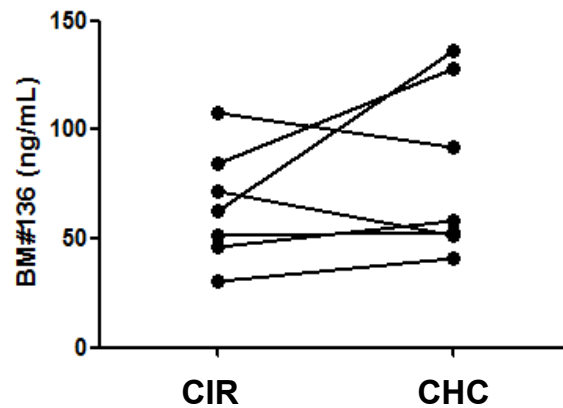


Figura 34: Representació quantitativa dels nivells plasmàtics del biomarcador BM#136 obtinguts per la tècnica d'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) en mostres aparellades procedents de 7 pacients, diagnosticats inicialment de Cirrosi (CIR) i que en el transcurs del seguiment de 25.38 mesos de mitja, i rang: 12-42 mesos se'ls va detectar un carcinoma hepatocel.lular (CHC).

Es van validar la concentració plasmàtica de 4 biomarcadors més de diagnòstic inicial (BM#008, BM#340 i BM#469) però els resultats obtinguts per proteòmica no es van poder validar amb la tècnica d'ELISA (Figura 35). Tot i això el BM#469 va mostrar una tendència positiva d'increment dels nivells plasmàtics del marcador en pacients cirròtics amb tumor en comparació a pacients cirròtics sense tumor ($p < 0.058$).

4.3.2.2 Validació de putatius biomarcadors de disseminació tumoral

Per la present tesi, es va escollir validar dos biomarcadors de disseminació de CHC identificats a partir de l'anàlisi quantitativa. En concret, es van estudiar les concentracions del biomarcador BM#333 amb ELISA en les 9 mostres de cirròtics sense tumor vers 15 mostres de pacients amb CHC, observant una diferència de concentracions estadísticament més elevades en pacients amb CHC (inicials i avançats) que en pacients cirròtics sense CHC 716.7 ± 440.8 ng/mL vs 399.8 ± 61.8 ($p < 0.022$), respectivament. A més, concentracions plasmàtiques van ser més elevades en pacients amb CHC avançat que en CHC inicial i que en pacients cirròtics sense CHC (mitja \pm DE): $1124 + 423$ ng/mL vs 445.1 ± 144.1 ng/mL ($p < 0.001$) vs 399.8 ± 61.8 ng/mL ($p < 0.31$), respectivament (Figura 37). Quan es va comparar el grup de pacients amb CHC (inicial i avançat) amb el grup de pacients cirròtics sense tumor, la corba ROC pel marcador BM#333 va mostrar un punt de tall òptim de 442 ng/mL (àrea sota la corba 0.785, sensibilitat 80% i especificitat 88.9%).

A més, també es va estudiar per ELISA el marcador BM#460 però els resultats obtinguts no van ser valorables.

DISCUSIÓ

5 DISCUSIÓ

El present treball de tesi ha permès identificar un panell de nous biomarcadors plasmàtics de CHC, mitjançant l'anàlisi proteòmica de 30 mostres de plasma procedents de individus amb diferent grau de dany hepàtic. Aquests potencials biomarcadors podrien tenir aplicabilitat diagnòstica després de la seva validació en una sèrie més ampla de pacients.

La tècnica d'anàlisi global de tot el conjunt de proteïnes per espectrometria de masses, prèvia separació amb cromatografia líquida (HPLC-MS/MS) utilitzada en la present tesi, és una tècnica d'alta sensibilitat que proporciona una gran quantitat d'informació. A diferència de la major part d'estudis que seqüencien directament la mostra deplecionada al HPLC-MS/MS²⁰¹⁻²⁰³, metodològicament en el present estudi s'ha realitzat un pas addicional previ a l'anàlisi per HPLC-MS/MS. Aquest pas ha consistit en el fraccionament del plasma ja deplecionat de 20 proteïnes majoritàries mitjançant una electroforesi desnaturalitzant de poliacrilamida, la qual ha permès l'anàlisi de diferents fraccions de proteïnes plasmàtiques separades per pes molecular. Aquest pas assegura una major resolució en la posteriors seqüenciació peptídica ja que evita la seqüenciació majoritària de proteïnes grans en relació a les proteïnes petites. Per tal d'homogeneïtzar la variabilitat experimental que comporta aquest pas previ, es va dissenyar un motlle de 0.3x1.6cm que permetia analitzar la mateixa àrea de gel electroforètic en totes les mostres. Aquest tipus de pre-fraccionament per electroforesi unidimensional es sol utilitzar per comparar diferents mostres i poder identificar les bandes de proteïnes diferencials, una vegada es tenyeix el gel amb diferents tipus de colorant. Les bandes de proteïnes que mostres diferències d'intensitat significatives s'analitzen individualment per tal de detectar les proteïnes diferencials entre mostres^{186,204-206,169}. En canvi, en el cas d'aquest projecte, s'ha analitzat la major part del perfil proteic de cada mostra extret amb el motlle, i no només les bandes de proteïnes diferencials. Aquesta estratègia és molt poc utilitzada ja que comporta una gestió i anàlisi d'un elevat nombre de proteïnes totals, per això pocs grups l'apliquen en els seus estudis, a destacar únicament 2 estudis publicats^{189,207}. És interessant senyalar que s'ha obtingut un rendiment de proteïnes

identificades per mostra de 235 proteïnes de mitja, resultat comparable en nombre total de proteïnes amb la resta de dades publicades utilitzant tècniques similars^{201,203,207}. Ara bé, els proteïnes identificades es localitzen en un rang de pes molecular entre 0.2 i 780 KD per tant, la tècnica ha permès identificar proteïnes molt petites, en comparació a les dades publicades del grup de Tsung els quals detecten proteïnes fins a 9 kDa²⁰². En la resta de publicacions manca aquesta informació.

El principal punt a ressaltar d'aquest projecte és l'elevat nombre de mostres analitzades: 27 mostres de plasma de pacients amb diferents graus d'hepatopatia crònica amb i sense tumor i 3 controls sans sense patologia hepàtica. Aquest nombre de mostres és comparativament superior a la resta de grups que realitzen la mateixa tècnica, ja que normalment es comparen entre 5 i 15 mostres diferents^{201,204}. Per tal d'ampliar la població d'estudi però sense augmentar el nombre de de mostres analitzades, hi ha grups que opten per l'estratègia de comparar grups de mostres formades per la mescla de moltes mostres individuals (*pools*), fet que evita conèixer la variabilitat entre pacients^{169,186,207}. El nombre de mostres analitzades en aquest projecte (de 3 a 15 mostres per grup) ha permès tenir una aproximació més precisa del perfil proteic en aquest tipus de pacients. Recentment, s'han publicat dos estudis amb un nombre elevat de mostres utilitzant la mateixa tècnica experimental: el grup de Shang et al. que va comparar 35 mostres (n=17 CHC i n=18 cirròtics) identificant l'osteopontina com a marcador diagnòstic de CHC, que posteriorment s'ha validat en una sèrie independent més àmplia de 312 pacients¹⁸⁹. Aquesta publicació, però, no aporta la informació del nombre total de proteïnes identificades i les característiques de les mateixes. El grup de Tsung et al. ha fet un estudi proteòmic del plasma de dues cohorts extenses independents de pacients amb i sense CHC (Cohort 1: n= 40 CHC i n=49 cirròtics i cohort 2; n=50 CHC i n=56 cirròtics)²⁰². Aquest grup identifica un total de 269 proteïnes seleccionant-ne 21 com a potencials biomarcadors, 11 proteïnes sobrerregulades en CHC amb una diferència d'abundància de 1.1-1.9 i 10 proteïnes infraregulades en CHC amb una diferència d'abundància de 0.5-0.8. D'entre aquestes 21 proteïnes, el nostre grup n'ha identificat 5 com a potencials marcadors diagnòstic de CHC obtenint resultats no concordants en tots ells.

Com estudi en fase I pel desenvolupament de biomarcadors de càncer, és crític el disseny i la bona selecció dels grups d'anàlisi per l'apropiada validesa dels resultats. En aquest sentit, la selecció dels pacients de cada grup s'ha fet de manera rigorosa, homogeneïtzant els possibles factors de variabilitat com és l'edat, el sexe, l'etiologia de la cirrosi i la funció hepàtica. En aquest aspecte, la majoria de grups de treball no tenen en compte aquests possibles factors de variabilitat dels pacients seleccionats^{208,209,210}, no permetent extreure conclusions dels resultats aportats. A més, quan l'objectiu de l'estudi és la identificació de marcadors de diagnòstic precoç, és molt important seleccionar molt bé els pacients amb tumors en estadis inicials i no barrejar diferents graus de malaltia tumoral. En aquest aspecte, el nostre grup ha seleccionat molt rigorosament els 9 pacients amb CHC inicial.

El perfil proteic del plasma reflexa el grau de dany hepàtic.

Ja que el fetge és el principal òrgan productor de proteïnes plasmàtiques, és d'esperar que la seva disfunció alteri el perfil proteic plasmàtic. La proteòmica s'ha utilitzat com a eina per identificar diferències entre el perfil proteic de pacients amb diferents graus d'hepatopatia crònica²¹¹⁻²¹⁴. No obstant, els resultats de la d'aquesta tesi presenten com a novetat si es compara amb la literatura prèvia, que el perfil proteòmic del plasma obtingut reflexa les diferències del grau de dany hepàtic i és capaç de separar les mostres en diferents grups en funció del grau de disfunció hepàtica en un anàlisi no supervisada posant en valor la robustesa dels resultats obtinguts.

A més, indica la importància de seleccionar acuradament i de manera homogenia les mostres en base a la funció hepàtica tal com s'ha realitzat alhora de buscar biomarcadors de càncer, evitant així que la variabilitat entre mostres no sigui deguda a la presència del càncer sino per diferències en la funció hepàtica.

Les diferències en el perfil proteic associat a fases inicials de dany hepàtic mostren una activació de la resposta inflamatòria aguda.

A partir de l'anàlisi bioestadística, s'han identificat 31 proteïnes diferentment abundants en pacients amb malaltia hepàtica inicial (hepatopatia crònica lleu) i cirrosi compensada (Child-Pugh A) vers cirrosi descompensada (Child-Pugh B). En concret, l'anàlisi d'anotació funcional mitjançant el programa IPA, ens indica un activació de la via de

resposta de fase aguda, en les mostres de pacients cirròtics en comparació amb mostres de pacients amb hepatitis crònica. La resposta aguda es produeix davant d'un dany hepàtic i s'inicia una activació de les cèl·lules innates del sistema immune que inclouen les cèl·lules de Kupffer, monòcits, macròfags, cèl·lules *natural killer*, cèl·lules dendrítiques²¹⁵. Aquesta activació produeix un increment en el plasma de nombroses proteïnes inflamatòries tals com la proteïna C reactiva (PCR), *serum amyloid A* (SAA), orosomuroid, o inhibidors de les proteases (l'alfa 1 antitripsina, la alfa 2 macroglobulina), factors de coagulació (fibrinogen, protrombina, plasminogen), proteïnes de transport (haptoglobina, ferritina) i components del complement. Per tant, en el nostre cas, s'observa aquesta via de resposta aguda activada ja que s'identifiquen 12 proteïnes de resposta aguda en el perfil proteic diferencial entre pacients amb diferents graus de dany hepàtic.

Les diferències en el perfil proteic suggereixen una immunodeficiència en pacients amb cirrosi descompensada.

En una fase de cirrosi avançada al comparar el perfil proteic de pacients cirròtics Child-Pugh B vers Child-Pugh A, el que s'observa és una disminució significativa de la concentració plasmàtica de les 10 (32.3%) proteïnes relacionades amb el sistema de immunitari i la resposta inflamatòria. Com s'observa en la figura 27_b de la present tesi, 9 de 10 proteïnes presenten concentracions plasmàtiques inferiors en cirrosi avançada, excepte una proteïna la qual augmenten els valors en comparació a pacients amb cirrosi inicial. Aquestes resultats es troben en concordança amb els obtinguts pel grup de Melisa Dirchwolf et al. que observen una disminució del nivell de citocines (IL-7, IL-10, IL-12, TNF-a, MCP-1 i IFN-c) en pacients amb disfunció hepàtica avançada comparat amb cirrosi inicial i voluntaris sans²¹⁶. Aquesta observació ja s'ha descrit prèviament a la literatura^{217,218}. En aquest sentit, es coneix que l'alteració del sistema immune i inflamatori en la cirrosi és un procés multifactorial i que avarca diferents fases. Inicialment el dany hepàtic provoca una producció de productes moleculars resultants d'hepatòcits necròtics que activa el sistema immune causant una inflamació sistèmica estèril. A banda existeix una citopènia secundària a l'hiperesplenisme per la hipertensió portal. Finalment de bacteries i productes bacterians al torrent sanguini procedents de

la flora intestinal provocat per l'increment de permeabilitat de la paret intestinal, activa una resposta immune i inflamatòria amb la producció de nombroses citokines i leucòcits. Aquesta permanent activació del sistema immunitari acaba provocant el desgast del mateix sistema amb la conseqüent disfunció i immunodeficiència entrant en una fase de "tolerància a l'endotoxina"²¹⁸.

El perfil proteic dels pacients cirròtic amb CHC mostra una activació de diferent mecanismes relacionats amb la capacitat tumorigènica de les cèl·lules.

Al comparar mostres de pacients cirròtics amb i sense CHC també s'ha vist que presenten un perfil proteic significativament diferent, observant-se també canvis a mesura que augmenta l'estadi tumoral, és a dir, en fases de disseminació tumoral. Tal i com era d'esperar, el grup de pacients cirròtics amb funció hepatocel·lular conservada amb i sense CHC inicial és un grup més homogeni, on les diferències en el perfil proteic no resulten tan evidents, fet que ja s'objectiva a l'anàlisi no supervisada. No obstant això, l'anàlisi supervisada aplicant el test bioestadístic Spl sí que és capaç d'identificar una llista de 46 proteïnes diferentment abundants entre els dos grups.

L'anàlisi d'anotació funcional mitjançant l'IPA, mostra que els pacients cirròtics amb CHC presenten una activació de nou de les proteïnes de reacció de fase aguda a més d'una desregulació de la producció d'òxid nítric. En aquest sentit l'any 1990 ja es va descriure que nivells elevats de proteïnes de fase aguda com la proteïna C reactiva es podrien utilitzar com a marcadors de càncer²¹⁹. Per altra banda, la producció d'òxid nítric (ON) també s'ha relacionat amb la inflamació hepàtica i el seu paper en càncer. Es coneix que una producció baixa d'ON té un efecte beneficiós pel fetge per les seves propietats antimicrobianes, antiapoptosi durant la inflamació aguda. No obstant això, en el context de la inflamació crònica del fetge, una quantitat de NO permanentment elevada pot ser genotòxica i conduir al desenvolupament de CHC²²⁰.

A més, és interessant senyalar que la principal diferència entre el perfil proteic de pacients cirròtics amb CHC de diferents estadis tumorals, indica una activació del sistema LXR/RXR en pacients amb tumors disseminats. *Liver X receptors* (LXR) són receptors nuclears la funció dels quals és el transport de colesterol, metabolisme de la glucosa i modulació de la resposta inflamatòria^{221,222}. La cascada LXR/RXR s'ha vist relacionada com a mecanisme d'evasió del sistema immune, per exemple afectant la

migració de les cèl·lules dendrítiques als òrgans limfoides, o promovent l'eliminació de l'apoptosi per part de les cèl·lules dendrítiques i els macròfags, d'entre altres mecanismes^{223,224}. Aquesta capacitat d'evasió del sistema immune afavoreix el creixement de les cèl·lules tumorals i la capacitat metastàsica^{22,225,224,226}. Per tant és una via diana d'interès terapèutic per noves teràpies contra el càncer²²⁴. En càncer, s'ha relacionat aquest sistema per exemple en càncer de pròstata^{227,228}, però mai s'havia descrit anteriorment en CHC.

A banda, es va estudiar si les diferències en les proteïnes plasmàtiques es trobaven regulades per un mateix factor. Aquest és un anàlisi que es sol utilitzar en bases de dades òmiques a nivell de teixit o cèl·lula per identificar els factors oncogènics que actuarien *upstream* de les vies de senyalització intracel·lular (*upstream regulators*) i que serien les responsables del fenotip d'una cèl·lula maligne com ara la proliferació sostinguda, l'evasió de mecanismes supressors del creixement, la resistència a la mort cel·lular, inducció de l'angiogènesi, l'activació de mecanismes d'invasió i metastasi, la reprogramació del metabolisme energètic i/o la evasió del sistema immune²².

És interessant assenyalar que aquest anàlisi no identifica cap *upstream regulator* en els perfils proteics de mostres plasmàtiques procedents de pacients sense càncer com són els individus sans o bé els pacients amb HC o cirrosi sense CHC. Per contra, sí que s'ha identificat una possible activació d'oncogens en el plasma de pacients amb CHC en diferent estadi. S'ha predit l'activació de l'oncogen MYC. L'activació d'aquest oncogen es deu a diferents mecanismes com el de l'amplificació gènica o per alteracions epigenètiques que augmentarien la seva expressió gènica, i aportarien a la cèl·lula tumoral la capacitat de proliferar descontroladament. L'activació de MYC s'ha descrit àmpliament en càncer i sobretot relacionat amb un pitjor pronòstic²²⁹⁻²³². També és interessant senyalar que la activació de l'oncogen MYC s'ha relacionat amb el pronòstic de CHC^{20,233,234,235}, observant una diferència significativa en la seva amplificació en tumors multinodulars, tumors disseminats i en recidives tumorals²³⁴. Aquests resultats estan en concordança amb els resultats obtinguts en aquesta tesi en la qual es veu que els casos més agressius de CHC tindrien activat l'oncogen MYC, fet que som capaços de veure, de manera indirecta, segons les proteïnes alliberades pels CHC avançats en el torrent sanguini.

A banda de MYC, s'observa també l'activació d'altres *upstream regulators* en mostres procedents de pacients amb CHC avançat. Un d'aquests, és el factor de creixement vascular *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Aquesta és una proteïna senyalitzadora implicada en la vasculogènesi (formació *de novo* de sistema circulatori) i en la angiogènesi (creixement dels vasos sanguinis preexistents). El gen d'aquesta proteïna és crític en el desenvolupament tumoral, àmpliament descrit en CHC^{236,237}. A més s'ha correlacionat tant l'increment d'expressió tissular del VEGF com els nivells elevats en sèrum amb una major agressivitat tumoral, major disseminació i pitjor pronòstic en CHC^{238,239}. Novament els nostres resultats obtinguts són concordants amb la literatura ja que s'ha predit l'activació d'aquest factor a partir de les proteïnes presents en el plasma de pacients amb CHC disseminat. A més, aquest gen és interessant ja que s'ha proposat com a diana terapèutica amb l'objectiu d'inhibir la supervivència tumoral al inhibir la neoangiogènesi, per exemple sent una diana del Sorafenib, d'entre altres tractament proposats^{125,240}. A banda de MYC i VEGF, també s'observa una activació del factor de creixement dels hepatòcits *Hepatocyte growth factor* (HGF) que és un potent mitogen dels hepatòcits, únic lligant del receptor de HGF (c-MET). La sobre activació de c-MET induïx el trencament intercel·lular promovent la migració cel·lular i per tant la progressió tumoral i metàstasi^{241,242}. S'ha observat la sobreexpressió de c-MET en teixit tumoral CHC vers teixit no tumoral²⁴³, i la seva inhibició és un atractiu terapèutic per la disminució de proliferació, migració i invasió tumoral²⁴⁴. El factor nuclear 1 alfa dels hepatòcits (HNF1A) també conegut com HNF1 homeobox A, és un factor de transcripció que presenta uns nivells elevats d'expressió en el fetge i està implicat en la regulació de varis gens específics. Hi ha evidència del paper que juga HNF1a en el desenvolupament del CHC, per exemple, s'ha vist que HNF1a està sobrerregulat en teixit no tumoral el qual desenvolupa CHC ben diferencials, tot i que la seva expressió declina altra vegada en CHC agressius mal diferencials²⁴⁵. El grup de Shim et al. va observar que una activació HNF1 α peritumoral es correlacionava a una recidiva precoç de CHC postresecció quirúrgica²⁴⁶.

Per tant, com es pot resumir, les proteïnes presents en plasma de pacients cirròtics amb CHC avançat prediuen l'activació de 4 gens relacionats amb la capacitat tumorigènica de les cèl·lules: capacitat proliferativa (myc), neoangiogènesi (VEGF), migratòria i per

tant metastàtica (HGF) i capacitat reguladora de transcripció gènica (HNF1A). Aquests gens estarien actuant en les diferents vies *hallmarks* en càncer, capacitats adquirides de les cèl·lules tumorals per la seva supervivència, proliferació i invasió²².

És important assenyalar que tots ells ja s'han descrit a la literatura com a alterats en CHC i han estat estudiats com a potencials dianes terapèutiques pel control de la progressió tumoral^{234,243,245,247}.

Identificació de potencials biomarcador diagnòstic de CHC

La falta de marcadors serològics pel diagnòstic precoç del CHC dificulta el seu diagnòstic en un estadi inicial en el qual es poden aplicar teràpies curatives que allarguen la supervivència dels pacients. Per aquest motiu és tan important la cerca de biomarcadors que en ajudin a detectar el tumor en un estadi inicial.

Després d'estudiar el perfil proteic de cada grup de mostres de l'estudi i contrastar la validesa dels resultats amb el que està descrit a la literatura, s'ha seleccionat de manera homogènia un subgrup de mostres per tal d'identificar potencials biomarcadors de CHC tan d'estadi inicial com d'estadi avançat amb malaltia disseminada. Al comparar pacients cirròtics sense tumor amb pacients cirròtics amb tumor inicial, amb la mateixa funció hepàtica, s'han identificat diferències significatives en els nivells plasmàtics de 54 proteïnes, de les quals 27 es trobaven representades en més del 50% del grup enriquit i en una abundància de més del doble (17 enriquides en el grup de pacients cirròtics sense tumor i 10 enriquides en el grup de pacients amb CHC inicial). Tot i que a l'anàlisi no supervisada aquests dos grups de mostres formessin un conglomerat homogeni, ja esperable per la semblança de les mostres a nivell patològic, els resultats de l'anàlisi proteòmic ha demostrat unes diferències d'abundància elevades (més de 2 vegades entre les proteïnes diferentment enriquides). Això es pot explicar per l'alta sensibilitat de la tecnologia utilitzada. En concret, s'ha observat que la majoria dels marcadors enriquits en tumor inicial estan relacionats amb la resposta immunitària i inflamatòria (32%). Per la present tesi, s'han estudiat els nivells plasmàtics de 5 dels 27 (18.5%) marcadors seleccionats amb la tècnica complementària *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). En concret, nivells plasmàtics més elevats del biomarcador BM#136 i el BM#469 es van observar en mostres de pacients amb CHC en comparació amb mostres

de pacients cirròti sense CHC. El BM#136 es tracta d'una proteïna de secreció sintetitzada per les cèl·lules epitelials, ubicada a la membrana plasmàtica, relacionada amb la funció d'immunitat innata. El resultat de l'ELISA clarament valida el resultat obtingut en l'estudi proteòmic i mostra que els nivells plasmàtics del BM#136 són significativament i progressivament més elevats en pacients amb CHC inicial i disseminat en comparació amb pacients sense tumor. A nivell de CHC hi ha dos estudis que correlacionen positivament l'expressió del BM#136 amb la capacitat invasora i pitjor pronòstic en mostres de teixit de CHC. Així mateix s'ha observat l'expressió d'aquest marcador en altres càncer com còlon, esòfag, pulmó sempre relacionat amb mal pronòstic. Per contra no s'ha trobat cap article on s'hagin estudiat els nivells d'aquest biomarcador en plasma. És interessant destacar però, la potencial capacitat diagnòstica precoç del BM#136 objectivada en els resultats obtinguts a partir de mostres aparellades. En aquest sentit, s'ha observat com els nivells plasmàtics dels marcador augmenten amb l'aparició tumoral, i en un 43% dels pacients per sobre del punt de tall de 91.5ng/mL identificat a partir de les corbes ROC, correlacionant-se els nivells plasmàtics amb la mida tumoral i la multinodularitat. Aquesta capacitat diagnòstica precoç no s'ha descrit anteriorment en altres càncers ni en CHC.

Referent al marcador BM#469 és interessant senyalar que tot i que la diferència d'abundància entre pacients cirròtics amb i sense CHC no va ser estadísticament significatiu, la tendència observada és prou evident com per tenir en compte aquest biomarcador en una fase posterior d'estudi en una àmplia cohort de mostres. Aquest biomarcador es tracta d'una proteïna de secreció, involucrada en la resposta immunitària innata i que s'ha descrit relacionada en diferents càncers per exemple còlon, pàncreas, pròstata. En CHC, s'ha descrit una correlació positiva de l'expressió tissular amb un pitjor pronòstic però no s'han estudiat els seus nivells plasmàtics en CHC. Per contra, sí s'han observat nivells elevats d'aquest marcador en sang en pacients amb càncer colorectal comparat en població sana.

Identificació de potencials biomarcadors pronòstic de CHC

Pels pacients amb una malaltia avançada, la identificació de biomarcadors metastàsics poden ajudar a detectar estadis inicials de la disseminació tumoral, predir la probabilitat de recidiva i els llocs de metastasi. Aquests marcadors poden identificar-se en sang, altres fluids biològics i poden ser dianes de tractament. Per això, els biomarcadors detectats en sang tenen l'avantatge de ser mínimament invasius i poden facilitar la teràpia personalitzada en els diferents estadis de malaltia. En l'anàlisi proteòmica s'han identificat també possibles marcadors de malaltia disseminada comparant pacients amb CHC d'estadi inicial (BCLC 0/A) vers pacients amb tumor avançat i disseminat (BCLC B/C). En aquest cas, s'han seleccionat les mostres de manera rigurosa, mostres d'aquells pacients amb CHC inicial dels quals es disposava la peça quirúrgica que descartava la presència de satel·litosi o invasió vascular, factors de recidiva tumoral, o en altre cas aquells pacients els quals tenien un seguiment lliure de malaltia major a 24 mesos. Aquesta selecció intenta assegurar la puresa del grup catalogat com CHC inicial. En el present estudi s'han identificat 46 potencials biomarcadors de malaltia disseminada, 40 dels quals es troben en més del 50% de les mostres i en més del doble de vegades en el grup enriquit. Finalment s'ha acotat el nombre de candidats a 36 proteïnes diferencials enriquides en tumor avançat identificades a partir de l'anàlisi quantitativa i qualitativa. En la present tesi s'han estudiat dos d'aquest biomarcadors per la tècnica d'ELISA: el BM#333 i el BM460. S'han validat els nivells plasmàtics del BM#333, observant uns nivells elevats altament significatius del marcador entre mostres de CHC inicial i CHC avançat. Aquest biomarcador és una proteïna de secreció, involucrada en la regulació del creixement cel·lular, extensament descrita en la proliferació i invasió de múltiples tumors, per exemple càncer gàstric, pulmonar, mama, inclòs el CHC, tant en teixit com a nivell plasmàtic.

És important també destacar que el 55% de proteïnes identificades en el nostre anàlisi no s'han descrit anteriorment en CHC. Gràcies als resultats obtinguts disposem actualment d'un elevat nombre de dades a explorar en futures investigacions.

La present tesi s'enmarca dins un projecte més ampli en el qual s'esta validant un nombre més nombros de biomarcadors de CHC. Al final d'aquest projecte es preveu

definir un panell de biomarcadors plasmàtic diagnòstic de CHC així com un panell de biomarcadors pronòstic que permetin identificar els pacients amb més risc de recidiva després de la resecció quirúrgica.

Els nivells plasmàtics dels 3 biomarcadors validats per ELISA en la present tesi, estant ja sent validats en una cohort més àmplia de pacients cirròtics amb i sense tumor, rigurosament seleccionats a partir de la col·lecció de mostres biològiques que s'ha establert durant l'execució de la present tesi. La col·lecció de mostres biològiques, establerta pel grup d'oncologia hepàtica *Liver Oncology Group* (LOG) del IGTP comprèn més de 400 mostres de plasma que estan ben anotades amb dades demogràfiques, clíniques i anatomopatologies i que ha estat actualitzada al llarg dels 5 anys des de l'inici d'aquesta tesi. És important destacar que la col·lecció inclou un l'elevat nombre de mostres de pacients amb CHC inicials, és a dir, nòduls únics de ≤ 2 cm (n=30), per tal de poder validar els biomarcadors diagnòstic. A més, un dels objectius futurs seria investigar si en pacients que al llarg del seguiment han presentat metàstasis, i en el moment que se va prendre el plasma no tenien metàstasis ni trombosi popal, analitzar la presència d'aquests factors per valorar la seva capacitat pronòstica de malaltia. I en el cas de pacient operats o tractats amb tractament curatiu que recidiven, com que disposem de plasma en el moment de la resposta completa i en el moment de la recidiva, analitzar la presència d'aquests biomarcadors potencials pronòstic. Afegir que el grup LOG disposa també d'una col·lecció de mostres de teixit tumoral tant fresc com parafinat, que permetrà l'estudi d'expressió dels diferents biomarcadors identificats en plasma en mostres tumorals.

En resum, la present tesi ha permès identificar un perfil proteic plasmàtic específic i robust pels diferents graus de dany hepàtic així com biomarcadors de CHC mitjançant l'aplicació de tècniques de proteòmica d'alt rendiment. Per una banda, l'estudi dels diferents perfils obtinguts ens ha permès identificar diferents sistemes i vies de senyalització desregulats segons el tipus d'hepatopatia que permetran entendre millor els processos biològics que es troben associats a la malaltia hepàtica i dissenyar noves estratègies terapèutiques. Per altra banda, un cop validats els possibles biomarcadors

identificats de CHC d'estadi inicial i d'estadi disseminat en una cohort més àmplia de mostres, a partir de la col·lecció de mostres establerta al llarg de la present tesi, creiem que es podrien utilitzar per millorar el maneig clínic del pacient amb CHC. Tant per detectar la malaltia en un estadi precoç quan encara és possible aplicar tractaments curatius com detectar aquells casos amb elevat risc de recidiva. És important assenyalar que donat que s'estan duent a terme els tràmits per garantir la protecció intel·lectual dels resultats generats en la present tesi, no ha estat possible revelar el nom dels biomarcadors.

CONCLUSIONS

6 CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts a partir dels estudis que formen aquesta Tesi Doctoral ens permeten arribar a les següents conclusions:

- Mitjançant l'aplicació d'una metodologia proteòmica d'alt rendiment que inclou depleció, fraccionament electroforètic i HPLC-MS/MS és possible distingir diferents perfils proteics del plasma de pacients segons el seu grau de dany hepàtic, diferenciant individus sans de pacients amb hepatitis crònica, cirròtics amb funció hepàtica preservada (Child Pugh A), cirròtics amb disfunció hepàtica (Child Pugh B) i cirròtics amb CHC.
- Les diferències en el perfil proteic associat a fases inicials de dany hepàtic mostren una clara activació de la via de reacció de fase aguda, resposta del fetge davant un estímul inflamatori.
- El perfil proteic del plasma de pacients amb cirrosi i funció hepàtica compromesa permet observar una immunodeficiència del sistema immunitari i inflamatori secundària al desgast del mateix sistema per la inflamació perllongada.
- La comparativa del perfil proteic de pacients cirròtics amb i sense CHC, mostra una activació de la via de reacció de fase aguda i de producció de l'òxid nítric en pacients amb càncer.
- A mesura que evoluciona la malaltia hepàtica inflamatòria, s'observa una desregulació del sistema LXR/RXR, el qual es troba significativament actiu en pacients cirròtics amb CHC disseminat.
- Les proteïnes plasmàtiques presents al plasma de pacients cirròtics amb CHC amb disseminació extrahepàtica indiquen la clara activació de l'oncogen MYC, dels factors de creixement VEGF i HGF i de dos factors de transcripció (HNF1A i CEBPA) que es troben relacionats amb la capacitat proliferativa, de neovascularització i migratòria de les

CONCLUSIONS

cèl·lules tumorals, capacitats necessàries pel creixement i disseminació de les cèl·lules malignes.

- L'anàlisi bioestadística de les dades proteòmiques obtingudes per HPLC-MS/MS mitjançant *Spectral Index* ens ha permès identificar 31 proteïnes associades a diferents graus de dany hepàtic, hepatitis crònica, cirrosi Child Pugh A i B/C.
- La comparació del perfil proteòmic de pacients cirròtics amb CHC d'estadi inicial (BCLC0/A) i el de pacients cirròtics amb CHC disseminat (BCLC B/C) ha identificat un panell de 67 biomarcadors de diagnòstic precoç de CHC i de malaltia disseminada.
- Un 34% dels biomarcadors identificats s'han descrit relacionats amb càncer però no en CHC i un 21% d'aquests no s'havien associat amb neoplàsies anteriorment. El 45% restant s'han descrit relacionats amb CHC, demostrant la validesa i utilitat de la metodologia aplicada.
- Dos de 5 (40%) biomarcadors de CHC identificats per HPLC-MS/MS, un de diagnòstic precoç (BM#136) i un de malaltia disseminada (BM#333), es van validar amb la tècnica ELISA.
- L'anàlisi dels nivells plasmàtics del biomarcador BM#136 en el seguiment de 7 pacients cirròtics mostra un increment dels nivells de la proteïna en el moment de l'aparició del CHC en 4 casos (57%), observant-se una relació entre l'aparició del tumor i l'increment dels nivells del biomarcador en plasma i suggerint una possible aplicació en el diagnòstic precoç del CHC després de la seva validació en una cohort més ampla de pacients.

BIBLIOGRAFIA

7 BIBLIOGRAFIA

1. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002;31(august):339-346. doi:10.1038/ng0802-339.
2. Roskams T, Kojiro M. Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis.* 2010;30(1):17-25. doi:10.1055/s-0030-1247129.
3. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis.* 2010;30(1):3-16. doi:10.1055/s-0030-1247128.
4. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012. (<http://globocan.iarc.fr>).
5. El-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 2011;365:1118-1127. doi:10.1056/NEJMra1001683.
6. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology.* 2004;127(5 Suppl 1):S35-S50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15508101>. Accessed November 8, 2015.
7. Ioannou GN, Splan MF, Weiss NS, McDonald GB, Beretta L, Lee SP. Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:938-945, 945 e1-e4. doi:S1542-3565(07)00231-5 [pii]\r10.1016/j.cgh.2007.02.039.
8. Dufour JF, Greten TF, Raymond E, et al. EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012;56(4):908-943. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.001.
9. Chang M-H, You S-L, Chen C-J, et al. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(19):1348-1355. doi:10.1093/jnci/djp288.
10. Singal AG, El-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma from Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(12):2140-2151. doi:10.1016/j.cgh.2015.08.014.
11. Association E. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2012;57(1):167-185. doi:10.1016/j.jhep.2012.02.010.

12. Pawlotsky J-M, Al E. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2014. *ILC 2014 London*. 2014;63:199-236. doi:10.1016/j.jhep.2014.05.001.
13. Nault J-C. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma according to aetiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(5):937-947. doi:10.1016/j.bpg.2014.08.006.
14. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):674-687. doi:10.1038/nrc1934.
15. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-218. doi:10.1172/JCI24282.
16. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 2007;27(1):55-76. doi:10.1055/s-2006-960171.
17. Ji J, Wang XW. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol*. 2012;39(4):461-472. doi:10.1053/j.seminoncol.2012.05.011.
18. Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene*. 2006;25(27):3818-3822. doi:10.1038/sj.onc.1209558.
19. Imbeaud S, Ladeiro Y, Zucman-Rossi J. Identification of novel oncogenes and tumor suppressors in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 2010;30(1):75-86. doi:10.1055/s-0030-1247134.
20. Zender L, Villanueva A, Tovar V, Sia D, Chiang DY LJ. Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2010;52(6):921-929. doi:10.1016/j.jhep.2009.12.034.
21. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>. Accessed July 10, 2014.
22. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
23. Wong C-M, Ng IOL. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2008;28(2):160-174. doi:10.1111/j.1478-3231.2007.01637.x.
24. Yam JWP, Wong CM, Ng IO-L. Molecular and functional genetics of hepatocellular carcinoma. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010;2:117-134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036934>. Accessed November 8, 2015.

25. Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2008;68(16):6779-6788. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0742.
26. Sun HC, Tang ZY. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: The retrospectives and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004;130:307-319. doi:10.1007/s00432-003-0530-y.
27. Sarasin FP, Giostra E, Hadengue A. Cost-effectiveness of screening for detection of small hepatocellular carcinoma in western patients with Child-Pugh class A cirrhosis. *Am J Med.* 1996;101(4):422-434. doi:10.1016/S0002-9343(96)00197-0.
28. 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.* 1992;16(1):132-137. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1352268>. Accessed September 15, 2015.
29. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology.* 2011;53(3):1020-1022. doi:10.1002/hep.24199.
30. Singal a, Volk ML, Waljee a, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;30(1):37-47. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.04014.x.
31. Sherman M. Surveillance for hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28(5):783-793. doi:10.1016/j.bpg.2014.08.008.
32. Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol.* 2001;34(4):570-575. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11394657>. Accessed April 1, 2015.
33. Farinati F, Marino D, De Giorgio M, et al. Diagnostic and prognostic role of α -fetoprotein in hepatocellular carcinoma: Both or neither? *Am J Gastroenterol.* 2006;101(3):524-532. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00443.x.
34. Marrero J a, Feng Z, Wang Y, et al. Alpha-fetoprotein, Des-gamma Carboxyprothrombin, and Lectin- Bound Alpha-fetoprotein in Early Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2009;137(1):110-118. doi:10.1053/j.gastro.2009.04.005.Alpha-fetoprotein.
35. Sterling RK, Jeffers L, Gordon F, et al. Clinical utility of AFP-L3% measurement in North American patients with HCV-related cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(10):2196-2205. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01405.x.
36. Toyoda H, Kumada T, Tada T, et al. Clinical utility of highly sensitive Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma patients with

- alpha-fetoprotein <20ng/mL. *Cancer Sci.* 2011;102(5):1025-1031. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01875.x.
37. Marrero J a., Su GL, Wei W, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in American patients. *Hepatology.* 2003;37:1114-1121. doi:10.1053/jhep.2003.50195.
 38. Nakamura S, Nouso K, Sakaguchi K, et al. Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(9):2038-2043. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00681.x.
 39. Tung EK-K, Mak CK-M, Fatima S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of serum and tissue Dickkopf-1 levels in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2011;31:1494-1504. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02597.x.
 40. Shen Q, Fan J, Yang XR, et al. Serum DKK1 as a protein biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: A large-scale, multicentre study. *Lancet Oncol.* 2012;13(8):817-826. doi:10.1016/S1470-2045(12)70233-4.
 41. Marrero J a., Romano PR, Nikolaeva O, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2005;43:1007-1012. doi:10.1016/j.jhep.2005.05.028.
 42. Mao Y, Yang H, Xu H, et al. Golgi protein 73 (GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2010;59(12):1687-1693. doi:10.1136/gut.2010.214916.
 43. Wang Y, Yang H, Xu H, et al. Golgi protein 73, not Glypican-3, may be a tumor marker complementary to α -Fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29:597-602. doi:10.1111/jgh.12461.
 44. Zhu WW, Guo JJ, Guo L, et al. Evaluation of midkine as a diagnostic serum biomarker in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19:3944-3954. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3363.
 45. Hu B, Tian X, Sun J, Meng X. Evaluation of individual and combined applications of serum biomarkers for diagnosis of Hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Int J Mol Sci.* 2013;14:23559-23580. doi:10.3390/ijms141223559.
 46. Sherman M. Serological surveillance for hepatocellular carcinoma: time to quit. *J Hepatol.* 2010;52(4):614-615. doi:10.1016/j.jhep.2009.11.026.
 47. Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, et al. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol.* 2005;43(3):434-441. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16136646>. Accessed April 20, 2015.

48. Lee I-C, Huang Y-H, Chan C-C, et al. Correlation between clinical indication for treatment and liver histology in HBeAg-negative chronic hepatitis B: a novel role of alpha-fetoprotein. *Liver Int.* 2010;30(8):1161-1168. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02301.x.
49. Miyazawa M, Torii T, Toshimitsu Y, et al. Alpha-fetoprotein-producing clear cell carcinoma of the extrahepatic bile ducts. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(6):555-557. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825940>. Accessed April 20, 2015.
50. Liu X, Cheng Y, Sheng W, et al. Clinicopathologic features and prognostic factors in alpha-fetoprotein-producing gastric cancers: analysis of 104 cases. *J Surg Oncol.* 2010;102(3):249-255. doi:10.1002/jso.21624.
51. Shiraki K, Takase K, Tameda Y, Hamada M, Kosaka Y, Nakano T. A clinical study of lectin-reactive alpha-fetoprotein as an early indicator of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients. *Hepatology.* 1995;22(3):802-807. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544756>. Accessed April 20, 2015.
52. Carcinoma H. Multicenter prospective analysis of newly diagnosed hepatocellular carcinoma with respect to the percentage of *Lens culinaris*. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001;16(September):1378-1383.
53. Lok AS, Sterling RK, Everhart JE, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2010;138(2):493-502. doi:10.1053/j.gastro.2009.10.031.
54. Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, et al. AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC. *J Gastroenterol.* 2010;45(12):1272-1282. doi:10.1007/s00535-010-0278-5.
55. Witjes CDM, Van Aalten SM, Steyerberg EW, et al. Recently introduced biomarkers for screening of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Hepatol Int.* 2013;7:59-64. doi:10.1007/s12072-012-9374-3.
56. Zhou Y, Yin X, Ying J, Zhang B. Golgi protein 73 versus alpha-fetoprotein as a biomarker for hepatocellular carcinoma: a diagnostic meta-analysis. *BMC Cancer.* 2012;12(1):17. doi:10.1186/1471-2407-12-17.
57. Yang J, Li J, Dai W, et al. Golgi protein 73 as a biomarker for hepatocellular carcinoma: A diagnostic meta-analysis. *Exp Ther Med.* 2015:1413-1420. doi:10.3892/etm.2015.2231.
58. Menezes ME, Devine DJ, Shevde LA, Samant RS. Dickkopf1: a tumor suppressor or metastasis promoter? *Int J Cancer.* 2012;130(7):1477-1483. doi:10.1002/ijc.26449.

59. Hall CL, Daignault SD, Shah RB, Pienta KJ, Keller ET. Dickkopf-1 expression increases early in prostate cancer development and decreases during progression from primary tumor to metastasis. *Prostate*. 2008;68(13):1396-1404. doi:10.1002/pros.20805.
60. Kuphal S, Lodermeier S, Bataille F, Schuierer M, Hoang BH, Bosserhoff AK. Expression of Dickkopf genes is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene*. 2006;25(36):5027-5036. doi:10.1038/sj.onc.1209508.
61. Forner A, Bruix J. Biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Lancet Oncol*. 2012;13(8):750-751. doi:10.1016/S1470-2045(12)70271-1.
62. Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem*. 2002;132(3):359-371. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204104>. Accessed May 6, 2015.
63. Mitchell DG, Bruix J, Sherman M, Sirlin CB. LI-RADS (Liver Imaging Reporting and Data System): Summary, discussion, consensus of the LI-RADS Management Working Group and future directions. *Hepatology*. 2014;1056-1065. doi:10.1002/hep.27304.
64. Ronot M, Vilgrain V. Hepatocellular carcinoma: Diagnostic criteria by imaging techniques. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28:795-812. doi:10.1016/j.bpg.2014.08.005.
65. Lencioni R, Cioni D, Della Pina C, Crocetti L, Bartolozzi C. Imaging diagnosis. *Semin Liver Dis*. 2005;25:162-170. doi:10.1055/s-2005-871196.
66. Yu JS, Lee JH, Chung JJ, Kim JH, Kim KW. Small hypervascular hepatocellular carcinoma: limited value of portal and delayed phases on dynamic magnetic resonance imaging. *Acta radiol*. 2008;49:735-743. doi:10.1080/02841850802120045.
67. Forner A, Vilana R, Ayuso C, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47:97-104. doi:10.1002/hep.21966.
68. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):47-55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10895431>. Accessed November 29, 2015.
69. Caturelli E, Solmi L, Anti M, et al. Ultrasound guided fine needle biopsy of early hepatocellular carcinoma complicating liver cirrhosis: a multicentre study. *Gut*. 2004;53:1356-1362. doi:10.1136/gut.2003.032359.

70. Kojiro M, Wanless IR, Alves V, et al. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. *Hepatology*. 2009;49:658-664. doi:10.1002/hep.22709.
71. Roncalli M, Terracciano L, Di Tommaso L, David E, Colombo M. Liver precancerous lesions and hepatocellular carcinoma: the histology report. *Dig Liver Dis*. 2011;43 Suppl 4:S361-S372. doi:10.1016/S1590-8658(11)60592-6.
72. Kobayashi M, Ikeda K, Hosaka T, et al. Dysplastic nodules frequently develop into hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis and cirrhosis. *Cancer*. 2006;106(3):636-647. doi:10.1002/cncr.21607.
73. Park YN. Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(6):704-715. doi:10.1043/2010-0524-RA.1.
74. Borzio M, Fargion S, Borzio F, et al. Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol*. 2003;39(2):208-214. doi:10.1016/S0168-8278(03)00190-9.
75. Maggioni M, Coggi G, Cassani B, et al. Molecular changes in hepatocellular dysplastic nodules on microdissected liver biopsies. *Hepatology*. 2000;32(5):942-946. doi:10.1053/jhep.2000.18425.
76. Sun M, Eshleman JR, Ferrell LD, et al. An early lesion in hepatic carcinogenesis: loss of heterozygosity in human cirrhotic livers and dysplastic nodules at the 1p36-p34 region. *Hepatology*. 2001;33(6):1415-1424. doi:10.1053/jhep.2001.24751.
77. Oh B-K, Jo Chae K, Park C, et al. Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. *J Hepatol*. 2003;39(5):786-792. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568262>. Accessed November 29, 2015.
78. Llovet JM, Chen Y, Wurmbach E, et al. A Molecular Signature to Discriminate Dysplastic Nodules From Early Hepatocellular Carcinoma in HCV Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1758-1767. doi:10.1053/j.gastro.2006.09.014.
79. Wurmbach E, Chen Y, Khitrov G, et al. Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007;45(4):938-947. doi:10.1002/hep.21622.
80. Nam SW, Park JY, Ramasamy A, et al. Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling. *Hepatology*. 2005;42:809-818. doi:10.1002/hep.20878.
81. Colombat M, Paradis V, Bieche I, et al. Quantitative RT-PCR in cirrhotic nodules reveals gene expression changes associated with liver carcinogenesis. *J Pathol*. 2003;201(2):260-267. doi:10.1002/path.1451.

82. Di Tommaso L, Franchi G, Young NP, et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology*. 2007;45(3):725-734. doi:10.1002/hep.21531.
83. Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2009;50(4):746-754. doi:10.1016/j.jhep.2008.11.014.
84. 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(10):1481-1487. doi:10.1136/gutjnl-2011-301862.
85. Carr BI, Kanke F, Wise M, Satomura S. Clinical evaluation of lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular carcinoma in the United States. *Dig Dis Sci*. 2007;52(3):776-782. doi:10.1007/s10620-006-9541-2.
86. Miyaaki H, Nakashima O, Kurogi M, Eguchi K, Kojiro M. Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence II are potential indicators of a poor prognosis: a histopathological study of surgically resected hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2007;42(12):962-968. doi:10.1007/s00535-007-2117-x.
87. Roskams T. Anatomic Pathology of Hepatocellular Carcinoma: Impact on Prognosis and Response to Therapy. *Clin Liver Dis*. 2011;15(2):245-259. doi:10.1016/j.cld.2011.03.004.
88. Durnez A, Verslype C, Nevens F, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology*. 2006;49(2):138-151. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02468.x.
89. Yujin Hoshida, M.D., Ph.D., Augusto Villanueva, M.D., Masahiro Kobayashi, M.D., Judit Peix, A.S., Derek Y. Chiang, Ph.D., Amy Camargo, B.A., Supriya Gupta, B.S., Jamie Moore, M.A., B.S., Matthew J. Wrobel, M.S., Jim Lerner, B.S., Michael Reich, B.S., Jenn MD. Gene Expression in Fixed Tissues and Outcome in Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359(19):1995-2004. doi:10.1056/NEJMoa0804525.Gene.
90. Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire. *J Hepatol*. 1999;31(1):133-141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10424293>. Accessed September 21, 2015.
91. Talian LII, Clip PR. Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *The Cancer of*

- the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. *Hepatology*. 2000;31(39):840-845. doi:10.1053/he.2000.5628.
92. Llovet JM, Bru C BJ. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*. 1999;19(3):329-338.
 93. Kitai S, Kudo M, Minami Y, et al. Validation of a New Prognostic Staging System for Hepatocellular Carcinoma: A Comparison of the Biomarker-Combined Japan Integrated Staging Score, the Conventional Japan Integrated Staging Score and the BALAD Score. *Oncology*. 2008;75(1):83-90. doi:10.1159/000173428.
 94. Tang AMY, Sc M, Zee B, et al. Construction of the 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. 2002:1760-1769. doi:10.1002/cncr.10384.
 95. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2012;379(9822):1245-1255. doi:10.1016/S0140-6736(11)61347-0.
 96. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*. 1973;60(8):646-649. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4541913>. Accessed May 11, 2015.
 97. Ma C, Bandukwala S, Burman D, et al. Interconversion of three measures of performance status: An empirical analysis. *Eur J Cancer*. 2010;46(18):3175-3183. doi:10.1016/j.ejca.2010.06.126.
 98. Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol*. 2008;48:20-37. doi:10.1016/j.jhep.2008.01.022.
 99. Kudo M. Review of 4th Single Topic Conference on HCC. Hepatocellular carcinoma: International consensus and controversies. *Hepatol Res*. 2007;37 Suppl 2:S83-S87. doi:10.1111/j.1872-034X.2007.00167.x.
 100. Varela M, Reig M, Mata MD La, et al. Tratamiento del carcinoma hepatocelular en España. Análisis de 705 casos en 62 centros. *Med Clin (Barc)*. 2010;134(13):569-576. doi:10.1016/j.medcli.2009.10.042.
 101. M.L. González-Diéguez, A. Mancebo, V. Cadahía, R. Pérez, M. Varela, C. Navascues MR. P570 Analysis of the adherence to a hepatocellular carcinoma (HCC) surveillance programme based on biannual controls. In: *Journal of Hepatology*. Vol 60.; 2014:Supplement, S259.
 102. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology*. 1999;30:1434-1440. doi:10.1002/hep.510300629.

103. Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, et al. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. 2003;38:200-207. doi:10.1016/S.
104. Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, et al. Early hepatocellular carcinoma as an entity with a high rate of surgical cure. *Hepatology*. 1998;28(5):1241-1246. doi:10.1002/hep.510280511.
105. Roayaie S, Obeidat K, Sposito C, et al. Resection of hepatocellular cancer ≤ 2 cm: results from two Western centers. *Hepatology*. 2013;57(4):1426-1435. doi:10.1002/hep.25832.
106. Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, et al. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. *Hepatology*. 2000;32(6):1224-1229. doi:10.1053/jhep.2000.20456.
107. Bruix J, Castells A, Bosch J, et al. Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure. *Gastroenterology*. 1996;111:1018-1022. doi:S0016-5085(96)70070-7 [pii].
108. Berzigotti A, Reig M, Abraldes JG, Bosch J, Bruix J. Portal hypertension and the outcome of surgery for hepatocellular carcinoma in compensated cirrhosis: A systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2015;61:526-536. doi:10.1002/hep.27431.
109. Sala M, Fuster J, Llovet JM, et al. High pathological risk of recurrence after surgical resection for hepatocellular carcinoma: an indication for salvage liver transplantation. *Liver Transpl*. 2004;10(10):1294-1300. doi:10.1002/lt.20202.
110. Fuks D, Dokmak S, Paradis V, Diouf M, Durand F, Belghiti J. Benefit of initial resection of hepatocellular carcinoma followed by transplantation in case of recurrence: an intention-to-treat analysis. *Hepatology*. 2012;55(1):132-140. doi:10.1002/hep.24680.
111. Cho YK, Kim JK, Kim WT, Chung JW. Hepatic resection versus radiofrequency ablation for very early stage hepatocellular carcinoma: a Markov model analysis. *Hepatology*. 2010;51(4):1284-1290. doi:10.1002/hep.23466.
112. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996;334(11):693-699. doi:10.1056/NEJM199603143341104.
113. Clavien P-A, Lesurtel M, Bossuyt PMM, Gores GJ, Langer B, Perrier A. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol*. 2012;13(1):e11-e22. doi:10.1016/S1470-2045(11)70175-9.

114. Lencioni R a, Allgaier H-P, Cioni D, et al. Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology*. 2003;228(1):235-240. doi:10.1148/radiol.2281020718.
115. Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma $\leq 4\text{ cm}$. *Gastroenterology*. 2004;127:1714-1723. doi:10.1053/j.gastro.2004.09.003.
116. Shiina S, Teratani T, Obi S, et al. A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2005;129(1):122-130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16012942>. Accessed March 29, 2015.
117. Shiina S, Tateishi R, Arano T, et al. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(4):569-577; quiz 578. doi:10.1038/ajg.2011.425.
118. Kim Y-S, Lim HK, Rhim H, Lee MW. Ablation of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(5):897-908. doi:10.1016/j.bpg.2014.08.011.
119. Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S179-S188. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15508083>. Accessed November 29, 2015.
120. Lammer J, Malagari K, Vogl T, et al. Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2010;33(1):41-52. doi:10.1007/s00270-009-9711-7.
121. Varela M, Real MI, Burrel M, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol*. 2007;46(3):474-481. doi:10.1016/j.jhep.2006.10.020.
122. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. 2003;37(2):429-442. doi:10.1053/jhep.2003.50047.
123. Burrel M, Reig M, Forner A, et al. Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolisation (TACE) using Drug Eluting Beads. Implications for clinical practice and trial design. *J Hepatol*. 2012;56(6):1330-1335. doi:10.1016/j.jhep.2012.01.008.
124. Llovet JM, Bustamante J, Castells A, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology*. 1999;29(1):62-67. doi:10.1002/hep.510290145.

125. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359(4):378-390. doi:10.1056/NEJMoa0708857.
126. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF / MEK / ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the Pr. *Cancer Res*. 2004;64:7099-7109. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1443.
127. Mazzaferro V, Sposito C, Bhoori S, et al. Yttrium-90 radioembolization for intermediate-advanced hepatocellular carcinoma: A phase 2 study. *Hepatology*. 2013;57:1826-1837. doi:10.1002/hep.26014.
128. Sangro B. Chemoembolization and radioembolization. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(5):909-919. doi:10.1016/j.bpg.2014.08.009.
129. Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 2005;25(2):181-200. doi:10.1055/s-2005-871198.
130. Lencioni R, Llovet J. Modified RECIST (mRECIST) Assessment for Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis*. 2010;30(01):052-060. doi:10.1055/s-0030-1247132.
131. Therasse P. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(3):205-216. <http://jnci.oxfordjournals.org/content/92/3/205.short>.
132. Bogaerts J, Ford R, Sargent D, et al. Individual patient data analysis to assess modifications to the RECIST criteria. *Eur J Cancer*. 2009;45(2):248-260. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.027.
133. Reig M, Darnell A, Forner A, Rimola J, Ayuso C, Bruix J. Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma: The Issue of Treatment Stage Migration and Registration of Progression Using the BCLC-Refined RECIST. *Semin Liver Dis*. 2014;34(04):444-455. doi:10.1055/s-0034-1394143.
134. Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, et al. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol*. 2007;25(13):1753-1759. doi:10.1200/JCO.2006.07.3049.
135. Kudo M, Kubo S, Takayasu K, et al. Response Evaluation Criteria in Cancer of the Liver (RECICL) proposed by the Liver Cancer Study Group of Japan (2009 Revised Version). *Hepatol Res*. 2010;40(7):686-692. doi:10.1111/j.1872-034X.2010.00674.x.

136. Kudo M, Ueshima K, Kubo S, et al. Response Evaluation Criteria in Cancer of the Liver (RECICL) (2015 Revised version). *Hepatol Res.* 2015. doi:10.1111/hepr.12542.
137. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(14):1054-1061. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459866>.
138. Jensen ON. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol.* 2004;8:33-41. doi:10.1016/j.cbpa.2003.12.009.
139. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(February):860-921. doi:10.1038/35057062.
140. Jones Pa and Baylin SB. Epigenomic of cancer. *Cell.* 2007;128:683-692.
141. Abbott a. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature.* 1999;402:715-720. doi:10.1038/45350.
142. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.* 1999;19(3):1720-1730.
143. Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl(march):311-323. doi:10.1038/ng1106.
144. Hwee Ton Tan, Yie Hou Lee MCC. Cancer proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 2012;31(5):583-605. doi:10.1002/mas.20356. Epub 2012 Mar 15.
145. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1:845-867. doi:10.1074/mcp.R200007-MCP200.
146. Ralph Schiess, Bernd Wollscheid RA. Targeted Proteomic Strategy for Clinical Biomarker Discovery. *Mol Oncol.* 2009;3(1):33-44. doi:10.1016/j.molonc.2008.12.001.
147. Millionsi R, Tolin S, Puricelli L, et al. High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: Comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity. *PLoS One.* 2011;6(5). doi:10.1371/journal.pone.0019603.
148. Rifai N, Gillette M a, Carr S a. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol.* 2006;24(8):971-983. doi:10.1038/nbt1235.
149. Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.*

- 2000;21(6):1037-1053. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1037::AID-ELPS1037>3.0.CO;2-V.
150. Wagner Y, Sickmann A, Meyer HE, Daum G. Multidimensional nano-HPLC for analysis of protein complexes. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003;14(03):1003-1011. doi:10.1016/S1044-0305(03)00399-4.
 151. Pandey a, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 2000;405(June):837-846. doi:10.1038/35015709.
 152. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* 2005;382:669-678. doi:10.1007/s00216-005-3126-3.
 153. Mann M, Kelleher NL. Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(47):18132-18138. doi:10.1073/pnas.0800788105.
 154. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988;60(20):2299-2301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3239801>. Accessed February 7, 2015.
 155. Tang N, Tornatore P, Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev.* 23(1):34-44. doi:10.1002/mas.10066.
 156. Ruedi Aebersold and David. Mass spectrometry in proteomics. *Chem rev.* 2001;101(2):269-295.
 157. Patterson SD, Aebersold R. Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis.* 1995;16(10):1791-1814. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8586048>. Accessed October 18, 2015.
 158. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003;422(March):198-207. doi:10.1038/nature01511.
 159. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics.* 2007;7(3):340-350. doi:10.1002/pmic.200600422.
 160. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1(5):376-386. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118079>. Accessed January 6, 2015.
 161. Zhang B, VerBerkmoes NC, Langston M a., Uberbacher E, Hettich RL, Samatova NF. Detecting differential and correlated protein expression in label-free shotgun proteomics. *J Proteome Res.* 2006;5:2909-2918. doi:10.1021/pr0600273.

162. Codina M, Estanyol JM, Fidalgo MJ, Ballescà JL, Oliva R. Advances in sperm proteomics: best-practise methodology and clinical potential. *Expert Rev Proteomics*. 2015;12(3):255-277. doi:10.1586/14789450.2015.1040769.
163. Wolters DA, Washburn MP, Yates JR. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2001;73(23):5683-5690. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11774908>. Accessed October 18, 2015.
164. Spahr CS, Susin SA, Bures EJ, et al. IPPC '99. Proceedings of the 1st Pacific Rim 2-DE Meeting. Tokyo, Japan, August 29-September 1, 1999. *Electrophoresis*. 2000;21(9):1635-1917. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000501)21:9<1635::AID-ELPS1635>3.0.CO;2-1.
165. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1994;5(11):976-989. doi:10.1016/1044-0305(94)80016-2.
166. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999;20(18):3551-3567. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2.
167. Ma B, Zhang K, Hendrie C, et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(20):2337-2342. doi:10.1002/rcm.1196.
168. Kadowaki M, Sangai T, Nagashima T, et al. Identification of vitronectin as a novel serum marker for early breast cancer detection using a new proteomic approach. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(7):1105-1115. doi:10.1007/s00432-010-0974-9.
169. Cheng Y, Liu C, Zhang N, Wang S, Zhang Z. Proteomics Analysis for Finding Serum Markers of Ovarian Cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-9. doi:10.1155/2014/179040.
170. Park JY, Kim S-A, Chung JW, et al. Proteomic analysis of pancreatic juice for the identification of biomarkers of pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(8):1229-1238. doi:10.1007/s00432-011-0992-2.
171. Lee MJ, Na K, Jeong S-K, et al. Identification of Human Complement Factor B as a Novel Biomarker Candidate for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Proteome Res*. 2014. doi:10.1021/pr5002719.
172. Ayumu Taguchi¹, Katerina Politi², 8, Sharon J. Pitteri¹, William W. Lockwood², 9 VM, Faça¹, Karen Kelly-Spratt¹, Chee-Hong Wong¹, Qing Zhang¹, Alice Chin¹ K-SP, Gary Goodman¹, Adi F. Gazdar⁴, Julien Sage³, Daniela M. Dinulescu⁵ RK, Ronald A. DePinho⁷, Christopher J. Kemp¹, Harold E. Varmus², 9 and SMH. Lung

- Cancer Signatures in Plasma Based on Proteome Profiling of Mouse Tumor Models. *Cancer Cell*. 2011;20(3):289-299. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.07.002.Identification.
173. Shi Y, Deng X, Zhan Q, et al. A prospective proteomic-based study for identifying potential biomarkers for the diagnosis of cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2013;17(9):1584-1591. doi:10.1007/s11605-013-2182-9.
174. Wen C-L, Chen K-Y, Chen C-T, Chuang J-G, Yang P-C, Chow L-P. Development of an AlphaLISA assay to quantify serum core-fucosylated E-cadherin as a metastatic lung adenocarcinoma biomarker. *J Proteomics*. 2012;75(13):3963-3976. doi:10.1016/j.jprot.2012.05.015.
175. Gregorc V, Novello S, Lazzari C, et al. Predictive value of a proteomic signature in patients with non-small-cell lung cancer treated with second-line erlotinib or chemotherapy (PROSE): A biomarker-stratified, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(7):713-721. doi:10.1016/S1470-2045(14)70162-7.
176. Jones RP, Sutton P, Greensmith RMD, et al. Hepatic activation of irinotecan predicts tumour response in patients with colorectal liver metastases treated with DEBIRI: Exploratory findings from a phase II study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;72(2):359-368. doi:10.1007/s00280-013-2199-5.
177. Ferrín G, Rodríguez-Perálvarez M, Aguilar-Melero P, et al. Plasma protein biomarkers of hepatocellular carcinoma in HCV-infected alcoholic patients with cirrhosis. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118527. doi:10.1371/journal.pone.0118527.
178. Ferrín G, Ranchal I, Llamaza C, et al. Identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma in plasma of HCV-infected cirrhotic patients by 2-D DIGE. *Liver Int*. 2014;34(3):438-446. doi:10.1111/liv.12277.
179. Lee I-N, Chen C-H, Sheu J-C, et al. Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 4(6):2062-2069. doi:10.1021/pr0502018.
180. Sun W, Xing B, Sun Y, et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(10):1798-1808. doi:10.1074/mcp.M600449-MCP200.
181. Megger D a, Bracht T, Kohl M, et al. Proteomic differences between hepatocellular carcinoma and nontumorous liver tissue investigated by a combined gel-based and label-free quantitative proteomics study. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(7):2006-2020. doi:10.1074/mcp.M113.028027.

182. Yi X, Luk JM, Lee NP, et al. Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(2):315-325. doi:10.1074/mcp.M700116-MCP200.
183. Xu B, Cai Z, Zeng Y, et al. -Methylacyl-CoA racemase (AMACR) serves as a prognostic biomarker for the early recurrence/metastasis of HCC. *J Clin Pathol*. 2014;67(11):974-979. doi:10.1136/jclinpath-2014-202378.
184. Tan GS, Lim KH, Tan HT, et al. Novel Proteomic Biomarker Panel for Prediction of Aggressive Metastatic Hepatocellular Carcinoma Relapse in Surgically Resectable Patients. *J Proteome Res*. 2014. doi:10.1021/pr500229n.
185. Liu Y, Wang X, Li S, et al. The role of von Willebrand factor as a biomarker of tumor development in hepatitis B virus-associated human hepatocellular carcinoma: a quantitative proteomic based study. *J Proteomics*. 2014;106:99-112. doi:10.1016/j.jprot.2014.04.021.
186. Fye HKS, Wright-Drakesmith C, Kramer HB, et al. Protein Profiling in Hepatocellular Carcinoma by Label-Free Quantitative Proteomics in Two West African Populations. *PLoS One*. 2013;8(7). doi:10.1371/journal.pone.0068381.
187. Medico E, Gentile A, Lo Celso C, et al. Osteopontin is an autocrine mediator of hepatocyte growth factor-induced invasive growth. *Cancer Res*. 2001;61(15):5861-5868. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479227>. Accessed May 4, 2015.
188. Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, Chambers AF. Role of the metastasis-promoting protein osteopontin in the tumour microenvironment. *J Cell Mol Med*. 2010;14(8):2037-2044. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01115.x.
189. Shang S, Plymoth A, Ge S, et al. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012;55:483-490. doi:10.1002/hep.24703.
190. Kim J, Ki SS, Lee SD, et al. Elevated plasma osteopontin levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(9):2051-2059. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00679.x.
191. Abu El Makarem M a., Abdel-Aleem A, Ali A, et al. Diagnostic significance of plasma osteopontin in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol*. 2011;10(3):296-305. doi:947231 [pii].
192. Zhang H, Ye QH, Ren N, et al. The prognostic significance of preoperative plasma levels of osteopontin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006;132:709-717. doi:10.1007/s00432-006-0119-3.
193. Pan HW, Ou YH, Peng SY, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically

- resected hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2003;98:119-127. doi:10.1002/cncr.11487.
194. Wan H-G, Xu H, Gu Y-M, Wang H, Xu W, Zu M-H. Comparison osteopontin vs AFP for the diagnosis of HCC: A meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2014;38(6):706-714. doi:10.1016/j.clinre.2014.06.008.
 195. Fornis X, Ampurdanès S, Llovet JM, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1):986-992. doi:10.1053/jhep.2002.36128.
 196. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology*. 2007;46(1):32-36. doi:10.1002/hep.21669.
 197. Wai C-T, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518-526. doi:10.1053/jhep.2003.50346.
 198. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, et al. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(10):1487-1502. doi:10.1074/mcp.M500084-MCP200.
 199. Fu X, Fu X, Gharib S a, et al. Spectral index for assessment of differential protein expression in shotgun proteomics. *J Proteome Res*. 2008;7:845-854. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list_uids=18198819.
 200. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24(2):289-293. doi:10.1002/hep.510240201.
 201. Pan J, Chen H-Q, Sun Y-H, Zhang J-H, Luo X-Y. Comparative proteomic analysis of non-small-cell lung cancer and normal controls using serum label-free quantitative shotgun technology. *Lung*. 2008;186(4):255-261. doi:10.1007/s00408-008-9093-7.
 202. Tsai T-H, Song E, Zhu R, et al. LC-MS/MS-based serum proteomics for identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics*. 2015;15(13):2369-2381. doi:10.1002/pmic.201400364.
 203. Morrissey B, O'Shea C, Armstrong J, et al. Development of a label-free LC-MS/MS strategy to approach the identification of candidate protein biomarkers of disease recurrence in prostate cancer patients in a clinical trial of combined hormone and radiation therapy. *Proteomics Clin Appl*. 2013;7(5-6):316-326. doi:10.1002/prca.201300004.

204. Kimura A, Sogawa K, Satoh M, et al. The Application of a Three-Step Serum Proteome Analysis for the Discovery and Identification of Novel Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Int J Proteomics*. 2012;2012:1-12. doi:10.1155/2012/623190.
205. Hattori N, Oda S, Sadahiro T, et al. Ykl-40 Identified By Proteomic Analysis As a Biomarker of Sepsis. *Shock*. 2009;32(4):393-400. doi:10.1097/SHK.0b013e31819e2c0c.
206. Sogawa K, Kodera Y, Satoh M, et al. Increased serum levels of pigment epithelium-derived factor by excessive alcohol consumption-detection and identification by a three-step serum proteome analysis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35(2):211-217. doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01336.x.
207. Kim PY, Tan O, Diakiw SM, et al. Identification of plasma Complement C3 as a potential biomarker for neuroblastoma using a quantitative proteomic approach. *J Proteomics*. 2014;96:1-12. doi:10.1016/j.jprot.2013.10.032.
208. Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, et al. Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology*. 2007;45(4):948-956. doi:10.1002/hep.21598.
209. Mustafa MG, Petersen JR, Ju H, et al. Biomarker discovery for early detection of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-infected patients. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(12):3640-3652. doi:10.1074/mcp.M113.031252.
210. Huang C, Wang Y, Liu S, et al. Quantitative Proteomic Analysis Identified Paraoxonase 1 as a Novel Serum Biomarker for Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res*. 2013;12(4):1838-1846. doi:10.1021/pr3011815.
211. Morra R, Munteanu M, Bedossa P, et al. Diagnostic value of serum protein profiling by SELDI-TOF ProteinChip compared with a biochemical marker, FibroTest, for the diagnosis of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(6):847-858. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03427.x.
212. White IR, Patel K, Symonds WT, et al. Serum proteomic analysis focused on fibrosis in patients with hepatitis C virus infection. *J Transl Med*. 2007;5:33. doi:10.1186/1479-5876-5-33.
213. Bell LN, Theodorakis JL, Vuppalanchi R, et al. Serum proteomics and biomarker discovery across the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(1):111-120. doi:10.1002/hep.23271.
214. Yang L, Rudser KD, Higgins L, et al. Novel biomarker candidates to predict hepatic fibrosis in hepatitis C identified by serum proteomics. *Dig Dis Sci*. 2011;56(11):3305-3315. doi:10.1007/s10620-011-1745-4.

215. Liaskou E, Wilson D V, Oo YH. Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:949157. doi:10.1155/2012/949157.
216. Dirchwolf M, Podhorzer A, Marino M, et al. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. *Cytokine*. 2016;77:14-25. doi:10.1016/j.cyto.2015.10.006.
217. Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M, Alcalá U De, Salud I De, Ii C. Cirrhosis-associated immune dysfunction : Distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol*. 2014;61:1385-1396. doi:10.1016/j.jhep.2014.08.010.
218. Dirchwolf M. Role of systemic inflammation in cirrhosis: From pathogenesis to prognosis. *World J Hepatol*. 2015;7(16):1974. doi:10.4254/wjh.v7.i16.1974.
219. Toniatti C, Arcone R, Majello B, Ganter U, Arpaia G, Ciliberto G. Regulation of the human C-reactive protein gene, a major marker of inflammation and cancer. *Mol Biol Med*. 1990;7(3):199-212. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2170808>. Accessed December 1, 2015.
220. Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? *Ann N Y Acad Sci*. 2002;962:275-295. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076981>. Accessed December 2, 2015.
221. Spann NJ, Glass CK. Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat Immunol*. 2013;14(9):893-900. doi:10.1038/ni.2681.
222. Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*. 2008;454(7203):470-477. doi:10.1038/nature07202.
223. Russo V. Metabolism, LXR/LXR ligands, and tumor immune escape. *J Leukoc Biol*. 2011;90(4):673-679. doi:10.1189/jlb.0411198.
224. Lin C-Y, Gustafsson J-Å. Targeting liver X receptors in cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(4):216-224. doi:10.1038/nrc3912.
225. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.
226. Traversari C, Sozzani S, Steffensen KR, Russo V. LXR-dependent and -independent effects of oxysterols on immunity and tumor growth. *Eur J Immunol*. 2014;44(7):1896-1903. doi:10.1002/eji.201344292.
227. Dufour J, Viennois E, De Bousac H, Baron S, Lobaccaro J-M. Oxysterol receptors, AKT and prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(6):724-728. doi:10.1016/j.coph.2012.06.012.

228. Chuu C-P, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J Biomed Sci.* 2007;14(5):543-553. doi:10.1007/s11373-007-9160-8.
229. Zhang E-B, Han L, Yin D-D, Kong R, De W, Chen J. c-Myc-induced, long, noncoding H19 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with gastric cancer. *Med Oncol.* 2014;31(5):914. doi:10.1007/s12032-014-0914-7.
230. He X, Tan X, Wang X, et al. C-Myc-activated long noncoding RNA CCAT1 promotes colon cancer cell proliferation and invasion. *Tumour Biol.* 2014;35(12):12181-12188. doi:10.1007/s13277-014-2526-4.
231. Mao X-Y, Fan C-F, Wei J, et al. Increased N-myc downstream-regulated gene 1 expression is associated with breast atypia-to-carcinoma progression. *Tumour Biol.* 2011;32(6):1271-1276. doi:10.1007/s13277-011-0232-z.
232. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, et al. Cancers. *Genetics.* 2010;463(7283):899-905. doi:10.1038/nature08822.The.
233. Shen L, Fang J, Qiu D, et al. Correlation between DNA methylation and pathological changes in human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 1998;45(23):1753-1759. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9840141>. Accessed November 17, 2015.
234. Wang Y, Wu M-C, Sham JST, Zhang W, Wu W-Q, Guan X-Y. Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2002;95(11):2346-2352. doi:10.1002/cncr.10963.
235. Hoshida Y, Toffanin S. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis.* 2010;30(1):35-51. doi:10.1055/s-0030-1247131.Molecular.
236. Mise M, Arii S, Higashitani H, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor. *Hepatology.* 1996;23(3):455-464. doi:10.1053/jhep.1996.v23.pm0008617424.
237. Miura H, Miyazaki T, Kuroda M, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 1997;27(5):854-861. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382973>. Accessed November 17, 2015.
238. Poon RTP, Ho JWY, Tong CSW, Lau C, Ng IOL, Fan S-T. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg.* 2004;91(10):1354-1360. doi:10.1002/bjs.4594.
239. Li XM, Tang ZY, Zhou G, Lui YK, Ye SL. Significance of vascular endothelial growth factor mRNA expression in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma.

- J Exp Clin Cancer Res.* 1998;17(1):13-17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9646228>. Accessed December 2, 2015.
240. Knox JJ, Qin R, Strosberg JR, et al. A phase II trial of bevacizumab plus temsirolimus in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs.* 2015;33(1):241-246. doi:10.1007/s10637-014-0169-3.
241. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, et al. Pivotal Role of mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2008;135(6):1972-1983.e11. doi:10.1053/j.gastro.2008.08.008.
242. Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, et al. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2):701-706. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19577&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 17, 2015.
243. Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1997;25(4):862-866. doi:10.1002/hep.510250413.
244. Salvi A, Arici B, Portolani N, Giulini SM, De Petro G, Barlati S. In vitro c-met inhibition by antisense RNA and plasmid-based RNAi down-modulates migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2007;31(2):451-460. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17611703>. Accessed November 17, 2015.
245. Wang W, Hayashi Y, Ninomiya T, et al. Expression of HNF-1 alpha and HNF-1 beta in various histological differentiations of hepatocellular carcinoma. *J Pathol.* 1998;184(3):272-278. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199803)184:3<272::AID-PATH4>3.0.CO;2-K.
246. Shim JH, Kang HJ, Han S, et al. Prognostic value of hepatocyte nuclear factors 4 α and 1 α identified by tissue microarray in resectable hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29(3):524-532. doi:10.1111/jgh.12371.
247. Zhang W, Kim R, Quintini C, et al. Prognostic role of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation. *Liver Transpl.* 2015;21(1):101-111. doi:10.1002/lt.24013.