



**UNIVERSIDAD  
AUSTRAL**

**Facultad de Ciencias Biomédicas**

**“INCORPORACIÓN DEL BIOMARCADOR  
ALFA-FETOPROTEÍNA COMO CRITERIO DE SELECCIÓN PARA TRASPLANTE  
HEPÁTICO POR HEPATOCARCINOMA”.**

---

Trabajo de Tesis Doctoral presentada para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biomédicas

Federico Piñero

Año 2020

**Universidad Austral**  
**Facultad de Ciencias Biomédicas.**

---

**Título de la Tesis:**

“Incorporación del biomarcador alfa-fetoproteína como criterio de selección para trasplante hepático por hepatocarcinoma”.

**Autor:**

Federico Piñero.

**Director de la Tesis Doctoral:**

Marcelo Silva, MD.

**Co-Director de la Tesis Doctoral:**

Prof. Dr Flair Carrilho, MD, PhD.

## ÍNDICE.

1. Resumen de la tesis.....	7
2. Agradecimientos.....	15
3. Producción científica.....	19
4. Abreviaturas.....	25
5. Introducción	
5.1. Marco teórico.....	27
5.2. La pregunta clínica de investigación.....	34
5.3. Objetivo primario.....	34
5.4. Objetivos secundarios.....	35
5.5. Hipótesis.....	35
5.6. Capítulos del desarrollo de la Tesis Doctoral.....	35
6. Capítulo 1. Evaluación de la incorporación de la alfa-feto proteína (AFP) en la selección de candidatos a trasplante hepático por hepatocarcinoma (HCC) en una cohorte multicéntrica de Argentina (punto de anclaje).	
6.1. Objetivos.....	36
6.2. Pacientes y métodos.....	36
6.3. Resultados.....	41
6.4. Figuras y Tablas.....	45
6.5. Discusión.....	48
6.6. Limitaciones.....	51
6.7. Conclusiones del capítulo.....	51
7. Capítulo 2. Evaluación de un modelo de selección compuesto, el modelo de selección Francés, en la primer cohorte multicéntrica Latinoamericana (2005-2011) y luego expandido a una segunda cohorte Latinoamericana (2012-2018).	
7.1. Objetivos.....	53

7.2. Pacientes y métodos.....	53
7.3. Resultados I: cohorte Latinoamericana 2005-2011.....	57
7.4. Figuras y tablas cohorte Latinoamericana 2005-2011.....	61
7.5. Cohorte expandida Latinoamericana 2005-2011 y 2012-2018.....	67
7.6. Resultados cohorte expandida .....	68
7.7. Figuras y tablas cohorte expandida.....	71
7.8. Discusión.....	76
7.9. Limitaciones.....	79
7.10. Conclusiones del capítulo.....	79
8. Capítulo 3. Evaluación de la incorporación de la AFP y del modelo de selección Francés en la asociación con progresión tumoral en lista de espera para trasplante hepático en una cohorte multicéntrica Latinoamericana (2012-2018).	
8.1. Breve introducción y objetivos.....	81
8.2. Pacientes y métodos.....	83
8.3. Resultados.....	88
8.4. Figuras y Tablas.....	92
8.5. El factor etiológico y otras co-intervenciones.....	99
8.6. Discusión.....	104
8.7. Limitaciones.....	106
8.8. Conclusiones del capítulo.....	107
9. Capítulo 4. Evaluar la optimización de selección de candidatos a estrategias de reducción de estadio o <i>downstaging</i> mediante la incorporación de AFP en un estudio multicéntrico transcontinental: cohortes Latinoamericana, Italiana, Belga y Francesa.	
9.1. Objetivos.....	108

9.2. Pacientes y métodos.....	108
9.3. Resultados.....	112
9.4. Figuras y Tablas.....	117
9.5. Discusión.....	124
9.6. Limitaciones.....	125
9.7. Conclusiones del capítulo.....	126
10. Capítulo 5. A) Comparación de dos modelos compuestos (utilizando como biomarcador de selección la AFP), el score Francés versus el Metroticket 2.0, y B) Evaluación de los modelos compuestos en pacientes con hepatocarcinoma biológicamente menos agresivo.	
10.1. Objetivos.....	127
10.2. Pacientes y métodos.....	127
10.3. Resultados.....	132
10.4. Figuras y Tablas.....	134
10.5. Discusión.....	142
10.6. Limitaciones.....	145
10.7. Conclusiones del capítulo.....	146
11. Capítulo final: Evaluación de un modelo de implementación, incorporando la AFP en la priorización de pacientes con HCC para la alocaión de órganos, mediante un análisis de decisiones clínicas y sanitarias. Propuesta a nivel Nacional.	
11.1. Objetivos.....	147
11.2. Pacientes y métodos.....	147
11.3. Resultados.....	151
11.4. Figuras y Tabla.....	155
11.5. Discusión.....	163

11.6. Limitaciones.....	166
11.7. Conclusiones del capítulo.....	166
12. Síntesis de observaciones y conclusiones finales.....	168
12. Referencias bibliográficas.....	174

## **1. RESUMEN DE LA TESIS.**

El trasplante hepático es una de las terapéuticas curativas en pacientes con hepatocarcinoma (HCC) o carcinoma hepatocelular. Sin embargo, la recurrencia post trasplante hepático es un evento temible, con pobre supervivencia desde el diagnóstico y escasas posibilidades terapéuticas curativas. Es por esto que es de suma importancia la criteriosa selección de candidatos a trasplante por HCC, teniendo implicancias individuales y de justicia y equidad poblacional en la alocaación de órganos. En los años '90 se han propuesto los criterios de Milán para la selección de candidatos ideales para trasplante con HCC de acuerdo a límites tumorales en cuanto a número y diámetro pre trasplante. Sin embargo, la selección de candidatos a trasplante pura y exclusivamente según límites tumorales radiológicos se encuentra en revisión. Una nueva propuesta de "criterios de optimización" con el uso de biomarcadores ha ganado camino en este proceso, con el fin de equilibrar o dar mayor justicia en la priorización de la alocaación de órganos

Nuestro objetivo primario fue evaluar la incorporación del biomarcador alfa-feto proteína en suero (AFP) como criterio de selección para trasplante hepático por HCC. El proyecto de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en distintas etapas que evalúan el uso de AFP en distintos escenarios. Como objetivos secundarios nos propusimos: 1. Validar un modelo de optimización que incorpora la AFP como criterio de selección, el modelo de selección Francés. 2. Explorar la utilidad de la AFP en una población con un perfil de HCC biológicamente menos agresivo. 3. Evaluar la incorporación de la AFP y los modelos de selección en la progresión tumoral en lista de espera para trasplante hepático. 4. Comparar el score Francés versus otro modelo de selección compuesto: el Metroticket 2.0. 5. Evaluar la incorporación de AFP en la optimización de selección de candidatos

a estrategias de reducción de estadio o downstaging. 6. Proponer un modelo de implementación y priorización en la alocaación de órganos a nivel Nacional. Incluimos en las distintas etapas, cohortes multicéntricas, tanto a nivel nacional, Latino Americano como mundial. Se incluyeron pacientes adultos, con o sin cirrosis, trasplantados de hígado o enrolados en lista para trasplante con HCC. Se registraron datos demográficos, tumorales por imágenes y de AFP al enrolamiento en lista de espera, durante el tiempo en lista de espera, a última evaluación pre trasplante y tratamientos locorreionales realizados pre trasplante; esquemas de inmunosupresión, análisis de la anatomía patológica del explante y otras co-intervenciones relevantes post trasplante hepático. Realizamos distintos análisis, orientados a generar modelos pronósticos y de predicción de cada evento primario, utilizando modelos de regresión Cox y análisis de riesgos competitivos. También evaluamos la mejora neta de reclasificación mediante el NRI. Construimos modelos de regresión logística para ajustar variables basales no balanceadas y evaluar el efecto de otras co-intervenciones. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo guías para estudios observacionales (STROBE), siendo previamente aprobado por el Comité Institucional de Evaluación (CIE) de la Universidad Austral, por cada comité institucional y registrando parte del proyecto en [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03775863) (NCT03775863). En la *etapa 1* (n=124 pacientes de Argentina), evaluamos la asociación de la AFP y un corte específico para recurrencia. Construimos un modelo de selección y propusimos por primera vez a nivel mundial la selección de candidatos utilizando el modelo de "Hasta 7" (HR 5.6; P=0.001) y un valor de AFP menor 100 ng/ml (HR 6.3; P=0.001), identificando dos grupos de pacientes con bajo y alto riesgo de recurrencia (sensibilidad de 62% y especificidad de 82%). En la *etapa 2* (n=1085 pacientes de Latino América), confirmamos el efecto independiente



de la AFP en su asociación con el riesgo de recurrencia post trasplante y la utilidad de su incorporación en los modelos de selección. Observamos que el modelo de selección Francés o de AFP discriminó mejor el riesgo de recurrencia comparándose con los criterios de Milán, excepto en pacientes con hepatitis B (HBV). En la etapa 3 (n=994 pacientes con HCC enrolados en lista de espera en Latino América) observamos que la AFP permite además identificar aquellos pacientes dentro de Milán con mayor riesgo de progresión tumoral en lista de trasplante. En la cuarta etapa (n=1711; cohorte de Latino América, Italia, Bélgica y Francia) evaluamos la utilidad de incorporar la AFP en pacientes que reciben tratamiento locorregional pre trasplante con la intención de reducción de estadio (downstaging), observando que la recurrencia post trasplante fue mayor en pacientes del grupo "sin límites" [SHR 6.1 (P<.0001)] y similar en el grupo UCSF-DS [SHR 1.93 (P=0.11)], respecto a aquellos que permanecieron dentro de Milán. En los pacientes dentro del protocolo UCSF-DS, valores de AFP  $\leq 20$  ng/ml se asociaron con menor recurrencia y mejor sobrevida post trasplante. En la quinta etapa (n=2444 pacientes trasplantados con HCC de Latino América, Italia, Bélgica y Francia), comparamos dos modelos compuestos, el modelo Francés o de AFP y el Metroticket 2.0. Ambos modelos presentaron adecuada calibración (predicción) y mayor discriminación de recurrencia, sobrevida HCC específica y sobrevida global que los criterios de Milán (P<.0001). El poder de discriminación para recurrencia post trasplante fue similar entre ambos modelos compuestos AFP [0.66 (IC 0.63-0,69)] y el Metroticket 2.0 [0.69 (IC 0.66-0.72)] (P>0.05) y la reclasificación neta (NRI) no fue significativa. Finalmente, en la última etapa de la Tesis, en una serie de reuniones en el Consejo Asesor ante el INCUCAI de la Sociedad Argentina de Trasplantes (SAT), expusimos estos

resultados en función de un análisis de decisiones sanitarias, proponiendo el Doble Criterio de Elegibilidad (DCE) para ser implementado en Argentina.

En conclusión, la selección de candidatos a trasplante pura y exclusivamente según número y diámetro tumoral es ineficiente. El uso de biomarcadores ha ganado camino en el proceso de mejora en la selección de candidatos. La AFP tanto en variable continua como variable categórica o dicotómica se asocia con recurrencia de manera independiente del tamaño y número de nódulos pre trasplante. Además, se asocia con factores de riesgo hallados en el explante como desdiferenciación nuclear o invasión microvascular. Los modelos de selección compuestos, tanto el modelo Francés como el Metroticket 2.0, son superiores a los criterios de Milán, y permiten optimizar el proceso de selección de pacientes candidatos a trasplante hepático por HCC. Sin embargo, resaltamos que la categorización o predicción del riesgo de recurrencia a punto de partida de la construcción de modelos multivariados tiene en cuenta promedios poblacionales y no individuales. Para el cálculo de riesgo individual o inter-individual, debieramos considerar la variabilidad individual, que estos modelos no toman en cuenta. Es probable que existan otros biomarcadores o perfil biológico del HCC, independientemente de la AFP, sobre todo en la población HBV+. Es por esto que existe la necesidad trasplantológica de crear modelos de predicción que contemplen variables pre y post trasplante hepático, integrando el riesgo en conjunto con variables o marcadores biológicos.

**Palabras clave:** Trasplante hepático; recurrencia; biomarcadores; selección.

## **1.2 RESUMEN O ABSTRACT EN INGLÉS.**

Liver transplantation is a curative therapy for patients with hepatocellular carcinoma (HCC) or primary liver cancer. However, recurrence after liver transplantation is a dramatic event, with few curative therapeutic possibilities and poor overall survival. This is why careful transplant selection of candidates with HCC is of utmost importance, underlying individual and population-based justice and equity in the context of organ allocation policies. In the 1990s, the Milan criteria were proposed for transplant eligibility according to tumor number and diameters. However, transplant selection purely and exclusively according to pre-transplant radiological tumor burden is under review. A new proposal of "optimization criteria" with the use of biomarkers has been recently proposed to achieve greater justice in organ allocation.

Our primary objective was to evaluate the incorporation of serum alpha-feto protein (AFP) as a liver transplant selection criterion for HCC. The Doctoral Thesis project has been carried out in different chapters evaluating the use of AFP in different settings. As secondary objectives, we proposed 1. To validate the AFP selection or the French selection model. 2. To explore the utility of AFP in a population without biologically aggressive HCC profile. 3. To evaluate the incorporation of AFP in selection models and its association with tumor progression during the waiting list period. 4. To compare the French model versus the Metroticket 2.0. 5. To evaluate the incorporation of AFP in the selection of best candidates for downstaging. 6. To propose a model to be implemented at the National level. We included in these steps, different multicenter cohorts of adult patients with HCC, with or without cirrhosis, who were liver transplanted or listed for liver transplantation from Argentina, Latin America and Europe. Exposure variables included demographic, pre transplant tumor burden and AFP

values, which were recorded at time of listing, during the waiting list, and at the last pre-transplant evaluation. Also, locoregional treatments performed before transplantation; immunosuppression schemes, explant pathology analysis and other relevant co-interventions. We carried out different statistical analyzes, aimed at generating prognostic and predictive models for HCC recurrence, overall survival or HCC tumor progression, using Cox regression models and competitive risk analysis. We also assessed the net reclassification index (NRI) when comparing pre transplant models. To further adjust unbalanced baseline variables and evaluate the effect of other co-interventions, we developed propensity score matching analysis through logistic regression models. All procedures were conducted following guidelines for observational studies (STROBE), being previously approved by the Institutional Evaluation Committee (CIE) of the Austral University, by each institutional committee and registering part of the project in [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT03775863).

In step 1 (n=124 patients from Argentina), we evaluated the association of AFP and a specific cutoff for HCC post-transplant recurrence. We developed a selection model and proposed it for the first time worldwide, using the “Up to 7” model (HR 5.6; P = 0.001) plus a cutoff value for AFP lower than 100 ng/ml (HR 6.3; P = 0.001 ). With this model, we identified two groups of patients with different risk of recurrence. In step 2 (n=1085 patients from Latin America), we confirmed the independent effect of AFP in its association with the risk of post-transplant recurrence and its incorporation in selection models. We observed that the French or AFP selection model better discriminated the risk of recurrence compared to Milan criteria, except in patients with hepatitis B (HBV). In step 3 (n=994 patients with HCC listed for liver transplantation in Latin America), we observed that AFP also allows us to identify patients within Milan at higher risk of

tumor progression during the waiting list. In the fourth step (n=1711; cohort from Latin America, Italy, Belgium and France) we evaluated the usefulness of incorporating AFP in patients receiving locoregional pre-transplant treatment with the intention of downstaging. Post-transplant HCC recurrence was higher in “all-comers” group [SHR 6.1 (P <.0001)] and similar in the UCSF-DS group [SHR 1.93 (P = 0.11)], compared to those remaining within Milan criteria. In patients within the UCSF-DS protocol, AFP values  $\leq 20$  ng/ml were associated with a lower risk of recurrence and better post-transplant survival. In the fifth step (n=2444 transplanted patients with HCC from Latin America, Italy, Belgium and France), we compared two composite models, the French and the Metroticket 2.0 scores. Both models presented adequate calibration and greater discrimination of recurrence, specific HCC survival and overall survival than the Milan criteria (P <.0001). The discrimination power was similar between composite models AFP [0.66 (CI 0.63-0.69)] and the Metroticket 2.0 [0.69 (CI 0.66-0.72)] (P> 0.05) and net reclassification (NRI) was not significant. Finally, in the last step of the Thesis, in a series of meetings in the Advisory Council Board from the INCUCAI and that from the Argentine Transplant Society (SAT), we presented these results based on decision-tree modelling approach, proposing the Double Eligibility Criteria (DCE) to be implemented in Argentina.

In conclusion, selection of liver transplant candidates purely and exclusively according to tumor number and diameter is inefficient. The use of biomarkers improves this selection. AFP values, either as a continuous variable or as a categorical variable is independently associated with recurrence, regardless of the size and tumor number. Furthermore, it is associated with other risk factors found in the explant such as tumor de-differentiation or microvascular invasion. Composite selection models, both the French and the Metroticket 2.0, are

superior to the Milan criteria, and allow optimizing the selection process of patients who are candidates for liver transplantation for HCC. However, we highlight that the categorization or prediction of the risk of recurrence using multivariable models only takes into account population and not individual variables. For estimation of individual or inter-individual risk, we should consider individual variability, which these models do not take into account. It is likely that other biomarkers or different biological profile of HCC exist, independently of AFP, particularly in the HBV+ population. That is why there is still a need for designing better transplant selection models for HCC, considering variables before and after liver transplantation, integrating tumor burden, biological behavior, and other tumor biological pathways in conjunction with novel biological markers.

## **2. Agradecimientos.**

En primer lugar, quisiera agradecer a todos los colegas que han participado en el desarrollo de la Tesis, tanto nacionales y Latino Americanos:

Margarita Anders MD<sup>3\*</sup>, Ilka F Boin MD<sup>4\*</sup>, Aline Chagas MD, PhD<sup>5</sup>, Emilio Quiñonez MD<sup>6</sup>, Sebastián Marciano MD MSCE<sup>7</sup>, Mario Vilatobá MD<sup>8</sup>, Luisa Santos MD<sup>9</sup>, Sergio Hoyos Duque MD<sup>10</sup>, Agnaldo Soares Lima MD<sup>11</sup>, Josemaría Menendez MD<sup>12</sup>, Martín Padilla MD<sup>13</sup>, Jaime Poniachik MD<sup>14</sup>, Rodrigo Zapata MD<sup>15</sup>, Alejandro Soza MD<sup>22</sup>, Martín Maraschio MD<sup>16</sup>, Ricardo Chong Menéndez MD<sup>17</sup>, Linda Muñoz MD PhD<sup>18</sup>, Diego Arufe MD<sup>19</sup>, Rodrigo Figueroa MD<sup>20</sup>, Elaine Cristina de Ataíde MD<sup>4</sup>, Claudia Maccali MD<sup>5</sup>, Rodrigo Vergara Sandoval MD<sup>6</sup>, Carla Bermudez MD<sup>7</sup>, Luis G Podesta MD<sup>1</sup>, Lucas McCormack MD<sup>3</sup>, Adriana Varón MD<sup>8</sup>, Adrián Gadano MD PhD<sup>6</sup>, Juan Mattera MD<sup>5</sup>, Federico Villamil MD<sup>6,23</sup> y Fernando Rubinstein MD MPH<sup>21</sup>.

3-Hospital Alemán, Buenos Aires, Argentina. 4-Hospital das Clínicas UNICAMP Campinas, Sao Paulo, Brazil. 5-Hospital das Clínicas University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil. 6-Hospital El Cruce, Florencio Varela, Argentina. 7-Hospital Italiano de Buenos Aires. 8-Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México. 9-Fundación Cardioinfantil, Bogotá, Colombia. 10-Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, y Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia, Colombia. 11-Hospital das Clinicas da UFMG, Minas Gerais, Brazil. 12-Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay. 13-Hospital Guillermo Almenara, Lima, Perú. 14-Hospital de la Universidad de Chile, Santiago, Chile. 15-Clínica Alemana, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile. 16-Hospital Privado de Córdoba, Argentina. 17- Hospital Carlos Andrade Marín, Quito, Ecuador. 18-Hospital Universitario "Dr. José E. González", Monterrey, Mexico. 19-Sanatorio

Sagrado Corazón, Buenos Aires, Argentina. 20-Sanatorio Allende, Córdoba, Argentina. 21- Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria (IECS), Buenos Aires, Argentina. 22- Hospital Clínico, Universidad Católica de Chile. 23- Hospital Británico, Buenos Aires, Argentina.

Así como también agradecer el nexos que hemos realizado con nuestros colegas Europeos, permitiéndonos coordinar el desarrollo de una red Latino Americana y Europea:

Helena Degroote<sup>1</sup>, Charlotte Costentin<sup>3</sup>, Andrea Notarpaolo<sup>4</sup>, Karim Boudjema<sup>6</sup>, Cinzia Baccaro<sup>7</sup>, Philippe Bachellier<sup>9</sup>, Giuseppe Maria Ettore<sup>10</sup>, Fabrice Muscari<sup>12</sup>, Fabrizio Dibenedetto<sup>13</sup>, Ephrem Salame<sup>15</sup>, Umberto Cillo<sup>16</sup>, Claire Vanlemmens<sup>18</sup>, Stefano Faggioli<sup>19</sup>, Patrizia Burra<sup>21</sup>, Daniel Cherqui<sup>22</sup>, Hans Van Vlierberghe<sup>1</sup>, Christophe Duvoux<sup>23</sup>.

1-Department of Hepatology and Gastroenterology, Ghent University Hospital, Belgium. 3- Hepatology and Transplant Unit, CHU Grenoble-Alpes, Grenoble, France; 4- Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy. 6-Department of Hepatobiliary and Digestive Surgery, Pontchaillou Hospital Rennes 1 University, Rennes, France; 7- Lanciano's Hospital, Chieti, Rome, Italy; 9-Digestive Surgery Unit, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France; 10-Ospedale San Camillo di Roma, Rome, Italy; 12- Digestive Surgery and Transplant Unit, Hôpital Rangueil, Toulouse, France; 13- Hepato-Pancreato-Biliary Surgery and Liver Transplantation Unit, Department of General Surgery, University of Modena and Reggio Emilia; 15- Digestive Surgery Unit, CHU de Tours, Tours, France; 16- Hepatobiliary Surgery and Liver Transplant Unit, Padova University Hospital; 18-Hepatology Unit, Hôpital Jean Minjot, Besançon, France; 19- Gastroenterology, Hepatology and Transplantation, Papa Giovanni XXIII Hospital, Bergamo, Italy; 21- Multivisceral Transplant Unit, Department of Surgery, Oncology and Gastroenterology, Padova University Hospital; 22- Hospital Paul Brousse-APHP, Villejuif, Paris, France; 23- Hospital Henri Mondor, University of Paris-Est, Creteil, France.



Al Colegio Los Molinos, todo su cuerpo docente y administrativo.

A la Universidad Austral, Facultad de Ciencias Biomédicas, lugar donde me formé como Médico.

Al Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno" (CEMIC). En particular a los Dres Cristian López Saubidet, Alejandro Abbate, Ricardo Valentini, Ignacio Bonelli, Pablo Rodríguez, Javier Guetta, Héctor Castaño, Ezequiel Ridruejo, entre otros. A mis ex-jefes de Residencia: Dr Matías Maskin, Dr Abel Novillo y Dr Luis Mazzuocolo. A mis compañeros de Residencia Universitaria del CEMIC: Carlitos, Dani, Clarita, Leila, Sofia e Isabel.

A la Sección de Hepatología y Trasplante Hepático del Hospital Italiano de Buenos Aires.

A la Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado, A.A.E.E.H. En particular a la Dra Teresa Schroeder y Dr Adrián Gadano, quienes me confiaron ser parte de sus comisiones directivas.

A mis amigos de hígado: Fede Orozco, Sebas Marciano, Diego Arufe y Margarita Anders.

A las sociedades científicas.

Al Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria (IECS).

Al Dr Fernando Rubinstein. Maestro y ejemplo de Investigación Clínica.

Al Hospital Austral, en particular a la UIC.

Al Dr Matías Tisi Baña y equipo de Clínica Médica. Al Dr Martín O'Flaherty.

A los Dres Gustavo Podesta, Martín Fauda, Ariel Gonzalez Campaña y Mariano Barreiro. A la Dra Pia Raffa.

A todas las coordinadoras de la Unidad de Hígado y Trasplante Hepático.

A Patricia Baré.

A nuestros ex fellows: Diego Arufe, Matías Coronel, Josefina Pages, Carla Colaci,

Marcos Thompson y Agustina Giménez.

A mi amigo, Dr Manuel Mendizabal.

Al Prof Dr Christophe Duvoux, de Francia.

Al Prof. Flair Carrilho.

Al gran jefe: Dr Marcelo Silva. Nos seguís enseñando con tu ejemplo.

A mis amigos.

A mis padres y hermanos. Mis suegros y cuñados. Tíos, primos y sobrinos.

A mis abuelos. A vos Toto, nuestro guía, nuestro médico.

A mis hijos: Cande, Joaco e Isa.

A vos. Todo por y gracias a vos: Mechi. Los quiero mucho!

Y a todos los médicos, enfermeros, kinesiólogos y todo el personal de salud que lucharon en primera línea contra el SARS-CoV2.

Mis honores y respeto a todos ellos.

### 3. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON LA TESIS DOCTORAL.

#### 3.1-Publicaciones en revistas indexadas relacionadas con la Tesis:

1. "IDENTIFYING PATIENTS AT HIGHER RISK OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA RECURRENCE AFTER LIVER TRANSPLANTATION IN A MULTICENTER COHORT STUDY FROM ARGENTINA". F Piñero, S Marciano, M Anders, F Orozco Ganem, A Zerega, J Cagliani, O Andriani, E de Santibañes, O Gil, Luis G Podesta, L McCormack, A Gadano and M Silva. *European Journal of Gastro & Hepatology* 2016; 28 (4): 421-427. doi: 10.1097/MEG.0000000000000551.
2. "LIVER TRANSPLANTATION FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA: EVALUATION OF THE AFP MODEL IN A MULTICENTER COHORT FROM LATIN AMERICA". F Piñero, M Tisi Baña, EC de Ataide, S Hoyos Duque, S Marciano, A Varón, M Anders, A Zerega, J Menéndez, R Zapata, L Muñoz, M Padilla Machaca, A Soza, L McCormack, J Poniachik, LG Podestá, A Gadano, IF Boin, C Duvoux and M Silva. *Liver International* 2016; 36:1657-1667. doi: 10.1111/liv.13159. \*
3. "PREDICTIVE MODELS FOR RECURRENCE RISK OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA AFTER LIVER TRANSPLANTATION: STILL AN UNMET NEED." F Piñero, F Carrilho, M Silva. *Liver International* 2017 May;37(5):648-650. doi: 10.1111/liv.13417.
4. "RESULTS OF LIVER TRANSPLANTATION FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN A MULTICENTER LATIN AMERICAN COHORT STUDY". F Piñero, P Costa, YL Boteon, S Hoyos Duque, S Marciano, A Varón, M Anders, A Zerega, J Menéndez, R Zapata, L Muñoz, M Padilla Machaca, A Soza, L McCormack, J Poniachik, M Fauda, A Gadano, IF Boin, H Parente Garcia and M Silva. *Annals of Hepatology* 2018, 17(2):256-267.

5. "LOOKING FOR THE BEST MODEL TO PREDICT HEPATOCELLULAR CARCINOMA RECURRENCE AFTER LIVER TRANSPLANTATION IN LATIN AMERICA". F Piñero, A Chagas and Ilka Boin. Clinical Liver Disease 2019, vol 13 (2): 46-50.
6. "COMMENT ON: SHADOWS BEHIND USING SIMPLE RISK MODELS IN SELECTION OF HCC PATIENTS FOR LT". F Piñero, F Rubinstein, A Laurent, M Silva, D Cherqui y C Duvoux. Annals of Surgery 2020, Nov 17.
7. "LIVER TRANSPLANTATION FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA: IMPACT OF EXPANSION CRITERIA IN A MULTICENTER COHORT STUDY FROM A HIGH WAITLIST MORTALITY REGION". Piñero F, Anders M, Boin I, Rubinstein F, Carrilho F, Silva M, et al. Transplant International. 2021;34(1):97-109.
8. "RECURRENCE OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA AFTER LIVER TRANSPLANTATION: PROGNOSTIC AND PREDICTIVE FACTORS OF SURVIVAL IN A LATIN AMERICAN COHORT". Maccali C, Chagas A, Boin I, Carrilho F, Silva M, Piñero F, et al. Liver International. 2021;41(4):851-862.

\* Corresponde a (1). Comentario Editorial del mismo volumen de la revista Liver International (2).Dicho trabajo ha sido referenciado en la guía Europea (3), Española y Argentina (4) de práctica clínica en pacientes con HCC, con un total de 22 citas en revistas indexadas.

### **3.2- Resultados en vías de publicación:**

1."A SIMPLE PREDICTION MODEL FOR RECURRENCE OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA AFTER LIVER TRANSPLANTATION IN PATIENTS WITHOUT MICROVASCULAR INVASION". Piñero F, Costa P, de Ataíde E, Hoyos Duque S, Marciano S, Anders M, Varón A, Zerega A, Poniachik J, Silva M, et al. ILTS 2017, Praga. Presentación oral 0-47.

- 1 *"EVALUATION OF THE AFP MODEL IN PATIENTS WITH LOW RISK RECURRENCE PROFILE: FURTHER EVIDENCE TO SUPPORT ITS INCLUSION FOR CANDIDATE SELECTION"*. Piñero F, Costentin C, Silva M, Duvoux C, et al. International Liver Cancer Association Congress (ILCA), September 2019, Chicago, USA. Presentación oral en sesión plenaria.
- 2 *"EVALUATION OF THE AFP SCORE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA PROGRESSION DURING THE WAITING LIST AND RECURRENCE AFTER LIVER TRANSPLANTATION"*. Piñero F, Boin I, Chagas A, Quiñones E, Carrilho F, Silva M, et al. International Liver Cancer Association Congress (ILCA), September 2019, Chicago, USA. Presentación poster P-048.
- 3 *"LISTING, DROPOUT AND TRANSPLANTATION FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN LATIN AMERICA: UNEXPECTED AND PREVIOUSLY NOT REPORTED RESULTS"*. Piñero F, Boin I, Chagas A, Quiñones E, Carrilho F, Silva M, et al. International Liver Cancer Association Congress (ILCA), September 2019, Chicago, USA. Presentación poster P-089.
- 4 *"REASSESSMENT OF RISK OF RECURRENCE (R3) AFTER LIVER TRANSPLANTATION FOR HCC: VALIDATION OF THE R3 SCORE AND COMPARISON WITH EXISTING MODELS: RESULTS OF A MULTINATIONAL ANALYSIS IN 2444 PATIENTS"*. Costentin C\*, Piñero F\*, Degroote H, Silva M, Duvoux D, et al. International Liver Congress (ILA-EASL) 2020, Abstract 3540. Presentación oral. \*Primer autoría compartida.
- 5 *"INTERNATIONAL MULTICENTER STUDY ON THE OUTCOME OF LOCOREGIONAL THERAPY BEFORE LIVER TRANSPLANT FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA EXTENDING THE MILAN CRITERIA"*. Degroote H\*, Piñero F\*, Costentin C\*, Notarpaolo A, Carrilho F, Silva M, Duvoux D, et al. International Liver Congress EASL 2020 y el ILCA digital 2020, Abstract O-071. Presentación oral. \*Primer autoría compartida.

- 6 “METROTICKET 2.0 AND AFP SCORE HAVE SIMILAR PERFORMANCE TO PREDICT POST-LT OUTCOMES: RESULTS OF A MULTICENTER COHORT STUDY”. Piñero F\*, Costentin C\*, Degroote H\*, Notarpaolo A, Rubinstein F, Carrilho F, Silva M, Duvoux D, et al. *International Liver Transplant Congress (ILTS) 2020*, Presentación oral O-12. \*Primer autoría compartida.

### **3.3-Premios/menciones en congresos nacionales e internacionales relacionadas con la tesis doctoral.**

- Premio Anual 2013 en Investigación Clínica, Departamento de Desarrollo Académico del Hospital Universitario Austral: Dr Gustavo Amestoy: “*Recurrencia de Hepatocarcinoma post Trasplante Hepático en Argentina y Uruguay.*”
- Premio Anual 2014 en Investigación Clínica, Dr Ruben Terg. Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado (A.A.E.E.H): “*Predicting recurrent Hepatocellular carcinoma after Trasplantation: A New Clinical-Pathological Score including alfa-fetoprotein*”. Federico Piñero, Sebastián Marciano, Margarita Anders, Federico Orozco Ganem, Alina Zerega, Oscar Andriani, Eduardo de Santibañes, Octavio Gil, Luis G Podestá, Lucas Mc Cormack, Adrián Gadano y Marcelo Silva.
- Segunda Mención: XVIII Congreso Argentino de Hepatología: “*Trasplante hepático y hepatocarcinoma: evaluación del modelo de selección francés en una cohorte multicéntrica latino americana*”. F Piñero, E C de Ataide, S Marciano, M Anders, A Zerega, JC Diaz, C Rondon, JM Menéndez, R Zapata, L Muñoz, M Maraschio, M Tisi Baña, Y L Boeton, R Mastai, N Jarufe, MP Machaca, E de Santibañes, A Soza, L McCormack, J Poniachik, A Gadano, IF Boin, C Duvoux, M Silva.

- Tercera Mención: XVIII Congreso Argentino de Hepatología: “Trasplante hepático y hepatocarcinoma: resultados de un estudio multicéntrico latino americana”. F Piñero, O Andriani, E C de Ataíde, S Marciano, F Orozgo Ganem, A Zerega, JC Diaz, C Maldonado, J Chaman, JM Menéndez, R Zapata, L Muñoz, M Barrabino, Y L Boeton, S Gerona, M Padilla Machaca, N Jarufe, O Gil, R Mastai, E de Santibañes, A Soza, J Poniachik, L McCormack, A Gadano, IF Boin, G Podestá, M Silva.
- II Jornada de Investigación del Hospital Universitario Austral, 2015. Mención de honor en Investigación Clínica. “Trasplante hepático y hepatocarcinoma: evaluación del modelo de selección francés en una cohorte multicéntrica latinoamericana”. Federico Piñero, M Silva y col.
- Primer premio, mejor trabajo científico, XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado (ALEH) 2016, Santiago de Chile. “Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: results from a multicenter cohort from Latin America”. Federico Piñero, M Silva y col.
- XXV Congreso de la Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado (ALEH) 2018. República Dominicana. Travel Award. AASLD-ALEH. Workshop de Investigación.
- “EVALUATION OF THE AFP MODEL IN PATIENTS WITH LOW RISK RECURRENCE PROFILE: FURTHER EVIDENCE TO SUPPORT ITS INCLUSION FOR CANDIDATE SELECTION”. Piñero F, Costentin C, Silva M, Duvoux C, et al. International Liver Cancer Association Congress (ILCA), September 2019, Chicago, USA. Oral Presentation, Plenary Session. Best Clinical Presentation. Travel Award.
- “INTERNATIONAL MULTICENTER STUDY ON THE OUTCOME OF LOCOREGIONAL THERAPY BEFORE LIVER TRANSPLANTATION FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA EXTENDING THE MILAN CRITERIA”.

*Degroote H\*, Piñero F\*, Costentin C, Silva M, Duvoux C, et al. International Liver Cancer Association Congress (ILCA), September 2020. Oral Presentation, Plenary Session. Best Clinical Oral Communication. Junior Award. \*Shared first authorship.*



#### **4. Abreviaturas**

AFP: Alfa-feto proteína;

AUROC: área bajo la curva en la relación sensibilidad y 1-Especificidad.

CsA: Ciclosporina.

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group;

HBV: Hepatitis B crónica

HCV: Hepatitis C crónica.

HCC: Hepatocarcinoma;

HGNA: hígado graso no alcohólico;

HR: Hazard ratio;

IC: Intervalo de confianza;

INR: Razón Internacional Normalizada;

iHCC: hepatocarcinoma de hallazgo incidental en el explante.

IQR: rango intercuartilo;

MMF: Micofenolato.

MVI: invasión microvascular

NRI: Índice de mejora neta en la reclasificación.

PEI: Inyección percutánea con etanol;

RH: Resección Hepática;

RFA: ablación por radiofrecuencia;

RFS: sobrevida libre de recurrencia.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear;

ROC: curva ROC o del inglés Receiving Operator Curve.

Tac: Tacrolimus

TAC: Tomografía Axial Computarizada;

TACE: quimioembolización transarterial;

TH: Trasplante Hepático.

SHR: Subdistribución del Hazard Ratio.

SAT: Sociedad Argentina de Trasplantes.

DCE: Doble Criterio de Elegibilidad.

Universidad de California San Francisco (UCSF)

## **5. INTRODUCCIÓN.**

### **5.1 Marco teórico del desarrollo de la Tesis Doctoral.**

La recurrencia post trasplante hepático es un evento dramático, con pobre sobrevida desde el diagnóstico y escasa posibilidad terapéutica curativa (5). En efecto, la recurrencia del HCC post trasplante hepático es la primer causa de muerte en estos pacientes luego del trasplante hepático. Inicialmente, en la década de 1980 el trasplante hepático para pacientes con hepatocarcinoma (HCC) tenía resultados muy pobres en cuanto a sobrevida a 5 años (10-35%) debido a una elevada recurrencia tumoral, cercana al 65%. Estos resultados eran consecuencia de la ausencia de criterios de selección de candidatos a trasplante hepático y al diagnóstico en estadios avanzados como consecuencia de la ausencia de tamizaje rutinario en la población en riesgo. Es por esto que el trasplante hepático para pacientes con HCC era prácticamente una contraindicación relativa.

Sin embargo, hubieron dos grandes hitos en la historia del trasplante hepático por HCC. En primer lugar, el auge del trasplante hepático a nivel mundial secundario a las mejoras técnico-quirúrgicas y fundamentalmente, a la introducción de inhibidores de calcineurina, ciclosporina y luego tacrolimus. En segundo lugar, el hallazgo incidental en el explante de pequeños tumores (<3 cm) y en número menor a 3 nódulos en pacientes con cirrosis dio puntapié a una sucesión de resultados clínicos en cuanto a la selección de ideales candidatos a trasplante hepático.

A principios de la década de los años '90 distintos autores observaron que pacientes con hallazgo incidental de HCC en el explante presentaban una sobrevida muy buena con una recurrencia inferior a la esperada en aquella época. Es así como en 1996, Vincenzo Mazzaferro y colaboradores publican los

criterios de Milán de selección a candidatos a trasplante hepático (1 nódulo único  $\leq 5$  cm o hasta 3 nódulos cuyo diámetro mayor no supere los 3 cm) (6). Aplicando estos criterios demostraron excelentes resultados post trasplante con una supervivencia y recurrencia tumoral a 5 años del 70% y 15%, respectivamente. Tal es así que los criterios de Milán han revolucionado la transplantología mundial y ha marcado un hito en la historia del HCC.

La incidencia en aumento de este tumor en el mundo fue el otro pilar por el cual hoy por hoy entre un 20-30% de los pacientes enrolados en lista de trasplante en Estados Unidos o Europa es por HCC. La incidencia observada de recurrencia del HCC luego del TH luego de la introducción de los criterios de Milán ha ido disminuyendo, con la consecuente mejor selección de candidatos a trasplante (7). De hecho, aquellos pacientes con HCC dentro de Milán se les otorga desde el 2002 en USA, desde 2006 en Argentina y resto del mundo, un puntaje suplementario con priorización para un mayor acceso al trasplante con el fin de evitar la salida de lista de espera por progresión tumoral (8,9).

Sin embargo, a pesar de su aplicación a nivel mundial, la recurrencia del HCC post-TH sucede en alrededor del 15-20% de los casos, aún dentro de criterios de Milán y ésta, se ha asociado a un pobre pronóstico post-TH (10-12). Es por esto que en los últimos años, se ha focalizado la investigación clínica en TH en la "optimización" de la selección de candidatos con el fin de identificar aquellos pacientes con menor riesgo de recurrencia post-TH, tanto dentro como fuera de criterios de Milán.

Durante los últimos diez años, los criterios de Milán han sido desafiados dado a su rigidez, excluyendo pacientes que podrían ser elegibles para TH con excelentes resultados. Una propuesta han sido los criterios "extendidos" con el fin de ampliar la selección de candidatos a trasplante hepático. Estos criterios

extendidos han sido inicialmente propuestos del análisis de los explantes y luego validados también por imágenes pre-trasplante (13,14). En Estados Unidos, los más relevantes son los propuestos por la Universidad de California San Francisco (UCSF)(15), que incluyen la presencia de un único tumor <6.5 cm o hasta 3 nódulos cuyo diámetro del nódulo mayor sea <4.5 cm y la suma total de diámetros no supere los 8 cm (13,14). La aplicación en la práctica diaria de estos criterios extendidos ha sido limitado (16,17). Otro modelo propuesto ha sido los criterios de "Hasta-7"(18), contemplando variables del explante, por lo que su utilidad ha sido cuestionable (11,12).

Por otro lado, la aplicación de criterios "extendidos", no ha generado similares resultados en cuanto a sobrevida y recurrencia post-TH (14,15,18). Es por esto que se ha puesto el foco en utilizar biomarcadores en la selección de candidatos a TH, incluyendo la AFP pre trasplante, asociada a mayor riesgo de recurrencia (19-21).

Se ha asociado la AFP pre trasplante con peor sobrevida y mayor recurrencia post trasplante (19-21). Este efecto se ha anclado prioritariamente en la correlación de valores elevados de AFP con tumores biológicamente más agresivos en la evaluación histológica de los explantes, asociándose con invasión microvascular o tumores dediferenciados (1,22-26). En la actualidad, algunos países excluyen de trasplante hepático a aquellos pacientes con valores de AFP superiores a 1000 ng/ml (21,27).

Los criterios "expandidos" podrían incrementar el riesgo de recurrencia post trasplante hepático e impactar negativamente en la sobrevida global (7). Es por esto que las recientes guías internacionales han resaltado la necesidad de incorporar criterios de elegibilidad compuestos, incluyendo límites tumorales pero también biomarcadores con el fin de optimizar la elegibilidad de

candidatos a trasplante con HCC (3,4,28). Asimismo, la respuesta radiológica luego del tratamiento locorregional también debiera ser incorporado para la elegibilidad de candidatos a trasplante (29).

Consecuentemente, una nueva propuesta de "criterios de optimización" ha sucedido, con la intención de incluir pacientes tanto dentro como fuera de Milán que presentan bajo riesgo de recurrencia. El uso de biomarcadores ha ganado camino en el proceso de optimización en la selección de candidatos a trasplante hepático. Se han propuesto la inclusión de la alfa-feto proteína en suero (AFP) (19) y la biopsia tumoral con valoración del grado de diferenciación tumoral pre trasplante (30).

La combinación de valores de AFP con el número y diámetro tumoral se han incorporado en "modelos compuestos", primero el modelo de AFP (22), y luego el Metroticket 2.0 (25). Ambos modelos han demostrado ser superiores a los criterios de Milán, en cuanto a la predicción de recurrencia (22), y sobrevida específica por HCC post trasplante (25).

El modelo de AFP, o modelo Francés, incorpora a variables de diámetro y número tumoral por imágenes, el valor de AFP para la selección de candidatos a TH, y ha demostrado ser superior a los criterios de Milán en una cohorte Francesa (22). Este modelo se basa en un score numérico (rango de 0 a 9 puntos), asignando puntajes al diámetro del nódulo mayor, al número de nódulos y a los valores de AFP pre-TH. Un umbral o corte dicotómico de hasta 2 puntos identifica candidatos a TH con excelente sobrevida y recurrencia a 5 años luego del trasplante (22).

La validación del score de AFP en otras poblaciones podría ayudar en determinar la aplicabilidad del mismo. En la cohorte Francesa, la principal etiología del HCC fue la cirrosis alcohólica, seguida de la hepatitis C (HCV) (22).

En otra cohorte Italiana, el modelo de AFP discriminó mejor el riesgo de recurrencia en una población HCV respecto a aquellos con HBV crónica (31). Es en estas diferencias poblacionales en donde es necesaria la validación de estos modelos. Para nuestro conocimiento, no hay validación externa previa del modelo de selección de AFP fuera de Europa.

Se ha postulado que el Metroticket 2.0 es superior al modelo de AFP en la discriminación del riesgo de muerte específica por HCC post trasplante (25). Sin embargo, la mejora neta de reclasificación no ha sido extensamente evaluada y por otro lado, el evento de interés evaluado, muerte por recurrencia de HCC, podría no haber registrado todos los eventos de recurrencia post trasplante hepático al momento del análisis (32). Asimismo, el Metroticket 2.0 incluye valores continuos de AFP en el modelo matemático, sobrevalorando el modelo y probablemente explicando la leve diferencia en el poder de discriminación (25). El poder de discriminación por riesgos competitivos fue externamente evaluado en una cohorte cuya etiología predominante fue hepatitis B (HBV), mientras que el modelo de AFP se desarrolló en cohortes cuya etiología predominante fue cirrosis alcohólica y hepatitis C (25).

Estas diferencias etiológicas, demandan la comparación de la calibración y de discriminación de estos modelos en otras cohortes y en poblaciones de menor riesgo de recurrencia, teniendo en cuenta que el modelo de AFP ha demostrado no discriminar adecuadamente la recurrencia post trasplante en pacientes con HBV (1,31). Finalmente, el Metroticket 2.0 no ha sido diseñado como herramienta sencilla para la práctica diaria, sin un umbral o corte específico, como si fue la propuesta original del modelo de AFP (22).

Otras estrategias con el fin de evitar el delistamiento por progresión tumoral y por otro lado, de generar una optimización de selección de candidatos a

trasplante han sido propuestas. La estrategia de reducción del diámetro y número tumoral con tratamientos locorregionales es un ejemplo (estrategia llamada *downstaging*) (33).

Esta estrategia llamada "*downstaging*" ha sido originalmente propuesta por el grupo de la Universidad de California, San Francisco, denominada como protocolo UCSF-DS (33,34). Sin embargo, esta estrategia, que utiliza únicamente criterios en cuanto a número y diámetro tumoral, se ha asociado a mayor riesgo de recurrencia en distintos metanálisis (35,36) y en un análisis reciente de su aplicación a nivel nacional en Estados Unidos (37,38). Esto probablemente haya sido debido a la gran heterogeneidad clínica en cuanto a la aplicación de los criterios de elegibilidad para los protocolos de *downstaging* (35,36).

Por lo tanto, es importante definir el límite tumoral, en cuanto a número y diámetros, de elegibilidad para protocolos de reducción de estadio. Francis Yao y colaboradores propusieron el protocolo de UCSF-DS como criterio límite para el *downstaging*, incluyendo un valor de AFP no superior a 1000 ng/ml junto con estabilidad tumoral mínima de 3 meses luego de lograr la reducción tumoral (33,34). Recientemente, se ha observado que aquellos por fuera de límites del protocolo UCSF-DS, llamados "fuera de todos los límites" (AC), se asocian con peor pronóstico post trasplante (37,38). Asimismo, la incorporación de un corte de AFP inferior a 100 ng/ml fue propuesta para la identificación de mejores candidatos dentro del protocolo UCSF-DS (37).

Por más de veinte años entonces, los criterios de Milán han sido los criterios estándares de selección de candidatos a trasplante hepático (TH) por hepatocarcinoma (HCC) (6). Durante la última década, el foco se ha puesto en la introducción de biomarcadores para la selección de candidatos a trasplante. Se ha demostrado en extensa literatura, que la alfa-feto proteína en suero (AFP),



se asocian con un comportamiento biológico más agresivo y peor pronóstico en la historia natural del hepatocarcinoma, tanto en estadios tempranos como avanzados (39,40). Esta población se ha asociado a un perfil de HCC "proliferativo" (41), con mutación TERT y P53, patrón proliferativo en análisis de transcriptómica (G1-3)(42), y cambios epigenéticos hacia la sobreexpresión del factor de crecimiento derivado del endotelio vascular o VEGF (27).

Por otro lado, la *optimización* es necesaria con el fin de equilibrar o dar mayor justicia en la alocaación de órganos, teniendo en cuenta la prioridad en la alocaación en lista que se ha otorgado a estos pacientes (43). De hecho, recientemente se ha observado una desproporción en la alocaación de órganos para pacientes con HCC dentro de Milán con respecto a aquellos sin patología tumoral, con un menor de delistamiento o *dropout* en lista, menor mortalidad pre trasplante y un mayor acceso al mismo (44).

Una selección no criteriosa o inadecuada de candidatos a trasplante por HCC y su consecuente priorización en lista de espera con el fin de evitar el delistamiento por progresión tumoral, podría generar una inequidad hacia pacientes no priorizados sin HCC. Esta inequidad podría generar un menor acceso al trasplante y mayor mortalidad en lista de espera en pacientes sin HCC (44-46). La necesidad de balancear la prioridad de trasplantar primero al paciente más enfermo, maximizando la expectativa de sobrevida post trasplante y optimizando el uso de un recurso limitado, como lo son los donantes cadavéricos, es común en todos los países del mundo. La expansión fuera de criterios de Milán podría incluso aumentar excesivamente el número de candidatos a trasplante con HCC, alterando el balance de trasplantabilidad y mortalidad en lista de espera en contra de los pacientes sin HCC no priorizados (44-47), resultado en una situación injusta e inequitativa, particularmente en

regiones del mundo con elevada mortalidad en lista (46,47).

En Latino América, reportes previos han demostrado menor tasas de donación por millón de habitantes (DPM) comparados con Europa o Estados Unidos (8.3 DPM versus 15 DPM y 26 DPM, respectivamente) (47,48). Asimismo, los pacientes dentro de criterios de Milán son priorizados con puntaje suplementario de MELD, que es el sistema de alocaión y priorización en lista de espera para trasplante. Este “háñdicap” teóricamente permite a los pacientes con HCC ser trasplantados evitando el delistamiento por progresión tumoral en lista de espera. Sin embargo, el puntaje suplementario otorgado o priorización debiera no impactar negativamente en el acceso al trasplante y mortalidad en lista de espera en pacientes sin HCC (46,49). Las consecuencias de la adopción de modelos de expansión y de optimización para pacientes con HCC no ha sido previamente explorada en regiones con elevada mortalidad en lista de espera.

### **5.2. Planteo de la pregunta clínica de investigación.**

Se planteó responder la siguiente pregunta de investigación: En pacientes con hepatocarcinoma, ¿es útil la incorporación de AFP pre trasplante en modelos de selección de candidatos a trasplante hepático?

### **5.3. Objetivo Primario:**

Evaluar la incorporación del biomarcador AFP en modelos de selección para candidatos a trasplante hepático en pacientes con hepatocarcinoma. El proyecto de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en distintas etapas detalladas en los siguientes capítulos, contemplando distintas preguntas de investigación clínica orientadas el objetivo de la misma. Estas etapas, puntualizan o focalizan el uso de AFP incluida en distintos modelos de selección pre trasplante hepático.

#### **5.4. Objetivos Secundarios:**

1. Validar el modelo de selección Francés en una cohorte externa no Europea (primer validación externa a nivel mundial).
2. Evaluar la asociación y predicción de recurrencia y sobrevida post trasplante hepático del modelo de selección Francés en una población de muy bajo riesgo de recurrencia.
3. Evaluar la incorporación de la AFP y los modelos de selección en la asociación con progresión tumoral y delistamiento o dropout en lista de espera para trasplante hepático.
4. Comparar el score Francés versus otro modelo de selección compuesto: el Metroticket 2.0.
5. Evaluar la incorporación de AFP en la optimización de selección de candidatos a estrategias de reducción de estadio o downstaging.
6. Proponer un modelo de implementación y priorización en la alocaión de órganos a nivel Nacional con la incorporación de la AFP en modelos de selección.

#### **5.5. Hipótesis.**

La incorporación de la AFP, tanto sola o mediante modelos compuestos (número y diámetro junto con este biomarcador), sería de utilidad en la optimización de candidatos a trasplante hepático por HCC, generando justicia y equidad en la distribución de órganos, tanto a nivel Nacional como regional.

#### **5.6 Capítulos del proceso de Tesis Doctoral.**

**A- Primer capítulo.** Evaluación de la incorporación de la AFP en la selección de

candidatos a trasplante hepático por HCC en una cohorte multicéntrica Argentina (punto de anclaje).

**B- Segunda capítulo.** Evaluación de un modelo de selección compuesto, el modelo de selección Francés, en una cohorte no Europea. A) Primer validación externa a nivel mundial de dicho score en una primer cohorte multicéntrica Latinoamericana (2005-2011), y B) resultados globales de dos cohortes Latinoamericanas en dos períodos (2005-2011 y 2012-2018).

**C- Tercer capítulo.** Evaluación de la incorporación de la AFP y del modelo de selección Francés en la asociación con progresión tumoral en lista de espera para trasplante hepático en una cohorte multicéntrica Latinoamericana (2012-2018).

**D- Cuarto capítulo:** Evaluar la optimización de selección de candidatos a estrategias de reducción de estadio o downstaging mediante la incorporación de AFP en una cohorte multicéntrica transcontinental: cohortes Latinoamericana, Italiana, Belga y Francesa.

**E- Quinto capítulo.** A) Comparación de dos modelos compuestos, el score Francés versus el Metroticket 2.0, y B) Evaluación de la incorporación de AFP y del modelo de selección Francés en pacientes con HCC biológicamente menos agresivo. Cohortes Latinoamericana, Italiana, Belga y Francesa.

**F- Capítulo final:** Evaluación de un modelo de implementación, mediante un análisis de decisiones clínicas y sanitarias, en la priorización y alocaión de órganos a nivel Nacional y Regional en dos cohortes multicéntricas Latinoamericanas.

## **6. Capítulo 1. Evaluación de la incorporación de la AFP en la selección de candidatos a trasplante hepático por HCC en una cohorte multicéntrica Argentina (punto de anclaje).**

En esta etapa nos focalizamos en responder la siguiente pregunta de investigación:

a)-En pacientes que recibieron un trasplante hepático por hepatocarcinoma en Argentina, ¿el uso de AFP podría ser útil en categorizar el riesgo de recurrencia?

### **6.1. Objetivos.**

Nuestro objetivo fue explorar si los criterios de "Hasta-7" basados en imágenes pre-trasplante categorizan adecuadamente el riesgo de recurrencia y secundariamente, proponer un modelo compuesto de selección incluyendo la AFP como biomarcador de selección.

### **6.2. Pacientes y métodos.**

*Centros participantes, horizonte temporal y elegibilidad.*

Se incluyó una cohorte de pacientes adultos (>17 años), trasplantados de hígado con HCC entre el 1ero de Junio del 2005 y el 31 de Diciembre del 2011 en 4 centros de trasplante hepático de Argentina. Los centros que participaron de este estudio fueron el Hospital Universitario Austral, el Hospital Italiano de Buenos Aires, el Hospital Alemán y el Sanatorio Allende de Córdoba. Se incluyeron todos los pacientes con HCC confirmado histológicamente en el análisis patológico del explante.

*Variables de exposición.*

Todas las variables demográficas, de exposición y de eventos se registraron en un registro escrito (CRF escrito) y electrónico (CRF electrónico). Se revisaron de manera retrospectiva datos de la historia clínica, incluyendo variables demográficas, datos tumorales de imágenes y valores de AFP al enrolamiento en lista de espera. El diagnóstico de HCC pre trasplante se realizó acorde a criterios radiológicos recomendados por guías internacionales de práctica clínica (50). Acorde a número de nódulos y diámetro de los mismos, se asignaron y adoptaron en cada paciente incluido los criterios de Milán (1 nódulo  $\leq 5$  cm ó hasta 3 nódulos ninguno  $>3$  cm de diámetro), UCSF (1 nódulo  $\leq 6.5$  cm ó hasta 3 nódulos ninguno  $>4.5$  cm de diámetro y la suma total de diámetros  $\leq 8$  cm) y "Hasta-7" (sumatoria del diámetro del nódulo mayor en cm y el número total de nódulos inferior o igual a 7) usando datos de imágenes pre-trasplante hepático, tanto tomografía axial computada (TAC) o Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Si bien los estándares de selección en los 4 centros fueron los criterios de Milán, el trasplante hepático por fuera de estos criterios fue discutido localmente en cada centro, de acuerdo a políticas propias e individualizado en cada caso particular. Se registraron además, los tratamientos locorregionales tumorales realizados como puente al trasplante hepático, incluyendo: quimioembolización transarterial (TACE), ablación percutánea por radiofrecuencia (RFA), alcoholización percutánea (PEI) o cirugía.

Todos los centros participantes compartían un mismo formato para el análisis de la anatomía patológica del explante. El espécimen fue cortado en tacos de 5-10mm de espesor y fue revisado tanto en la macro como microscopía por patólogos expertos en el área. Cada nódulo fue evaluado macro y microscópicamente, incluyendo el diámetro mayor (cm), la presencia de invasión tumoral macro o microvascular (MVI), y el grado de diferenciación

tumoral de acuerdo al sistema de Edmonson-Steiner (51). El nódulo con el diámetro de mayor tamaño fue definido como “nódulo mayor”. Finalmente, se aplicaron en el explante los criterios de Milán, UCSF y “hasta-7”. Se compararon los hallazgos del último control de imágenes pre trasplante (TAC o RNM) con los hallazgos del explante. El hallazgo de HCC únicamente en el explante (no conocido en el pre-TH) se lo definió como HCC incidental (iHCC).

Se registró también el tipo de inmunosupresión utilizada en el período post TH, incluyendo tacrolimus (Tac), ciclosporina A (CsA) o inhibidores de la vía mTOR (sirolimus o everolimus) con o sin micofenolato (MMF).

#### *Eventos primario y secundarios.*

El evento primario de evaluación fue el desarrollo de recurrencia del HCC a 5 años post TH. La sobrevida libre de recurrencia (RFS) se definió al periodo de tiempo en meses desde el TH hasta el diagnóstico de la recurrencia o fallecimiento, el primero que sucediera en el seguimiento. El seguimiento post-TH para el monitoreo de la recurrencia del HCC consistió en una TAC o RMN, centellograma óseo corporal total y niveles de AFP cada 6 meses durante los primeros 3 años post TH en todos los pacientes de los centros participantes. El diagnóstico de la recurrencia del HCC en el post TH fue determinada en función de imágenes y niveles de AFP o de su confirmación histológica. El evento de interés secundario fue la sobrevida global desde el TH hasta el fallecimiento o fecha de último seguimiento.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a los estándares éticos para el desarrollo de investigación clínica, tanto nacionales como internacionales, y de acuerdo con la declaración de Helsinki y su última actualización en el 2008. Se mantuvo un acuerdo de confidencialidad de datos registrados y el protocolo

del estudio siguió normativas para el reporte de estudios observacionales (guía STROBE) (52).

#### *Análisis estadístico.*

Se tomó un valor estadístico a dos colas, error  $\alpha$  o tipo I de 5% (valor de  $p < 0.05$ ). Las variables binarias o dicotómicas se expresan en frecuencias o proporciones y se compararon mediante test de  $\chi^2$  o test de Fisher, según corresponda. Las variables numéricas discretas y continuas se expresan de acuerdo a su distribución como medias (desvío estándar) o medianas (rango intercuartilo 25-75%), y se compararon mediante test T-Student o Mann Whitney-U test, respectivamente. Se evaluaron la distribución normal o no normal por comparación de medias/medianas, skewness y kurtosis, histograma, curva de normalidad y en caso de  $n$  pequeño, test de Wilk Shapiro.

Para el análisis de sobrevida global se realizaron curvas de Kaplan Meier y se compararon mediante test de log-rank. Se realizó un modelo multivariable de regresión Cox evaluando variables de exposición asociadas con recurrencia de HCC post TH, con cálculo de medida de efecto Hazard Ratios (HR) y sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Para este modelo se incluyeron únicamente aquellos pacientes con HCC de diagnóstico pre TH con imágenes. Se realizó testeo de riesgo proporcional. Se incluyeron variables del análisis univariado con una  $P < 0.1$ ; respetando 1 variable incluida en el modelo por cada 10 eventos. Se realizaron pasos sucesivos o *forward*, evaluando la significancia estadística individual y ajustada por el resto de las variables (test de Wald) y su medida de efecto (HR) con su IC 95%. El ajuste por efecto confundidor se definió con una modificación de algún HR de las variables previamente incluidas en  $>20\%$ . Se priorizó tanto el ajuste como el test de Wald para la construcción del



modelo.

Para evaluar la discriminación para el evento final de recurrencia a 5 años, se evaluó el evento primario como evento no tiempo dependiente, utilizando una regresión logística, evaluando la calibración del modelo (test de Hosmer Lemeshow) y poder de discriminación mediante el área bajo la curva ROC (Receiving Operator Curve). La validación interna se realizó mediante muestreo aleatorio o bootstrapping. Todos los análisis se realizaron mediante SPSS versión 20.0.

### **6.3. Resultados.**

Un total de 763 pacientes fueron consecutivamente trasplantados durante el periodo del estudio, de los cuales se incluyeron 129 con HCC. De éstos, 71.3% tenían HCC de diagnóstico pre trasplante por imágenes y 28.7% (n=37) incidental en el explante. Cinco pacientes no evidenciaron confirmación del HCC en el explante (5.4%), 3 con nódulos de regeneración, 1 con hamartoma biliar y otro paciente con colangiocarcinoma.

En la tabla 1 se describen las características demográficas, tumorales pre TH y del explante de los pacientes incluidos. Dentro de los pacientes con HCC diagnosticado pre TH, la mediana de tiempo desde la última imagen de evaluación tumoral pre TH (TAC o RMN) al trasplante fue de 1.9 meses (IQR 0.9-3.9 meses). De acuerdo a los datos de imágenes pre TH, el 79.3% (n=73), 87.9% (n=80) y 90.1% (n=82) se encontraban dentro de criterios de Milán, San Francisco y "Hasta-7", respectivamente. Durante el período pre TH, se realizaron tratamientos puente al trasplante en 36 pacientes con TACE (n=29), RFA (n=6) y cirugía (n=1). Se realizó estrategia de reducción tumoral o *downstaging* hacia criterios de Milán en 18 pacientes pero solamente fue efectivo en 3. La mediana

de AFP pre-TH fue de 8.8 ng/ml y 15.3% (n=19) presentaron niveles de AFP superiores a 100 ng/ml. La mediana de tiempo desde la última AFP pre TH al trasplante fue de 2.0 meses (IQR 1.0-7.0 meses).

La tabla 2 compara los hallazgos patológicos del explante entre pacientes dentro de criterios de Milán, UCSF y "Hasta-7" por imágenes pre TH. La MVI fue más frecuente en pacientes fuera de UCSF y de "Hasta-7". En 28.3% de los pacientes inicialmente dentro de Milán pre TH, estaban fuera de Milán cuando se los re evaluó en criterios del explante.

Durante el seguimiento post TH, el esquema de inmunosupresión inicial más utilizado fue con Tac (n=79, 65.3%), MMF (n=94, 77.7%) y esteroides (n=120, 99.2%). Entre el 3er mes y los 2 años post TH, el uso de mTOR se incrementó de un 4.2% (n=5) a 19.8% (n=16).

#### *Recurrencia y sobrevida post trasplante hepático.*

La recurrencia y sobrevida global post TH a 5 años fue del 13.7% y del 63.3%, respectivamente, durante una media de seguimiento de  $3.5 \pm 2.2$  años. Las principales causas de muerte fueron la recurrencia del HCC en un 34.9% (n=15), sepsis 27.9% (n=12) y eventos cardiovasculares 23.2% (n=10). La mediana de RFS fue de 12.4 meses (IQR 17.2 meses); el diagnóstico de la recurrencia se realizó mediante criterios imagenológicos en 12 pacientes con mediana de AFP al diagnóstico de la recurrencia de 188 ng/ml (IQR 2197.7 ng/ml), y con biopsia tumoral en 5 pacientes. El sitio de afectación de la recurrencia post TH más frecuente fue el hígado (n=11), los huesos (n=10) y los pulmones (n=6).

De acuerdo a criterios pre-TH por imágenes, aquellos pacientes dentro de Milán presentaron mayor sobrevida a 5 años (70.0% vs 45.5% en aquellos fuera de Milán), siendo esta diferencia estadísticamente no significativa (P=0.06).

Aquellos pacientes dentro de UCSF o de "Hasta-7" en imágenes pre TH presentaron similar recurrencia y sobrevida a 5 años que aquellos dentro de criterios de Milán. Sin embargo, aquellos pacientes que excedieron de criterios de UCSF o de "Hasta-7" por imágenes presentaron mayor recurrencia (45.5% y 55.6%) y menor sobrevida a 5 años (30.0% y 33.0%) respecto a aquellos dentro de Milán pre TH (Tabla 2).

#### *Score predictor de riesgo de recurrencia.*

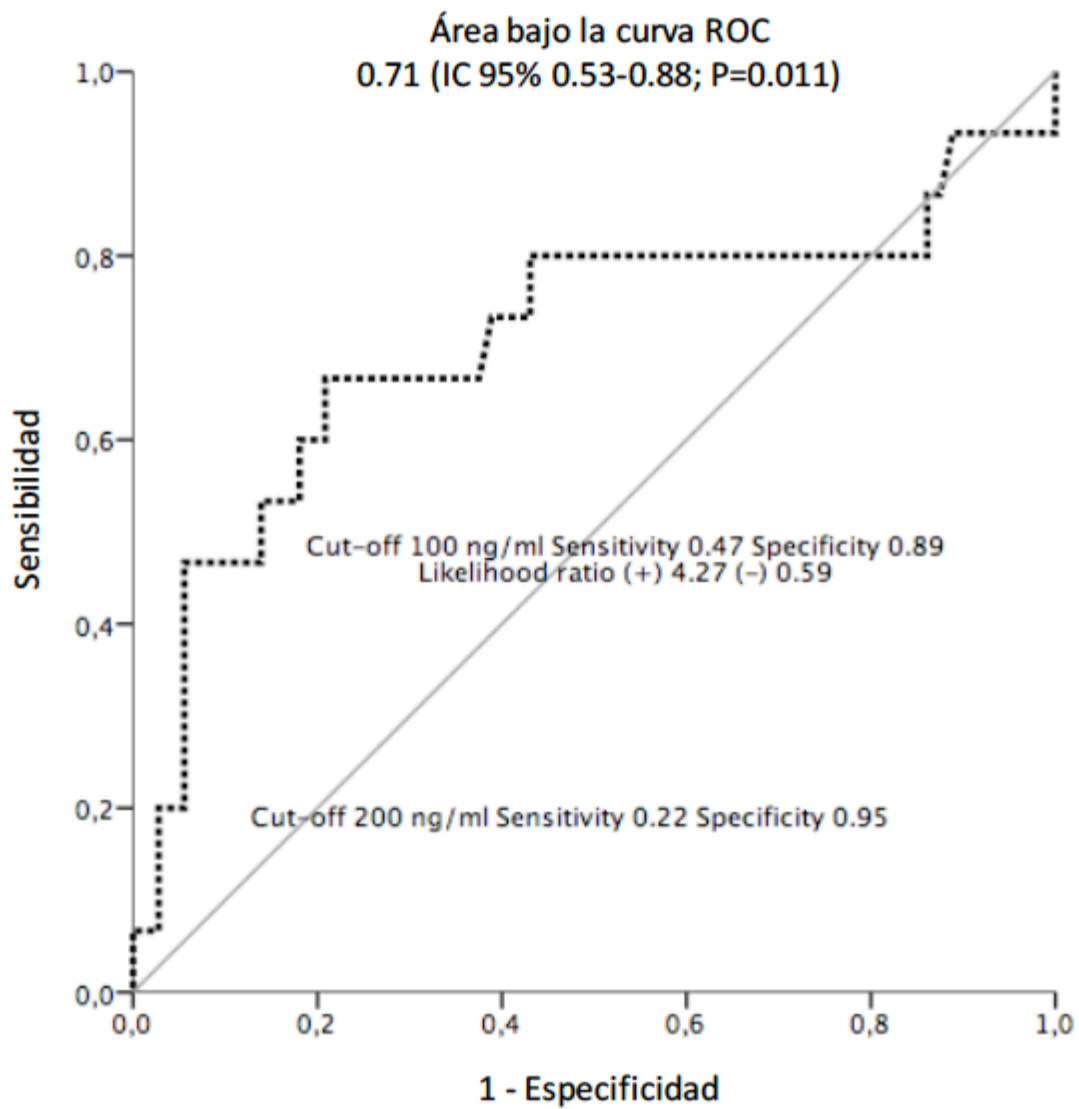
La figura 1 detalla la curva ROC de valores continuos de AFP pre TH y su sensibilidad y especificidad para recurrencia a 5 años. Se identificó un corte específico con un valor >100 ng/ml. Las siguientes variables del explante se asociaron de manera significativa con recurrencia: presencia de MVI HR 3.3 (IC 1.27-8.73; P=0.02) y aquellos tumores excediendo criterios de "Hasta-7" (Tabla 3). Los pacientes con niveles de AFP >100 ng/ml pre TH presentaron mayor frecuencia de MVI (53.3% vs 20.9%; P=0.01) y tumores desdiferenciados (73.3% vs 14.5%; P<.0001), respecto a aquellos con valores inferiores a 100 ng/ml.

En el análisis multivariable de regresión Cox, las variables pre-TH asociadas de manera independiente con recurrencia fueron la AFP >100 ng/ml HR 5.6 (IC 1.86-16.64; P=0.001) y la extensión tumoral por imágenes por fuera de criterios de "Hasta-7" HR 6.3 (IC 1.86-21.78; P=0.001). De este modelo de sobrevida, se evaluó la calibración y discriminación considerando como evento dicotómico la recurrencia a 5 años, ya que la totalidad de los eventos sucedieron dentro de ese lapso post TH. La calibración del modelo fue adecuada entre valores esperados y observados (Hosmer Lemeshow P=0.96) y la validación interna aleatoria mediante bootstrapping evidenció que no hubo sobre adecuación del modelo (Tabla 4).

De este modelo final, se asignaron puntajes de acuerdo a la presencia o ausencia de las variables predictoras: AFP >100 ng/ml (presencia = 1 punto, ausencia = 0 puntos), criterios por imágenes de “Hasta-7” (dentro = 0 puntos, fuera =1 punto) (Tabla 4). El score final tuvo un rango de 0 a 2 puntos, con una curva ROC de 0.74 (IC 0.58-0.88; P=0.003), con un umbral de mejor performance de  $\geq 1$  punto (sensibilidad de 62% y especificidad de 82%), un valor predictivo positivo y negativo de 0.43 y de 0.90, respectivamente, con un índice o coeficiente de positividad (likelihood ratio) de 3.4. La proporción de recurrencia a 5 años se incrementó progresivamente con scores de 0 puntos, 1 punto y 2 puntos: 9.4%, 38.1% y 100%, respectivamente. De este score, se identificó dos poblaciones con distinta recurrencia y supervivencia a 5 años de 9.4% y 78.1% para aquellos de bajo riesgo (0 puntos), y de 44.5% y 34.8% para aquellos de alto riesgo (1-2 puntos), respectivamente (P=0.0001) (Figura 2).

#### 6.4. Figuras y tablas.

Figura 1. Curva ROC de alfa-feto proteína pre trasplante y recurrencia a 5 años.



Nota: El área bajo la curva AUROC de la AFP pre TH fue de 0.74, con un umbral 100 ng/ml (sensibilidad 47%, especificidad 89%) para la discriminación de recurrencia a 5 años post trasplante hepático.

Figura 2. Categorización del riesgo de recurrencia en dos poblaciones de bajo y alto riesgo. Recurrencia (A) y sobrevida a 5 años post trasplante hepático (B).

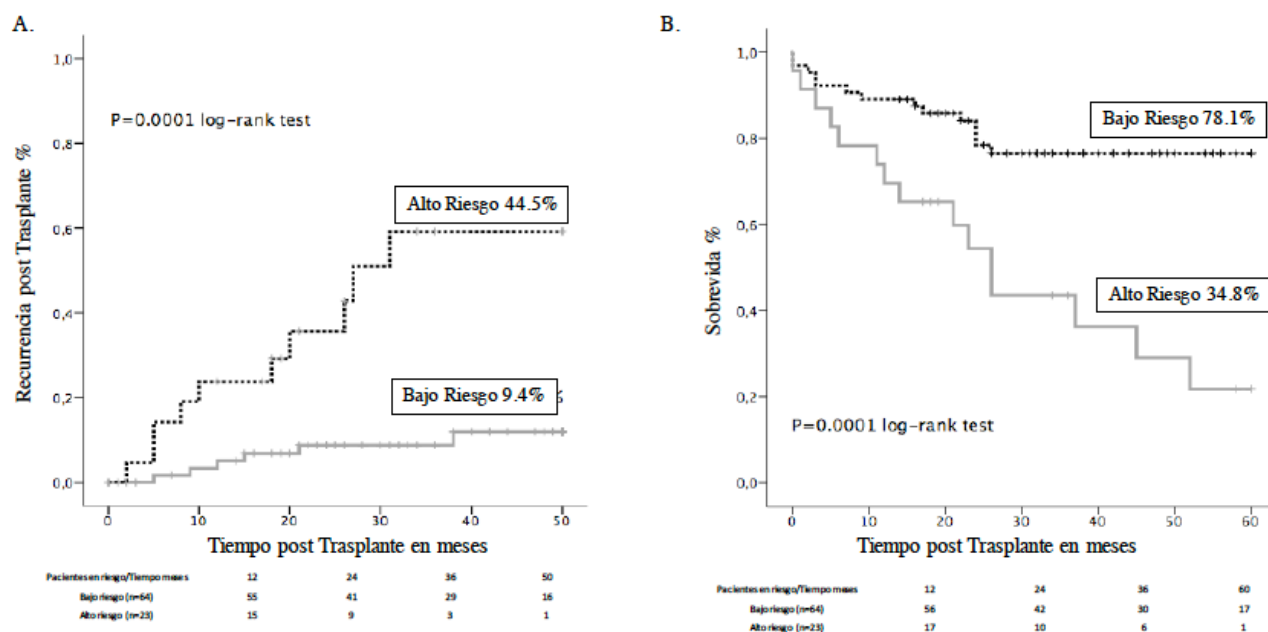


Tabla 1. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.

VARIABLE	Valor
<b>Edad (años),</b> media (± DE)	59 ± 8
<b>MELD,</b> media (± DE)	18 ± 11
<b>Etiología [n (%)]</b>	
Hepatitis C	53 (41.1)
Hepatitis B	15 (11.6)
Alcohol	25 (19.7)
Criptogénica	11 (8.7)
Hígado graso no alcohólico	5 (3.9)
Autoinmune	5 (3.9)
Colestasica**	13 (10.2)
<b>No cirrosis,</b> n (%)	5 (3.8)
<b>Child Pugh A/B/C,</b> n (%)	20 (15.5) / 53 (41.1) / 56 (43.4)
<b>Donante vivo,</b> n (%)	3 (2.3)
<b>AFP ng/ml,</b> mediana (IQR)	8.8 (3.1-41.2)
<b>Tiempo en lista (meses),</b> mediana (IQR)	3.0 (1.0-7.0)
<i>Variables del explante</i>	
<b>Número of nódulos,</b> median (IQR)	2.0 (1.0-3.0)
<b>Nódulo mayor (cm),</b> mean (SD)	3.0 ± 1.6
<b>HCC incidental,</b> n (%)	37 (28.7)
<b>Invasión microvascular,</b> n (%)	31 (25.4)
<b>Diferenciación celular ≥III,</b> n (%)	27 (25.0)

Notas: Valores normales: Alfa-feto proteína 0.6-4.4 ng/ml. \*\*Cirrosis biliar 1ria, colangitis esclerosante 1ria y 2ria. Abreviaciones: AFP: alfa-feto proteína; DE: desvío estándar; IQR: rango intercuartilo; MELD: modelo para enfermedad hepática terminal.

Tabla 2. Comparación de resultados post-trasplante y hallazgos en el explante de acuerdo a criterios de selección por imágenes pre trasplante.

	<b>Milan</b>		<b>P</b>	<b>UCSF</b>		<b>P</b>	<b>Hasta-7</b>		<b>P</b>
	<b>Dentro</b>	<b>Fuera</b>		<b>Dentro</b>	<b>Fuera</b>		<b>Dentro</b>	<b>Fuera</b>	
	<b>(n=70)</b>	<b>(n=17)</b>		<b>(n=76)</b>	<b>(n=11)</b>		<b>(n=77)</b>	<b>(n=9)</b>	
<b>Sobrevida a 5 años,</b> n (%)	49 (70)	8 (45.5)	0.06	54 (71.1)	3 (30)	0.01	54 (70.1)	3 (33.3)	0.03
<b>Recurrencia a 5</b> <b>años, n (%)</b>	11 (15.7)	6 (35.3)	0.09	11 (14.5)	5 (45.5)	0.01	11 (14.3)	5 (55.6)	0.01
<b>MVI, n (%)</b> <sup>^</sup>	16 (22.8)	8 (45.5)	0.04	18 (23.6)	6 (60)	0.03	19 (24.6)	5 (55.5)	0.07
<b>Desdiferencia-ción,</b> n (%) <sup>^</sup>	13 (18.6)	6 (35.3)	0.20	14 (18.4)	5 (45.5)	0.08	15 (19.5)	4 (44.4)	0.17

Notas: <sup>^</sup>Variables del explante. MVI: invasión microvascular.

Tabla 3. Análisis Univariado de regresión Cox con el evento primario (recurrencia).

<b>VARIABLE</b>	<b>Recurrencia</b>	<b>No</b>	<b>Hazard Ratio</b>	<b>P</b>
	<b>(n=16)</b>	<b>Recurrencia</b>	<b>(95% CI)</b>	
		<b>(n=71)</b>		
<b>Tiempo en lista ≤3 meses, n</b> <b>(%)*</b>	16 (100)	48 (67.6)	1.33 (1.16-1.54)	0.005
<b>AFP &gt;100 ng/ml, n (%)</b> <sup>*</sup>	7 (46.7)	8 (11.6)	7.0 (2.46-20.05)	0.0001
<b>Tratamiento puente, n (%)</b> <sup>*</sup>	7 (53.8)	33 (48.5)	1.2 (0.37-4.06)	0.77
<b>Milan dentro/fuera, n (%)</b> <sup>*</sup>	11/6 (68.8/31.2)	59/11 (84.3/15.7)	1.98 (0.80-4.92)	0.11
<b>UCSF dentro/fuera, n (%)</b> <sup>*</sup>	11/6 (68.8/31.2)	65/6 (92.9/7.1)	3.9 (1.37-11.58)	0.01
<b>Hasta-7 dentro/fuera, n (%)</b> <sup>*</sup>	11/6 (68.8/31.2)	66/5 (93.0/7.0)	4.4 (1.51-12.62)	0.006
<b>MVI, n (%)</b> <sup>^</sup>	8 (50.0)	16 (23.2)	3.3 (1.27-8.73)	0.02
<b>Desdiferenciación, n (%)</b> <sup>^</sup>	6 (46.2)	14 (23.3)	2.6 (0.96-6.96)	0.09
<b>Milan dentro/fuera, n (%)</b> <sup>^</sup>	7/9 (43.8/56.2)	47/24 (66.2/33.8)	2.6 (0.96-6.96)	0.06
<b>UCSF dentro/fuera, n (%)</b> <sup>^</sup>	7/9 (43.8/56.2)	55/16 (77.5/22.5)	3.5 (1.31-9.54)	0.01
<b>Up-to 7 dentro/fuera, n (%)</b> <sup>^</sup>	8/8 (50/50)	58/12 (82.9/17.1)	3.4 (1.28-9.28)	0.01

Notas: Valores normales: Alfa-feto proteína 0.6-4.4 ng/ml, \*Pre-trasplante.

<sup>^</sup>Variables del explante. Abreviaciones: AFP: Alfa-feto proteína, MVI: invasión microvascular. UCSF: Universidad de California, San Francisco.

Tabla 4. Análisis Multiivariado de regresión Cox con el evento primario (recurrencia).

VARIABLE	Coef. $\beta$	HR (CI 95%)	Bootstrapping IC 95%	P	Puntos asignados
AFP >100 ng/ml	2.11	5.6 (1.86-16.64)	2.61-36.42	0.001	Presencia=1 Ausencia=0
Fuera de "Hasta-7" <sup>a</sup>	1.66	6.3 (1.86-21.78)	1.45-16.71	0.001	Presencia=1 Ausencia=0

Notas: <sup>a</sup> Por imágenes pre-trasplante.

### 6.5. Discusión.

Este es el primer trabajo publicado reportando resultados de una cohorte multicéntrica Argentina, acerca de la sobrevida y recurrencia post TH de pacientes con HCC. En el presente análisis, hemos evaluado factores pre y post TH asociados con riesgo de recurrencia del HCC luego del trasplante y propuesto un score de categorización del riesgo de recurrencia a 5 años. Por otro lado, hemos evaluado la utilidad de los criterios de "Hasta-7" en imágenes pre trasplante junto con la combinación del biomarcador AFP pre trasplante hepático. La combinación de un valor de AFP >100 ng/ml o tumores extendidos por fuera de los criterios de "Hasta-7" identificaron una población con alto riesgo de recurrencia y menor sobrevida a 5 años post TH. Este score podría ser propuesto, si validado de manera externa y en una cohorte de mayor poder muestral, como criterio de selección para trasplante hepático.

Desde hace más de 20 años, los criterios de Milán se han propuesto como estándares de selección para trasplante hepático en pacientes con HCC (6). Sin embargo, los criterios de Milán, contemplando límites tumorales estrictos, podrían excluir aquellos candidatos fuera de Milán pero con adecuados resultados post TH en cuanto a recurrencia y sobrevida. En efecto, aún en



pacientes dentro de Milán, la recurrencia post TH sucede en alrededor del 15-20% de los pacientes y por otro lado, existen pacientes fuera de Milán con excelente pronóstico.

Otros autores han propuesto extender los criterios de Milán, únicamente utilizando límites en cuanto a número y diámetro tumoral, siendo imperfectos y muchas veces, asociados a un incremento del riesgo de recurrencia respecto a aquellos pacientes dentro de Milán (15). Los criterios de "Hasta-7" se han desarrollado del análisis de explantes de pacientes tanto dentro como fuera de Milán de una cohorte multicéntrica mundial retrospectiva (18). Es necesario entonces, optimizar los criterios de elegibilidad para TH, incluyendo biomarcadores.

Consideramos en este análisis, los criterios de "Hasta-7" aplicándolos en imágenes pre-TH y no teniendo en cuenta la presencia de MVI (reportada en el modelo original de Mazzaferro V en el Metroticket). Evaluar la presencia de MVI o desdiferenciación nuclear histológicas mediante una toma de muestra de biopsia en el pre TH muchas veces resulta riesgoso para el paciente, con el riesgo de sangrado tumoral y siembra tumoral (53). Este evento podría desencadenar la exclusión del trasplante hepático y por otro lado, el diagnóstico por imágenes del HCC es elevadamente específico, en presencia de signos patognomónicos como refuerzo del contraste en fase arterial y lavado del mismo en fase portal o tardía (estudios dinámicos sea TAC o RNM)(50). Por lo tanto, la biopsia pre TH en pacientes con HCC no es requisito ni para su confirmación diagnóstica ni como elegibilidad para el TH.

En nuestro trabajo, hubo un 5% de pacientes con resultados falsos positivos de imágenes pre TH cuando se los comparó con el hallazgo del análisis histológico del explante y por otro lado, casi un 30% de los pacientes que estaban

catalogados como dentro de Milán, finalmente se encontraron por fuera de dichos criterios en el explante. Esto reafirma la especificidad en cuanto al diagnóstico por imágenes del HCC pero subraya la necesidad de optimizar la categorización imagenológica. Esta discordancia también ha sido observada en otras series de otras regiones a nivel mundial (24,53).

Tanto los criterios de "Hasta-7" como otros desarrollados con variables del explante (54-56), no han incluido la AFP como variable pronóstica. La AFP pre-TH es un biomarcador que se ha asociado con peor pronóstico en distintos escenarios de la historia natural de pacientes con HCC y el trasplante no es una excepción. En efecto, se ha asociado a mayor riesgo de recurrencia y menor sobrevida post TH, tanto como variable continua como con distintos valores umbrales de corte (19,22,39,57). Recientemente, se han propuesto valores incluso inferiores a 66 ng/ml (58), superiores a 1000 ng/ml (21), o incluso cambios dinámicos en lista de trasplante hepático (59). Consecuentemente, no hay consenso en el corte o umbral específico adecuado para su utilidad como de elegibilidad para TH. En nuestra cohorte, observamos que valores superiores a 100 ng/ml se asociaron con menor sobrevida y mayor recurrencia post TH y además, se asociaron con variables de riesgo del explante como la presencia de MVI o tumores desdiferenciados.

Desarrollamos un score pronóstico incluyendo la AFP >100 ng/ml como marcador biológico y aplicamos los criterios de "Hasta-7" en imágenes pre TH, desarrollados en un modelo de explantes y anteriormente no aplicados en imágenes. El poder de discriminación del score pronóstico propuesto utilizando la presencia o ausencia de estas dos variables fue adecuado para discriminar riesgo de recurrencia a 5 años (curva ROC 0.74), con un umbral en  $\geq 1$  punto (moderadamente sensible y adecuadamente específico). Este umbral permitió

distinguir dos poblaciones con distinto riesgo de recurrencia y menor sobrevida a 5 años post TH. Consecuentemente, en aquellos pacientes fuera de Milán, el límite dentro de "Hasta-7", junto con un valor de AFP inferior a 100 ng/ml, permitiría identificar pacientes fuera de criterios estándares pero con pronóstico comparable a aquellos dentro de criterios de Milán, ampliando y optimizando así la elegibilidad para el TH.

#### **6.6. Limitaciones.**

Limitaciones de nuestro estudio, comunes a estudios observacionales retrospectivos incluyen entre otros, sesgos de selección y de información. En primer lugar, el tamaño muestral podría haber sido insuficiente para demostrar diferencias estadísticas significativas entre comparación de distintos modelos pronósticos y de elegibilidad para TH. En segundo lugar, no hubo una revisión centralizada de las imágenes, esto hubiese sido difícilmente realizable o no factible. Tercero, la evaluación de calibración y poder de discriminación del modelo no fue contemplada en su modelo original planteando la dinámica de los eventos en el tiempo, ni se contemplaron eventos competitivos respecto al evento primario (en este caso, muerte previo al desarrollo de recurrencia).

#### **6.7. Conclusiones de este capítulo.**

La incorporación de la AFP en modelos de selección es factible y optimiza la selección de candidatos a trasplante hepático, aun extendiendo criterios fuera de Milán. La combinación de los criterios de "Hasta-7" y valores de AFP menor a 100 ng/ml podrían ser útiles en la evaluación y categorización del riesgo de recurrencia a 5 años, optimizando así la selección de candidatos a trasplante. Este ha sido la primer exploración de la combinación del modelo de "Hasta-7"

junto con valores de AFP. Sin embargo, limitaciones en cuanto al tamaño muestral y a la performance de dicho modelo propuesto requieren de validación externa.

## **7. Capítulo 2. Evaluación de un modelo de selección compuesto, el modelo de selección Francés, en la primer cohorte multicéntrica Latinoamericana (2005-2011) y luego expandido a una segunda cohorte Latinoamericana (2012-2018).**

En esta etapa nos focalizamos en responder la siguiente pregunta de investigación:

a)-En pacientes que recibieron un trasplante hepático por hepatocarcinoma en Latino América, ¿el modelo de AFP o francés discrimina adecuadamente el riesgo de recurrencia?

### **7.1. Objetivos.**

Nuestro objetivo por lo tanto, fue la evaluación del modelo de selección de AFP en una cohorte multicéntrica Latinoamericana.

### **7.2. Pacientes y métodos.**

*Diseño y centros participantes.*

Este estudio se realizó analizando una primer cohorte multicéntrica retrospectiva Latinoamericana de pacientes adultos (>17 años) trasplantados de hígado de manera consecutiva entre el 1ero de Junio del 2005 y el 31 de Diciembre del 2011, en 15 centros de TH de la región. Posteriormente, se expandió el tamaño muestral invitando a mayor número de investigadores de otros centros en una segunda cohorte, reportándose resultados expandidos (2005-2018), ver punto 6.8.

Cada centro participante designó un investigador responsable-coordinador para la recolección y registro de datos. Se realizó una revisión centralizada de todos los datos registrados y en casos de datos discordantes o faltantes, se

solicitó la revisión de los mismos. Se definió centros de TH de alto volumen a aquellos con más de 30 trasplantes por año.

*Características de la cohorte, registro de datos y definición de variables de exposición.*

Se incluyeron sujetos adultos, con o sin cirrosis, trasplantados de hígado con hepatocarcinoma confirmado en el explante. Se excluyeron pacientes con 1) HCC incidental en el explante, 2) aquellos con invasión vascular o extrahepática en la evaluación por imágenes pre trasplante hepático.

Se registraron datos demográficos, tumorales por imágenes y de AFP al enrolamiento en lista de espera. Los valores de AFP se registraron como variable continua y luego se categorizaron de acuerdo a aquellos estratos propuestos por Duvoux y col ( $\leq 100$ , 101-1000 y  $> 1000$  ng/ml)(22). Todos los tumores se clasificaron de acuerdo a los criterios de Milán y al modelo de AFP, dependiendo del tamaño del nódulo mayor y el número de nódulos detectados en TAC o RNM. El score de AFP o Francés (0 a 9 puntos) fue calculado dependiendo de: número de nódulos ( $\leq 3$  cm = 0 puntos, 3-6 cm = 1 punto,  $> 6$  cm = 4 puntos), número de nódulos de HCC (1-3 nódulos = 0 puntos,  $\geq 4$  nódulos = 2 puntos) y niveles de AFP ng/ml ( $\leq 100$  = 0 puntos, 101-1000 = 2 puntos, y  $> 1000$  = 3 puntos)(22). Los criterios de selección estándar en todos los centros fueron los criterios de Milán; el TH en pacientes excediendo los límites de Milán fue decidido de manera local en cada centro de trasplante.

Se registraron todos los tratamientos locorregionales realizados como *punteo* al trasplante, a saber: TACE, RFA, PEI y resección quirúrgica. En aquellos pacientes que recibieron tratamiento puente, se registraron además de los datos de imágenes y AFP al enrolamiento en lista, los datos tumorales pareados con AFP

a la re evaluación tumoral luego de éstos tratamientos. En pacientes que excediendo criterios de Milán recibieron tratamiento locorregional con la intención de reducir su estadio hacia Milán, se los definió como “reducción o *downstaging*”.

Los datos del análisis del explante recolectados incluyeron la evaluación macro y microscópica de los mismos, número y diámetro (cm) de cada nódulo, la presencia de invasión microvascular, y el grado de diferenciación nuclear de acuerdo al sistema de Edmonson y Steiner (51,60). Los nódulos con el mayor diámetro fueron catalogados como el nódulo mayor. Los nódulos con presencia de necrosis fueron medidos incluyendo la porción viable y necrótica.

#### *Eventos de interés, primario y secundarios.*

El evento primario fue la recurrencia de HCC post trasplante. El seguimiento post-TH para el monitoreo de la recurrencia del HCC consistió en una TAC o RMN, centellograma óseo corporal total y niveles de AFP cada 6 meses durante los primeros 3 años post TH en todos los pacientes de los centros participantes, acorde a recomendaciones internacionales (61). El diagnóstico de la recurrencia del HCC en el post TH fue determinada en función de imágenes y niveles de AFP o de su confirmación histológica. El tiempo a la recurrencia (TTR) fue aquel lapso de tiempo transcurrido desde el trasplante al diagnóstico de la recurrencia. La supervivencia global desde el TH fue el evento secundario.

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las guías para estudios observacionales (STROBE)(52). Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Evaluación (CIE) de la Universidad Austral, facultad de Ciencias Biomédicas y por cada comité institucional de cada centro de TH, siguiendo los estándares éticos nacionales e internacionales y la declaración de Helsinki,

revisada en el 2008. La cohorte global (2005-2018) fue registrada como parte un estudio observacional en [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03775863) (NCT03775863).

#### *Análisis estadístico.*

Los datos categóricos se compararon usando test exacto de Fisher o Chi-cuadrado. Las variables continuas se compararon mediante test de T-Student o Mann-Whitney U, de acuerdo a su distribución. Se compararon curvas de supervivencia mediante método de Kaplan-Meier utilizando test de log-rank. Usando un análisis de regresión Cox con cálculo de Hazard Ratios (HR) y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC), se evaluaron variables asociadas con el evento primario. Variables con un valor de P en el análisis univariado  $<.05$  fueron incluidas en el análisis multivariable, generado mediante la inclusión de variables paso a paso, evaluando el test de Wald. La asunción del modelo de riesgos proporcionales se evaluó de manera gráfica y mediante el test de Schoenfeld. El poder de discriminación del modelo se evaluó mediante el cálculo de la concordancia estadística (Harrell c-statistic). Se calculó la mejora neta de reclasificación (NRI) para recurrencia del modelo de AFP, tanto para pacientes dentro como fuera de Milán. El NRI se focaliza en tablas de reclasificación separadamente para pacientes con y sin el evento de interés, y cuantifica el movimiento correcto separadamente entre categorías (define eventos "hacia arriba" o sin eventos "hacia abajo"). Cualquier movimiento "hacia arriba" de una categoría implica la mejora en la clasificación en cada sujeto y cada movimiento "hacia abajo" implica un empeoramiento de reclasificación (62). Finalmente, se realizó un análisis de sensibilidad de acuerdo a factor etiológico del HCC. Todos los datos fueron analizados usando el paquete SPSS v20.0 y STATA 10.0.



### **7.3. Resultados I: cohorte Latinoamericana 2005-2011.**

#### *Características de la población.*

De un total de 2018 pacientes trasplantados de manera consecutiva en 15 centros de trasplante durante el periodo del estudio, se incluyeron 327 de 422 con HCC. Dentro de la población excluida, 77 presentaron HCC incidental y 18 presentaron otro diagnóstico en el explante: 15 nódulos de regeneración, 1 hamartoma biliar y 2 colangiocarcinoma. La proporción de centros participantes y número de pacientes incluidos en por país fue: 5 programas de trasplante de Argentina (n=98, 30.0%), 1 de Brasil (n=90, 27.5%), 2 de Colombia (n=65, 19.9%), 4 de Chile (n=49, 15.0%), y 1 centro de Perú (n=11, 3.4%), Uruguay (n=9, 2.8%) y México (n=5, 1.5%). De los 15 centros involucrados, 6 fueron de bajo volumen de trasplantes/año.

Los pacientes de Argentina, Brasil, Uruguay, Perú y Chile podían recibir puntaje suplementario de MELD, de acuerdo a sus políticas nacionales. Globalmente, 56.6% (n=185) de los pacientes recibieron puntaje suplementario de MELD para la asignación prioritaria de órganos. La mediana de tiempo en lista de espera fue de 7.2 meses (IQR 1.0-9.0 meses). La etiología más frecuente fue la HBV (Tabla 1). Los tratamientos locorregionales como puente al trasplante se realizaron en un 47.4% (n=155) de la cohorte. Antes del enrolamiento en lista, 71 procedimientos se realizaron en 63 pacientes: 36 TACEs, 19 RFAs, 5 PEIs y 11 resecciones hepáticas. Durante el tiempo en lista de espera, 110 pacientes fueron tratados (TACE n=85, RFA n=19, PEI n=5 y resección hepática n=3). La reducción de estadio o "downstaging" fue realizada con éxito en 13 de 31 pacientes.

En los hallazgos anátomo-patológicos del explante, 61.8% (n=202) de los pacientes estaban dentro de criterios de Milán. La invasión microvascular se observó en 23.8% (n=77) y 22.9% (n=75) presentaron tumores desdiferenciados. La presencia de necrosis parcial o completa en el nódulo mayor se observó en un 22.9% (n=75) y 9.2% (n=30) de la cohorte. En todos los pacientes incluidos el HCC se confirmó en focos viables. Valores de AFP pre TH superiores a 1000 ng/ml se asociaron con mayor frecuencia de invasión microvascular, tumores desdiferenciados (material suplementario) y mayor recurrencia luego del trasplante hepático (Figura 1).

La inmunosupresión inicial más frecuentemente utilizada fue el Tac (58.3%), MMF (69.6%) y esteroides (98.7%). El uso de corticoides fue disminuyendo entre el tercer mes y los dos años luego del TH de un 85.7% a un 18.4%. Al tercer mes post TH, 5.9% (n=16) de los pacientes se encontraban recibiendo inhibidores mTOR, incrementándose luego a 19.8% (n=42) a los 2 años post trasplante.

#### *Criterios de Milán y modelo Francés al enrolamiento en lista de espera.*

Al enrolamiento en lista de espera, el 82.3% (n=269) y el 79.1% (n=257) de la cohorte se encontraba dentro de criterios de Milán y del modelo de AFP ( $\leq 2$  puntos), respectivamente. De acuerdo a los umbrales de valor de AFP propuestos por Duvoux y col, el 74.6% tenía AFP  $\leq 100$  ng/ml (n=244), 18.7% entre 101 y 1000 ng/ml (n=61) y 5.5%  $> 1000$  ng/ml (n=18). En 4 pacientes no hubo datos de AFP al enrolamiento en lista, de todas maneras, 2 pacientes presentaban un score  $> 2$  puntos de acuerdo a límites tumorales por imágenes. En los pacientes dentro de Milán, 89% y 11% presentaron un score de AFP de  $\leq 2$  y  $> 2$  puntos; mientras que en aquellos fuera de Milán, 33.3% y 66.7% tenían scores de AFP  $\leq 2$  y  $> 2$  puntos, respectivamente. La proporción de pacientes fuera de Milán fue

superior en los centros de bajo versus aquellos de alto volumen de trasplante (31.6% vs 15.9%; P=0.02), y hubo mayor proporción de pacientes con score de AFP >2 puntos (26.3% vs 19.9%; P=0.23).

#### *Análisis de recurrencia y sobrevida.*

La mediana de seguimiento post TH en toda la cohorte fue de 45 meses (IQR 30.0-66.0 meses). La sobrevida y recurrencia global a 1, 3 y 5 años post TH fue de 76.8%, 64.8% y 62.7% (n=122 fallecimientos) y de 7.3%, 12.8% y 15.0% (n=49 recurrencias), respectivamente. La principal causa de muerte fue la recurrencia del HCC (n=39), seguida de sepsis (n=30). La mediana de TTR fue de 13.0 meses (IQR 6.0-28.0 meses); en 24 pacientes (48.9%) la recurrencia ocurrió dentro del primer año post TH. La mediana de sobrevida luego del diagnóstico de la recurrencia fue 12.0 meses (IQR 5.0-26.0 meses).

Si bien no hubo diferencias significativas, los centros de bajo volumen presentaron mayor incidencia de recurrencia a 5 años post TH comparado con aquellos centros de alto volumen (23.7% vs 13.8%; HR 1.73, IC 0.84-3.57; P=0.13). En la tabla 2 se detalla las variables asociadas con recurrencia post TH analizadas mediante el análisis de regresión Cox.

#### *Comparación del poder de discriminación del modelo de AFP y los criterios de Milán.*

La tabla 3 compara las características de los pacientes con scores de AFP menor o igual a 2 puntos y aquellos con un score superior a 2 puntos. El umbral o corte dicotómico propuesto por Duvoux y col discriminó adecuadamente dos poblaciones con alto y bajo riesgo de recurrencia a 5 años para un score >2 versus ≤2 de puntos [30.1% vs 10.1% con un HR de 3.15 (IC 1.77-5.61; P=0.0001)].

Adicionalmente, la supervivencia a 5 años fue significativamente inferior en aquellos con scores de AFP >2 puntos: 48.5% vs 66.1%, HR de 1.51 (IC 1.02-2.23; P=0.03) (Figura 2, Paneles A-D).

En los pacientes que excedían los criterios de Milán, la recurrencia a 5 años fue mayor en aquellos con un score de AFP >2 puntos respecto a aquellos con un score  $\leq$ 2 puntos (42.1% vs 5.3%; P=0.013). Por otro lado, la supervivencia a 5 años fue significativamente superior [84.2% vs 44.7% (HR 8.38, IC 1.11-63.49; P=0.038)]. Respecto a pacientes dentro de Milán, si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas, se observó una mayor incidencia numérica de recurrencia a 5 años en aquellos con un puntaje de >2 respecto a aquellos con un score  $\leq$ 2 puntos [16.7% vs 10.5% (HR 1.68, IC 0.64-4.41; P=0.32)] (Figura 3, Paneles A-D). Finalmente, no se observó por otro lado, diferencias significativas en recurrencia (11.5% vs 5.3%; P=0.41) y supervivencia a 5 años (63.6% vs 84.2%; P=0.13) entre pacientes tanto dentro como fuera de Milán con un score de AFP  $\leq$ 2 puntos, respectivamente.

La mejora de reclasificación (NET) entre los criterios de Milán y el modelo de AFP fue 0.06 (P=0.01), indicando que la predicción global de recurrencia fue superior en el modelo de AFP respecto a los criterios de Milán (material suplementario).

#### *Análisis en pacientes con terapia locorregional puente al trasplante hepático.*

De 155 pacientes que recibieron terapia puente, en 90 se pudo realizar una segunda re-valoración por imágenes y de AFP previo al TH. El enrolamiento en lista, 73.3% (n=66) de estos pacientes estaban dentro de Milán y 70.8% (n=63) presentaban un score de AFP  $\leq$ 2 puntos. A la re-evaluación tumoral, 78.9% (n=71) y 76.4% (n=68) estaban dentro de Milán y con un score de AFP  $\leq$ 2 puntos, respectivamente. La mediana de tiempo desde la última evaluación

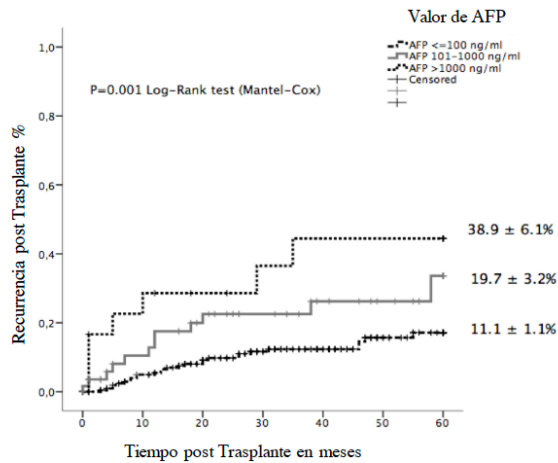
radiológica al trasplante hepático fue 1.0 meses (IQR 0.3-4.0 meses). Luego de la re-evaluación, aquellos pacientes con un score de AFP >2 puntos (n=22) presentaron mayor riesgo de recurrencia (HR 2.2, IC 0.77-6.12; P=0.12) y menor supervivencia post trasplante (HR 2.25, IC 1.07-4.71; P=0.03) comparados con aquellos con un score  $\leq$ 2 puntos (n=68).

#### *Análisis de sensibilidad: factor etiológico.*

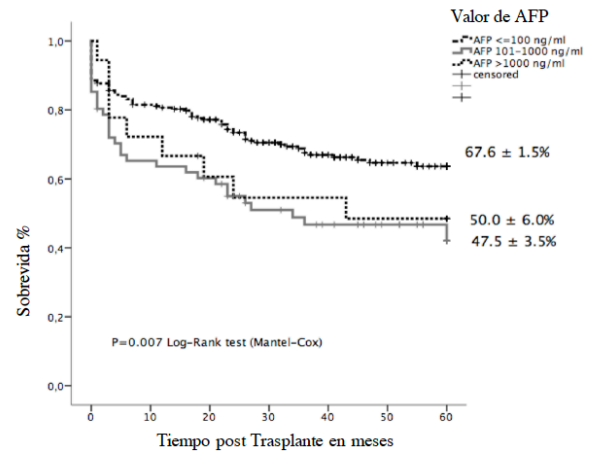
La tabla 4 demuestra un análisis comparativo de acuerdo a etiología por HBV (n=94) versus no-HBV (n=233). De manera interesante, el modelo de AFP discriminó adecuadamente el riesgo de recurrencia en la población no-HBV (Figura 4, Paneles A and B). En este grupo de pacientes, un score de AFP >2 puntos presentó menor recurrencia comparando con aquellos con un score  $\leq$ 2 puntos [8.8% vs 31.2% (HR 5.27, IC 1.91-14.55; P=0.001)]; sucediendo lo mismo considerando aquellos pacientes dentro (n=187) o fuera de Milán (n=46), cuya recurrencia a 5 años fue de 8.8% vs 31.2% (HR 5.27, IC 1.91-14.54; P=0.001) y de 6.2% vs 50.0% (HR 8.62, IC 1.13-65.68; P=0.038), si presentaban scores de AFP  $\leq$ 2 ó >2 puntos, respectivamente.

#### **7.4. Figuras y tablas cohorte Latinoamericana 2005-2011.**

Figura 1. Recurrencia del hepatocarcinoma (A) y supervivencia global (B) post trasplante de acuerdo a valores de AFP al enrolamiento en lista de espera.



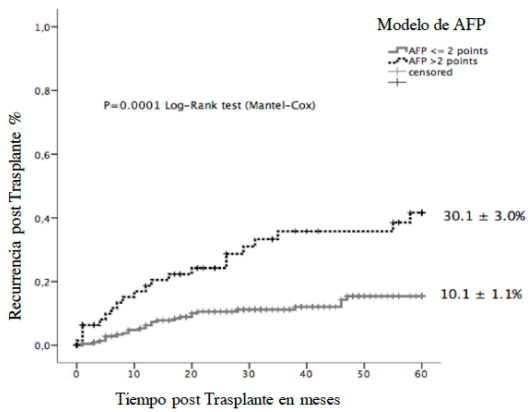
Pacientes en riesgo/meses	12	36	60
AFP ≤100 ng/L (n=244)	184	109	49
AFP 100-1000 ng/L (n=61)	36	21	12
AFP >1000 ng/L (n=18)	11	7	6



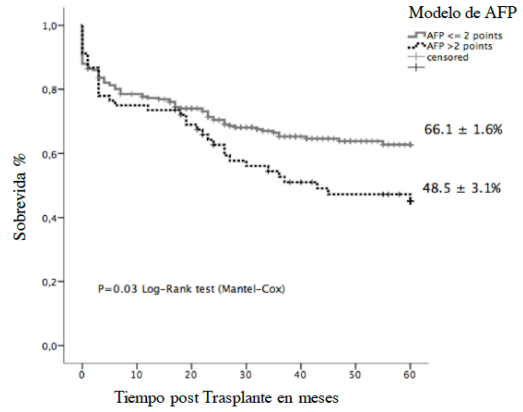
Pacientes en riesgo/meses	12	36	60
AFP ≤100 ng/L (n=244)	191	114	53
AFP 100-1000 ng/L (n=61)	39	22	12
AFP >1000 ng/L (n=18)	12	9	7

Figura 2. Recurrencia del hepatocarcinoma y supervivencia global post trasplante de acuerdo al score de AFP (A-B) o a los criterios de Milán (C-D) al enrolamiento en lista de espera.

A-B



Pacientes en riesgo/meses	12	36	60
French ≤2 (n=257)	187	112	47
French >2 (n=68)	45	26	21



Pacientes en riesgo/meses	12	36	60
French ≤2 (n=257)	192	114	49
French >2 (n=68)	50	30	21

C-D

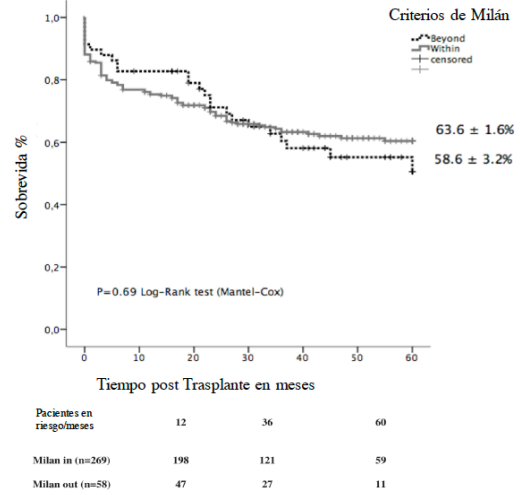
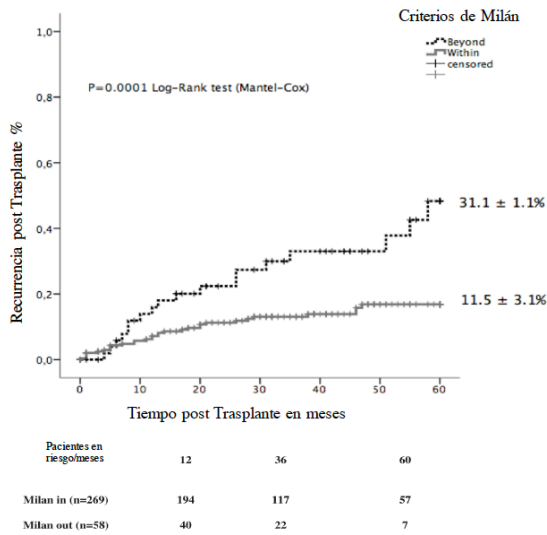
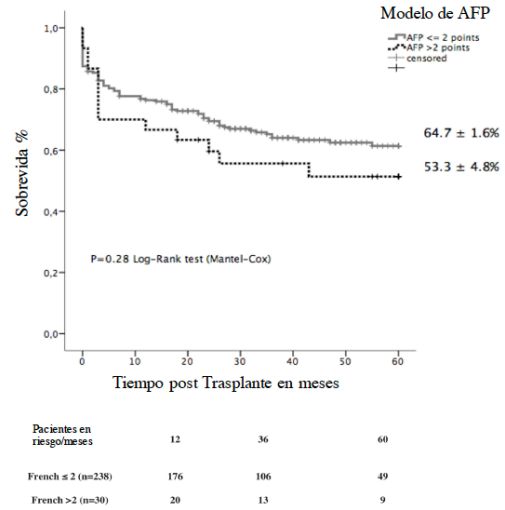
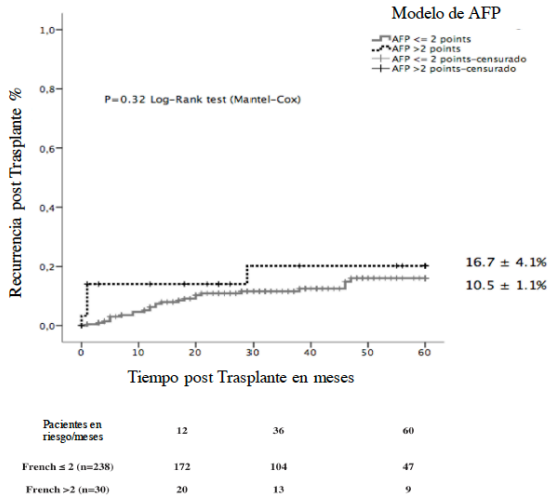


Figura 3. Recurrencia del hepatocarcinoma y supervivencia global post trasplante de acuerdo al score de AFP en pacientes dentro (A-B) o fuera de criterios de Milán (C-D) al enrolamiento en lista de espera.

A-B



C-D

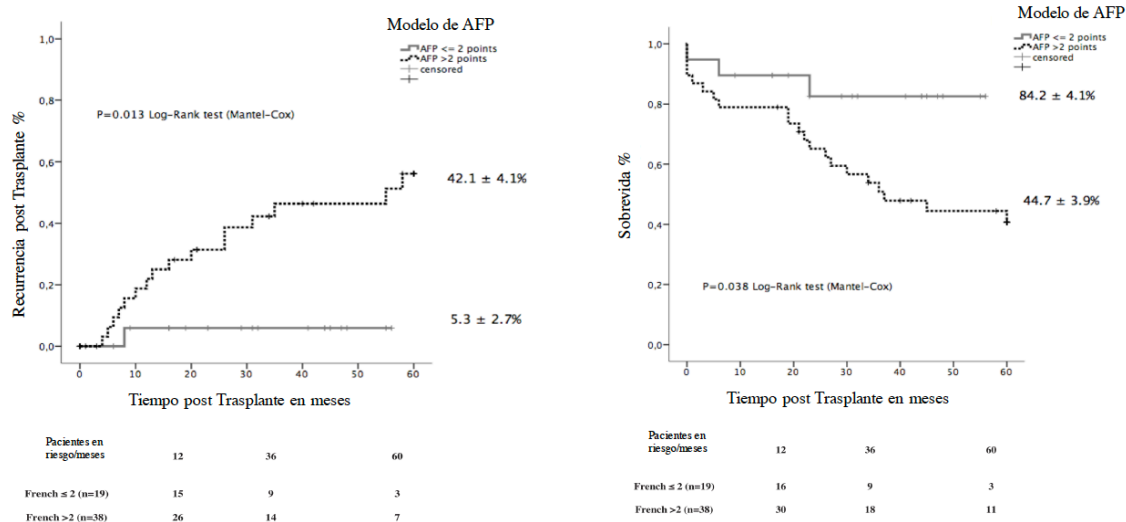


Figura 4. Recurrencia del hepatocarcinoma post trasplante de acuerdo al score de AFP en pacientes no-HBV (A-B) al enrolamiento en lista de espera.

A-B

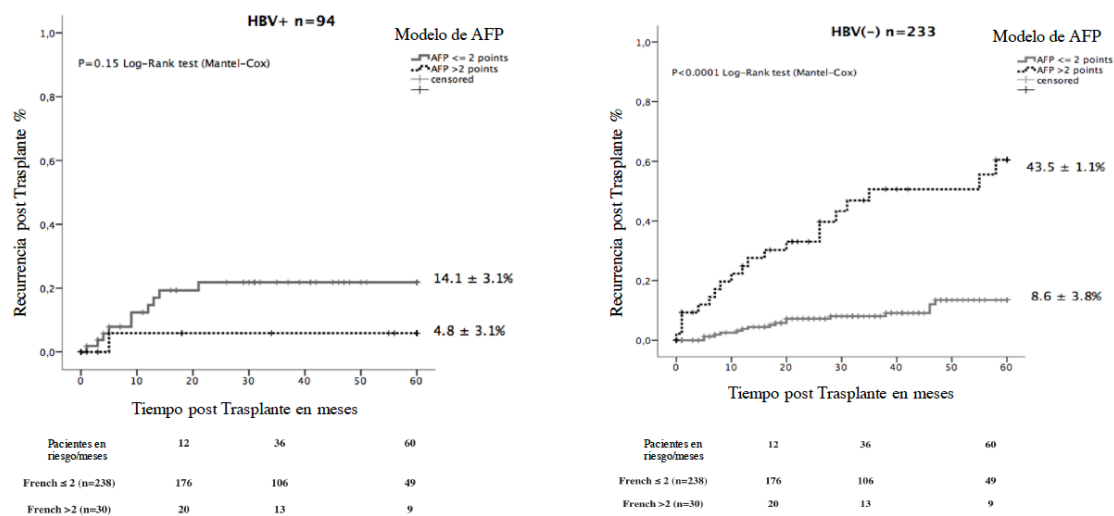


Tabla 1. Características basales al enrolamiento en lista de espera.

VARIABLE	Valor
Edad, años (± DE)	57 ± 8
Sexo masculino, n (%)	267 (81.7)
Tiempo en lista de espera, (IQR), meses	7.0 (1.0-9.0)
MELD suplementario, n (%)	185 (56.6)
No cirrosis, n (%)	6 (1.8)
Child Pugh A/B/C, n (%)	114 (35.5)/130 (40.5)/77 (24.0)
Etiología asociada, n (%)	
Hepatitis B	94 (28.7)



<b>Hepatitis C</b>	89 (27.2)
<b>Hepatitis B y C virus</b>	3 (0.9)
<b>Alcohol</b>	58 (17.7)
<b>Hígado graso</b>	25 (7.6)
<b>Criptogenica</b>	24 (7.3)
<b>Colestásica**</b>	13 (3.9)
<b>Autoinmune</b>	9 (2.7)
<b>Hemocromatosis</b>	6 (1.8)
<b>Otras</b>	9 (2.7)
<b>Donante vivo, n (%)</b>	3 (0.9)
<b>Número de nódulos, (± SD)</b>	1.5 ± 0.9
<b>Diámetro del nódulo mayor, cm, (± SD)</b>	3.3 ± 1.3
<b>AFP al enrolamiento en lista, ng/mL, median (IQR)</b>	14.4 (4.6-96.0)

**Abreviaciones:** DE: desvío estándar; MELD: Modelo de Enfermedad Hepática Terminal; \*\*Colestásica: colangitis esclerosante 1ra o 2da y colangitis biliar 1ra.

Tabla 2. Variables asociadas con recurrencia de HCC post trasplante. Regresión Cox.

<b>VARIABLE</b>	<b>Hazard Ratio Crudo (95% IC)</b>	<b>P</b>	<b>Hazard Ratio Ajustado (95% IC)</b>	<b>P</b>
<b>Tiempo en lista &lt;3 meses,</b>				
<b>Yes (n=203)</b>	0.98 (0.55-1.77)	0.97		
<b>No (n=121)</b>				
<b>Etiología</b>				
<b>Hepatitis C virus (n=92)</b>	1.03 (0.56-1.89)	0.91		
<b>Hepatitis B virus (n=94)</b>	1.06 (0.56-2.01)	0.84		
<b>Tratamiento puente</b>				
<b>Yes (n=155)</b>	1.74 (0.98-3.09)	0.08		
<b>No (n=172)</b>				
<b>Criterios de Milán</b>				
<b>Dentro (n=269)</b>	0.36 (0.21-0.66)	0.001		
<b>Fuera (n=58)</b>				
<b>Número de tumores</b>				
<b>1-3 nódulos (n=314)</b>	4.60 (3.06-10.28)	0.000	1.85 (1.19-2.87)	0.006
<b>≥4 nódulos (n=13)</b>		1		
<b>Diámetro del nódulo mayor, cm</b>				
<b>≤3 (n=173)</b>	1.44 (0.77-2.69)	0.24	1.04 (0.54-2.04)	0.88
<b>3-6 (n=132)</b>	4.10 (1.84-9.13)	0.001	3.78 (1.64-8.72)	0.002
<b>&gt;6 (n=22)</b>				
<b>AFP al enrolamiento en lista, ng/ml</b>				
<b>≤100 (n=244)</b>	2.20 (1.11-4.34)	0.023	2.28 (1.10-4.71)	0.026
<b>101-1000 (n=61)</b>	3.66 (1.59-8.42)	0.002	3.05 (1.32-7.04)	0.009
<b>&gt;1000 (n=18)</b>				

NOTA: Valor normal de AFP 0.6-4.4 ng/ml. Abreviaciones: AFP: alfa-feto proteína.

Tabla 3. Análisis comparativo de acuerdo al score de AFP al enrolamiento en lista.

VARIABLE	AFP score ≤2 n=257 (79.1%)	AFP score >2 n=68 (20.9%)	P
<b>Edad</b> , años (± DE)	57 ± 8	54 ± 11	0.12
<b>Tiempo en lista</b> , meses, median (IQR)	4.0 (1.0-10.0)	2.0 (0.0-7.2)	0.12
<b>MELD</b> , (± DE)	16 ± 8	17 ± 8	0.68
<i>*Imágenes pre trasplante</i>			
<b>Dentro de Milán</b> , n (%)	238 (92.6)	30 (44.1)	0.0001
<b>AFP</b> , ng/mL, mediana (IQR)	10.7 (4.0-28.9)	173.0 (41.7-	0.0001
<b>AFP ≤100 ng/mL</b> , n (%)	223 (86.8)	1082.5)	0.0001
<b>AFP 100-1000 ng/mL</b> , n (%)	34 (13.2)	21 (31.8)	0.0001
<b>AFP &gt;1000 ng/mL</b> , n (%)	0 (0)	27 (40.9)	0.0001
<b>Tratamiento puente</b> , n (%)	111 (43.2)	18 (27.3)	0.0001
<i>*Variables del explante</i>			
<b>Dentro de Milan</b> , n (%)	175 (68.1)	26 (38.2)	0.0001
<b>Dentro Hasta-7</b> , n (%)	223 (86.8)	42 (61.8)	0.0001
<b>Invasión macrovascular</b> , n (%)	3 (1.4)	6 (11.5)	0.002
<b>Invasión microvascular</b> , n (%)	43 (16.9)	32 (47.8)	0.0001
<b>Grado nuclear &gt;II</b> , n (%)	47 (22.4)	28 (45.2)	0.001

NOTA: Valor normal de AFP 0.6-4.4 ng/ml. Abreviaciones: AFP: alfa-feto proteína.

Tabla 4. Análisis estratificado por factor etiológico más prevalente.

VARIABLE	HBV n=94 (28.7%)	non-HBV n=233 (71.3%)	P
<b>Edad</b> , años (± DE)	55 ± 8	58 ± 8	0.001
<b>Tiempo en lista</b> , meses, median (IQR)	4.0 (1.0-10.0)	3.0 (0.0-7.2)	
<b>MELD</b> , (± DE)	15 ± 6	17 ± 8	0.01
<i>*Imágenes pre trasplante</i>			
<b>Dentro de Milán</b> , n (%)	82 (87.2)	187 (80.3)	0.08
<b>Score AFP ≤2/&gt;2</b> , n (%)	72 (77.2)/22 (22.8)	187 (80.3)/46 (19.7)	0.31
<b>AFP</b> , ng/mL, mediana (IQR)			
<b>AFP ≤100 ng/mL</b> , n (%)	58 (63.0)	186 (80.5)	0.004
<b>AFP 100-1000 ng/mL</b> , n (%)	26 (28.3)	35 (15.2)	0.06
<b>AFP &gt;1000 ng/mL</b> , n (%)	8 (8.7)	10 (4.3)	0.001
<b>Tratamiento puente</b> , n (%)	36 (38.3)	119 (51.1)	0.04
<i>*Variables del explante</i>			
<b>Dentro de Milan</b> , n (%)	53 (56.4)	149 (63.9)	0.12
<b>Dentro Hasta-7</b> , n (%)	74 (78.7)	192 (82.4)	0.26
<b>Invasión macrovascular</b> , n (%)	5 (6.0)	5 (2.7)	0.16
<b>Invasión microvascular</b> , n (%)	28 (30.1)	49 (21.2)	0.11
<b>Grado nuclear &gt;II</b> , n (%)	33 (36.7)	42 (22.8)	0.01
<b>Recurrencia a 5 años</b>	13 (13.8)	36 (15.5)	0.42

NOTA: Valor normal de AFP 0.6-4.4 ng/ml. Abreviaciones: AFP: alfa-feto proteína. DE: desvío estándar; HBV: hepatitis B; MELD: Modelo de Enfermedad Hepática Terminal.

## **7.5. Cohorte expandida Latinoamericana 2005-2011 y 2012-2018.**

*Breve introducción, objetivos y métodos.*

Luego de esta primer cohorte Latinoamericana (2005-2011), en donde publicamos la primer validación externa no Europea del modelo de AFP, nos propusimos expandir la cohorte, invitando mayor número de centros participantes, ampliar la invitaciones a otros países de Latinoamérica e incluir un período de tiempo más extenso (2005-2018). Se denominó cohorte 1 al periodo 2005-2011 y cohorte 2 al período 2012-2018.

En esta etapa entonces, nuestro objetivo fue:

-Evaluar si las observaciones en la primer cohorte, se repitieron o confirmaban en una cohorte de mayor tamaño muestral: a) Discriminación del modelo de AFP en pacientes dentro o fuera de Milán y b) Efecto de la etiología, HBV versus no-HBV.

Se incluyó una población con similares criterios de elegibilidad de aquellas de la cohorte Latinoamericana 1 (2005-2011), ampliando ésta a otros centros de Brasil y posteriormente, ampliando el período de inclusión a 2012-2018 en todos los centros participantes.

Todas las metodologías, incluyendo variables de exposición y eventos de interés fueron similares a la cohorte 1. Asimismo, se registraron variables tanto tumorales como de AFP al enrolamiento en lista, luego de su re evaluación en pacientes con tratamientos puente al trasplante y a última evaluación radiológica pareada con valores de AFP pre-trasplante. En el método de análisis estadístico,

realizamos tanto regresión multivariable de Cox (HR), evaluando la asunción de riesgos proporcionales (test de Schoenfeld) y evaluamos la discriminación mediante el índice de Harrell C y Somers D. Asimismo, incorporamos la evaluación de la incidencia acumulada de recurrencia de manera sistematizada y de acuerdo a un análisis de riesgos competitivos. El motivo fue porque los eventos de fallecimiento no relacionados a recurrencia de HCC (sepsis, cardiovascular, otras causas), actuando como eventos competitivos (acontecen antes del desarrollo del evento primario de interés), pueden ocultar definitivamente el desarrollo del evento primario y consecuentemente, sobreestimar el riesgo en una u otra variable de exposición (32). Se calcularon los sub-HR y sus respectivos IC del 95% (método de Fine y Gray) (63).

#### **7.6. Resultados: cohorte expandida Latinoamericana 2005-2012 y 2012-2018.**

##### *Población y características del HCC.*

Se incluyeron 1085 pacientes trasplantados con HCC de Brasil (n=377), Argentina (n=324), Colombia (n=157), Chile (n=90), México (n=63), Uruguay (n=35), Perú (n=26) y Ecuador (n=13). La tabla 1 compara las cohortes 1 (n=390) y 2 (n=695) Latinoamericanas. La cohorte 2 (2012-2018) fue más añosa, presentó tiempos en lista de espera más prolongados, menor proporción de HBV y mayor de HCV e hígado graso no alcohólico y mayor proporción de puntaje suplementario de MELD. Asimismo, en la cohorte 2 respecto a la primer cohorte, se observó mayor proporción de pacientes dentro de criterios de Milán (89.6% vs 80.8%; P<.0001), menor proporción de pacientes con AFP >1000 ng/ml y con un score de AFP ≤2 puntos (89.6% vs 80.7%; P<.0001). La terapia locorregional como puente al trasplante se realizó con mayor frecuencia en la segunda cohorte (60.4% vs 46.4%; P<.0001).

En el total de la cohorte, la etiología más frecuente observada fue la HCV (42.7%), seguida del consumo crónico de alcohol (16.9%), HBV (13.9%) e hígado graso no alcohólico (10.0%). El 86.4% (n=938) estaba dentro de criterios de Milán al enrolamiento en lista de espera, mientras que a la última evaluación radiológica esa proporción disminuyó a 79.2% (n=859). La mediana de AFP al enrolamiento en lista de espera fue de 11.0 ng/ml (IQR 4.5-52.3); 81% presentaron un valor de AFP  $\leq$ 100 ng/ml (n=876), 15.4% entre 101 y 100 ng/ml (n=166) y 3.6% mayor a 1000 ng/ml (n=39). A última evaluación pre trasplante la mediana de AFP fue de 10.3 ng/ml (IQR 4.4-44.2 ng/ml).

Del total de pacientes dentro de Milán (n=938) al enrolamiento en lista de espera, el 90% presentaba un score de AFP  $\leq$ 2 puntos y un 10% un score mayor a 2 puntos. Los pacientes dentro de Milán presentaron menor recurrencia a 5 años (7.7% vs 25.2%) con un SHR de 0.34 (IC 0.25;0.51; P<.0001). Por otro lado, la proporción de score de AFP  $\leq$ 2 puntos y >2 puntos en pacientes fuera de Milán (n=147) fue de 45% y 55%, respectivamente.

#### *Sobrevida y recurrencia post trasplante hepático en la cohorte expandida.*

La sobrevida post trasplante a 5 años fue de 64.2% (IC 60.5-67.6). La incidencia de recurrencia global a 5 años fue de 16.6% (IC 13.5-20.3), observándose una dinámica de ocurrencia de los eventos mayoritariamente durante los primeros 24 meses post trasplante hepático (Figura 1). La número de fallecimientos que potencialmente podrían actuar como eventos competitivos de recurrencia durante todo el período de seguimiento fue de 244 pacientes (fallecidos sin recurrencia), siendo las principales causas de muertes en este subgrupo: otras causas 59.4%, sepsis 26.6% y cardiovascular 13.1%.

### *Evaluación del modelo de selección de AFP en la cohorte expandida.*

En esta cohorte expandida, observamos que el modelo de selección Francés o AFP discriminó adecuadamente dos poblaciones de riesgo de recurrencia post trasplante hepático, tanto en pacientes dentro [SHR 0.44 (IC 0.23;0.85); P=0.014] como fuera de Milán [SHR 0.25 (IC 0.10;0.61); P=0.002] al enrolamiento en lista de espera (Figura 2 A y B).

Asimismo, evaluamos el efecto ajustado de las variables propuestas por Duvoux y col en el global de la cohorte, ajustando el efecto de dichas variables con el tiempo en lista de espera y con el tratamiento locorregional o puente al trasplante hepático (Tabla 2). Primero, no contemplando eventos competitivos, se presentan los HR de las variables originales del modelo de AFP, crudo y ajustado, en un análisis multivariable de regresión Cox (Tabla 2 A) y luego, contemplando estos eventos competitivos (Tabla 2 B), Las mismas variables propuestas por Duvoux y col en su modelo original, se asociaron de manera independiente con el desarrollo de recurrencia en el análisis de riesgos competitivos.

Por otro lado, analizamos si los valores de AFP, categorizados de acuerdo a Duvoux y col, se asocian a un mal "estadiaje pre-trasplante". Es decir, evaluamos si estos estratos de AFP se asocian con tumores fuera de Milán en el explante, o con la presencia de invasión microvascular o tumores desdiferenciados. En pacientes dentro de Milán por imágenes pre trasplante, la proporción de pacientes que finalmente estaban dentro de Milán en el explante fue similar comparando aquellos pacientes con valores de AFP  $\leq 100$  ng/ml (72%), 101-1000ng/ml (61%) o  $>1000$  ng/ml (68%). Por otro lado, la proporción de invasión microvascular o tumores desdiferenciados fue significativamente mayor a medida de un incremento de los estratos de AFP (Tabla 3).

*Análisis de sensibilidad: efecto estratificado por el factor etiológico.*

Finalmente, evaluamos si en población HBV versus no HBV el score Francés discriminaba adecuadamente o no. Globalmente, no hubo diferencias significativas en la incidencia de recurrencia post TH entre aquellos con o sin HBV. En esta cohorte expandida, en pacientes sin HBV, el score de AFP (umbral  $\leq 2$  puntos) discriminó dos población de riesgo de recurrencia [SHR 0.22 (IC 0.14;0.33);  $P < .0001$ ]. Sin embargo, no sucedió lo mismo en población HBV+ [SHR 1.21 (IC 0.28;5.22);  $P = 0.79$ ].

### 7.7. Tablas y figuras cohorte expandida Latino Americana.

Tabla 1. Comparación entre ambas cohortes Latinoamericanas.

<b>VARIABLE</b>	<b>COHORTE 1 n=390 (35.9%)</b>	<b>COHORTE 2 n=695 (64.1%)</b>	<b>P</b>
<b>Edad</b> , años ( $\pm$ DE)	57 $\pm$ 9	58 $\pm$ 8	0.002
<b>Sexo masculino</b> , n (%)			
<b>Mediana de tiempo en lista</b> , (IQR), meses	3.9 (1.4-9.8)	5.6 (2.1-10.1)	0.031
<b>Etiología</b> , n (%)			
Viral			
Alcohol	246 (63.6)	364 (52.4)	
Colestásica	64 (16.5)	119 (17.1)	
Hígado graso no alcohólico	13 (3.4)	14 (2.0)	
Criptogénica	15 (3.9)	93 (13.4)	
Autoinmune	24 (6.2)	74 (10.6)	
Metabolismo del hierro	9 (2.3)	9 (1.3)	
Otras	9 (2.3)	12 (1.7)	
<b>HCV</b> , n (%)	153 (39.2)	310 (44.6)	0.08
<b>HBV</b> , n (%)	97 (24.9)	54 (7.8)	<.0001
<b>Hígado graso no alcohólico</b> , n (%)	15 (3.9)	93 (13.4)	<.0001
<i>-Datos al enrolamiento en lista de espera</i>			
<b>MELD suplementario</b> , n (%)	260 (66.7)	615 (88.5)	<.0001
<b>Mediana de número de nódulos</b> (IQR)	1 (1-2)	1 (1-2)	0.45
1-3 HCC nódulos, n (%)	372 (95.4)	673 (97.0)	0.18
$\geq 4$ HCC nódulos, n (%)	18 (4.6)	21 (3.0)	
<b>Diámetro del nódulo mayor</b> , cm (IQR)	3 (2.3-4)	2.7 (2.2-3.6)	0.0003

≤3 cm, n (%)	210 (53.8)	436 (62.7)	<.0001
3.1-6.0 cm, n (%)	154 (39.5)	249 (35.8)	
>6.0 cm, n (%)	26 (6.7)	10 (1.4)	
<b>Suma de todos los diámetros, cm (IQR)</b>	3.4 (2.5-4.5)	3.3 (2.3-4.5)	0.28
<b>Mediana de AFP, ng/ml (IQR)</b>	14.1 (5.2-96)	9.3 (4.3-41)	0.0008
≤100 ng/ml, n (%)	291 (75.4)	585 (84.2)	0.001
101-1000 ng/ml, n (%)	73 (18.9)	93 (13.4)	
>1000 ng/ml, n (%)	22 (5.7)	17 (2.4)	
<b>Dentro de criterios de Milan, n (%)</b>			
Si	315 (80.8)	623 (89.6)	<.0001
No	75 (19.2)	72 (10.4)	
<b>Score de AFP, n (%)</b>			
≤2 puntos	313 (80.7)	623 (89.6)	<.0001
>2 puntos	75 (19.3)	72 (10.4)	
<b>Tratamiento puente*, n (%)</b>	181 (46.4)	420 (60.4)	<.0001
<i>-Datos a última evaluación pre-trasplante</i>			
<b>Mediana de número de nódulos (IQR)</b>	1 (1-2)	1 (1-2)	0.16
1-3 HCC nódulos, n (%)	376 (96.4)	632 (95.3)	0.39
≥4 HCC nódulos, n (%)	14 (3.6)	31 (4.7)	
<b>Diámetro del nódulo mayor, cm (IQR)</b>	3 (2.3-3.8)	2.6 (2-3.5)	<.0001
≤3 cm, n (%)	227 (58.3)	384 (55.2)	<.0001
3.1-6.0 cm, n (%)	147 (37.8)	229 (32.9)	
>6.0 cm, n (%)	15 (3.9)	82 (11.8)	
<b>Suma de todos los diámetros, cm (IQR)</b>	3.2 (2.5-4.4)	3.2 (2.2-4.5)	0.14
<b>Mediana de AFP, ng/ml (IQR)</b>	13 (5-73.4)	8.7 (4.1-33.1)	0.0003
≤100 ng/ml, n (%)	296 (77.1)	596 (85.8)	<.0001
101-1000 ng/ml, n (%)	65 (16.9)	83 (11.9)	
>1000 ng/ml, n (%)	23 (6.0)	16 (2.3)	
<b>Dentro de criterios de Milán, n (%)</b>			
Si	325 (83.3)	534 (76.8)	0.011
No	65 (16.7)	161 (23.2)	
<b>Score de AFP, n (%)</b>			
≤2 puntos	320 (82.5)	588 (84.6)	0.36
>2 puntos	68 (17.5)	107 (15.4)	
<i>-Comparación datos al enrolamiento en lista y a última evaluación pre trasplante</i>			
<b>Reducción de estadio hacia Milán (n=111)</b>			
Si (n=41)	25 (46.3)	16 (28.1)	0.047
No (n=70)	29 (53.7)	41 (71.9)	
<b>Criterios de Milán</b>			
Dentro/Dentro Milan (n=818)	300 (76.9)	518 (74.5)	<.0001
Dentro/Fuera Milan (n=120)	15 (3.8)	105 (15.1)	
Fuera/Dentro Milan (n=41)	25 (6.4)	16 (2.3)	
Fuera/Fuera Milan (n=106)	50 (12.8)	56 (8.1)	
<b>AFP model</b>			
≤2/≤2 puntos (n=865)	304 (78.1)	561 (80.7)	<.0001
≤2/>2 puntos (n=73)	11 (2.8)	62 (8.9)	
>2/≤2 puntos (n=44)	17 (4.4)	27 (3.9)	
>2/>2 puntos (n=102)	57 (14.6)	45 (6.5)	



-Datos del análisis del explante.

<b>Invasión microvascular, n (%)</b>	85 (21.8)	164 (23.6)	0.49
<b>Tumores desdiferenciados, n (%)</b>	67 (17.2)	212 (30.5)	<.0001
<b>Dentro de Milán, n (%)</b>	246 (63.1)	465 (66.9)	0.20
<b>Dentro de criterios de Hasta-7, n (%)</b>	321 (82.3)	652 (93.8)	<.0001

Tabla 2 A. Análisis multivariable de regresión Cox para recurrencia post trasplante hepático.

<b>VARIABLE</b>	<b>HR crudo (IC 95%)</b>	<b>P</b>	<b>HR ajustado (IC 95%)</b>	<b>P</b>
<b>Edad, años</b>	1.01 (0.98;1.03)	0.57		
<b>Sexo masculino</b>	0.99 (0.62;1.58)	0.96		
<b>Tiempo en lista, meses</b>	0.99 (0.98;1.01)	0.90		
<b>HCV</b>	1.04 (0.70;1.53)	0.85		
<b>HBV</b>	0.91 (0.52;1.61)	0.75		
<b>Número de nódulos*</b>				
1-3 HCC nódulos	-	-	-	-
≥4 HCC nódulos	3.27 (1.70;6.28)	<.000 ‡	2.87 (1.44;5.71)	0.003
<b>Diámetro del nódulo mayor*</b>				
≤3 cm	-	-	-	-
3.1-6.0 cm	1.70 (1.13;2.57)	0.011	1.49 (0.97;2.27)	0.07
>6.0 cm	6.03 (3.29;11.03)	<.000 ‡	5.93(3.09;11.37)	<.000 ‡
<b>AFP*</b>				
≤100 ng/ml	-	-	-	-
101-1000 ng/ml	2.28 (1.45;3.60)	‡	2.52 (1.59;4.01)	<.000 ‡
>1000 ng/ml	3.38 (1.74;6.57)	<.000 ‡	2.31 (1.16;4.63)	0.017
<b>Tratamiento puente locorregional</b>	1.35 (0.92;1.99)	0.13	1.00 (0.66;1.52)	0.62

Nota: \*al enrolamiento en lista de espera. HR: Hazard Ratios. IC: intervalo de confianza 95%. El riesgo proporcional se mantuvo en el modelo final (Schoendeld P=0.45), mientras que el índice de Harrell C y Somer D para el modelo final fue de 0.66 y de 0.33.

Tabla 2 B. Análisis multivariable de riesgos competitivos, evento recurrencia post TH, evento competitivo: muerte post trasplante.

<b>VARIABLE</b>	<b>SHR crudo (IC 95%)</b>	<b>P</b>	<b>SHR ajustado (IC 95%)</b>	<b>P</b>
<b>Edad, años</b>	1.01 (0.98;1.02)	0.95		
<b>Sexo masculino</b>	1.03 (0.64;1.64)	0.91		
<b>Tiempo en lista, meses</b>	0.99 (0.98;1.01)	0.72		
<b>HCV</b>	1.05 (0.71;1.55)	0.79		

<b>HBV</b>	0.85 (0.48;1.48)	0.56		
<b>Número de nódulos*</b>				
1-3 HCC nódulos	-	-	-	-
≥4 HCC nódulos	2.98 (1.58;5.62)	0.001	2.65 (1.48;4.74)	0.001
<b>Diámetro del nódulo mayor*</b>				
≤3 cm	-	-	-	-
3.1-6.0 cm	1.75 (1.16;2.64)	0.007	1.56 (1.03;2.37)	0.035
>6.0 cm	6.03 (3.32;10.92)	<.000 1	5.56(2.93;10.56)	<.000 1
<b>AFP*</b>				
≤100 ng/ml	-	-	-	-
101-1000 ng/ml	2.13 (1.36;3.36)	0.001	2.30 (1.46;3.64)	<.000 1
>1000 ng/ml	3.51 (1.77;6.95)	<.000 1	2.43 (1.17;5.07)	0.017
<b>Tratamiento puente locorregional</b>	1.35 (0.92;1.99)	0.13	1.10 (0.74;1.64)	0.62

Nota: \*al enrolamiento en lista de espera. SHR: sub-Hazard Ratios. IC: intervalo de confianza 95%.

Tabla 3. Comparación de variables pre trasplante y hallazgos en el análisis de los explantes.

Datos del explante	<b>Dentro de Milán pre trasplante hepático</b>			<b>P</b>
	<b>AFP ≤100 ng/ml</b> <i>n=771(83%)</i>	<b>AFP 101-1000 ng/ml</b> <i>n=141(15%)</i>	<b>AFP &gt;1000 ng/ml</b> <i>n=25(3%)</i>	
<b>Dentro de criterios de Milán, n (%)</b>	555 (72)	86 (61)	17 (68)	0.12
<b>Invasión microvascular, n (%)</b>	140 (18)	41 (29)	10 (40)	0.001
<b>Tumores desdiferenciados, n (%)</b>	172 (22)	54 (38)	11 (48)	<.000 1

Nota: análisis comparativo entre pacientes dentro de Milán pre trasplante, estratificados por valor de AFP de acuerdo a Duvoux y col, y hallazgos del explante. La AFP no se asocia prioritariamente con un mal estadiaje pre trasplante sino más bien, con un perfil de mayor agresividad biológica tumoral del hepatocarcinoma.

Figura 1. Incidencia global de recurrencia en toda la cohorte Latinoamericana (n=1085)

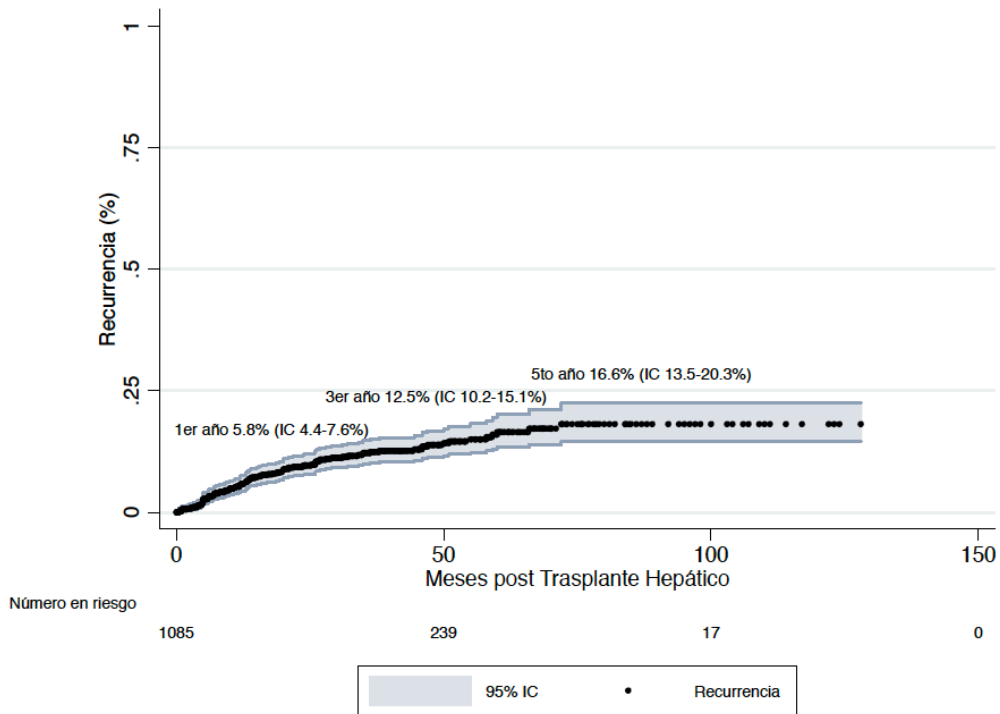
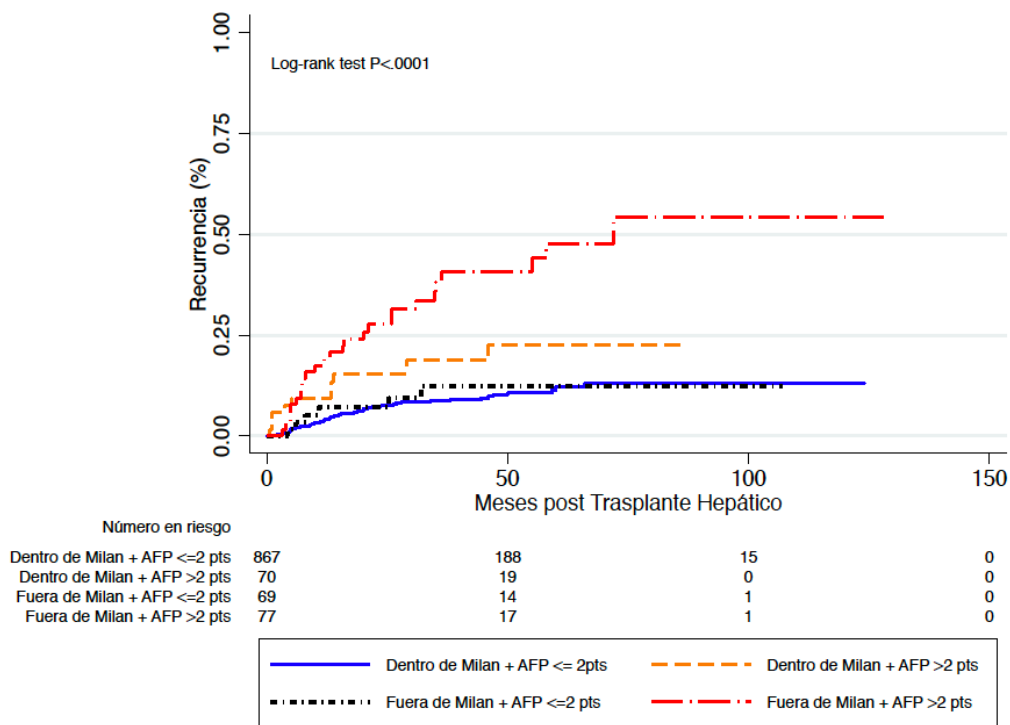


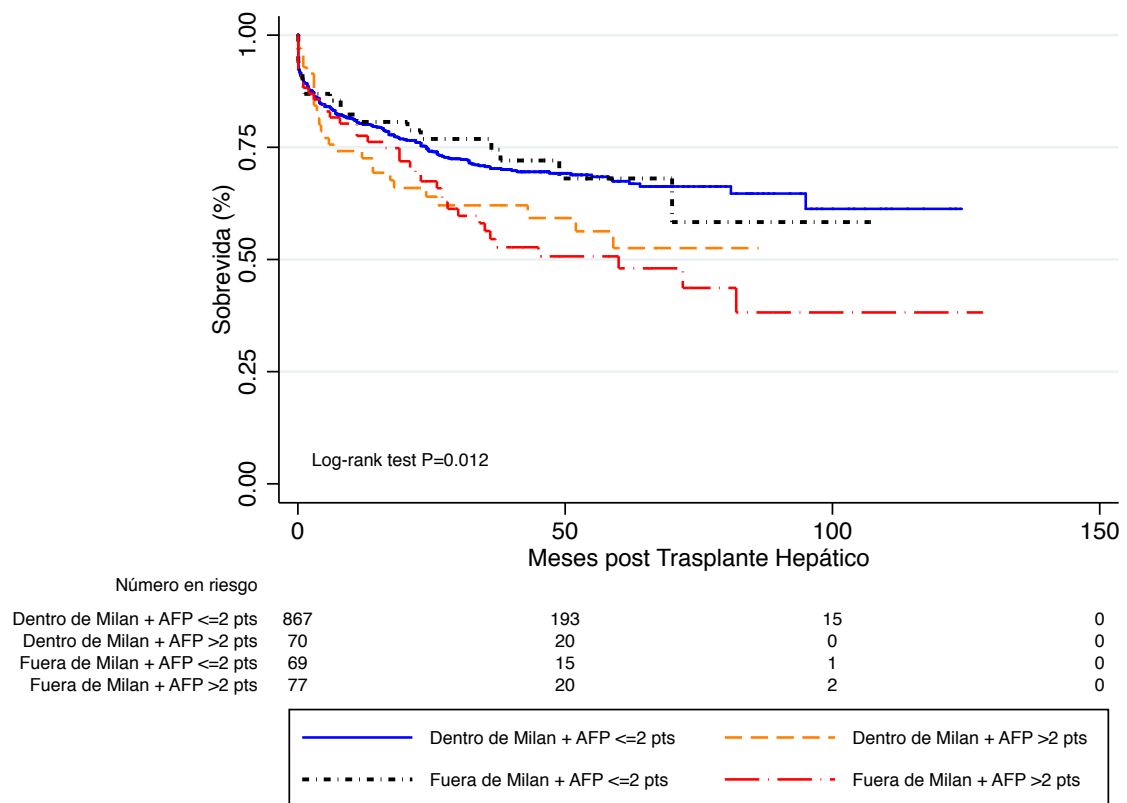
Figura 2. Recurrencia (A) y sobrevida (B) de acuerdo a pacientes dentro o fuera de Milán, estratificados por el score de AFP en la cohorte expandida Latinoamericana (n=1085).

A-



Nota: La recurrencia a 5 años para pacientes dentro o fuera de Milán pero con un score de AFP  $\leq 2$  puntos fue similar [12.2% (IC 9.2-16.1) vs 12.6% (IC 5.7-26.4)], mientras que aquellos pacientes con un score de AFP  $> 2$  puntos presentaron una incidencia de recurrencia post TH superior, sea dentro [22.7% (IC 12.6-38.8)] o fuera de criterios de Milán [47.7% (IC 34.2-63.4)].

B-



Nota: La supervivencia post trasplante a 5 años para pacientes dentro o fuera de Milán pero con un score de AFP  $\leq 2$  puntos fue similar [67.3% (IC 63.4-71.0) vs 67.9% (IC 52.4-79.3)], mientras que aquellos pacientes con un score de AFP  $> 2$  puntos presentaron una menor supervivencia, sea dentro [52.3% (IC 37.3-65.4)] o fuera de criterios de Milán [47.8% (IC 34.7-59.7)].

## 7.8. Discusión.

La primer cohorte de Latinoamérica fue la primera validación externa no

Europea en evaluar el modelo de selección de AFP. Nuestros resultados confirman que el modelo de AFP discrimina mejor el riesgo de recurrencia comparándose con los criterios de Milán. Probablemente esto se deba a la incorporación de la AFP en dicho modelo, sumado al efecto de variables de tamaño y número tumoral. Se confirma el efecto independiente de la AFP en su asociación con el riesgo de recurrencia post trasplante y su necesidad de ser incorporada en los modelos de selección para candidatos a trasplante hepático.

En la primera cohorte Latinoamericana observamos que el modelo de AFP permitió identificar aquellos pacientes fuera de Milán con muy buen pronóstico post trasplante, con similar recurrencia y sobrevida que aquellos dentro de Milán. Por otro lado, en los pacientes dentro de Milán, el efecto de la estratificación del riesgo de recurrencia utilizando el modelo de AFP no fue significativo. Esto probablemente se haya debido al tamaño muestral insuficiente (error beta).

En efecto, cuando evaluamos el modelo Francés en la cohorte expandida con la segunda cohorte Latinoamericana (n=1085), observamos que el modelo discrimina adecuadamente dos poblaciones de riesgo tanto en pacientes dentro como fuera de Milán. El poder de discriminación del modelo fue de 0.66, algo inferior al reportado originalmente por Duvoux y col, pero esta medida fue reportada evaluando una curva ROC mediante una regresión logística y en cambio, nosotros hemos evaluado el impacto del modelo mediante un análisis tiempo dependiente (22).

Tercero, cuando evaluamos los modelos de selección luego de la re evaluación o ajustándolos por el efecto del tratamiento anti tumoral en lista de espera (tratamiento puente), observamos que la re evaluación del modelo de AFP aún

discrimina dos poblaciones de riesgo de recurrencia y sobrevida post trasplante. Es de extrema importancia ahondar los esfuerzos para identificar variables asociadas a mayor riesgo de recurrencia y menor sobrevida post trasplante hepático, con el fin de mejorar la alocaación y priorización de órganos en lista de trasplante hepático (51,60). El beneficio de la incorporación de la AFP al proceso de selección de candidatos a trasplante hepático ha sido descrito por otros autores (19,20,33,39,57,64,65). Similar a lo originalmente reportado por Duvoux y col, nosotros observamos que la AFP pre trasplante se asocia no tanto con mayor número o tamaño tumoral en el explante, sino más bien con tumores desdiferenciados o con invasión microvascular.

Finalmente, observamos que el modelo de selección de AFP no discrimina adecuadamente en la población Latinoamericana con HBV. Esta observación también se ha reportado en una cohorte Italiana (31). En las cohortes Francesa e Italianas, la cirrosis alcohólica y la hepatitis C crónica fueron las etiologías más frecuentes (22,31). En la primer cohorte Latinoamericana, la HBV fue una de las etiologías más frecuentes, probablemente por el tamaño muestral de centros de Brasil, en donde la HBV es más prevalente (66,67). En la cohorte expandida, las principales causas fueron la HCV y el consumo crónico de alcohol y luego el hígado graso no alcohólico. Hemos observado además, cambios etiológicos por período tal que, la HCV fue la etiología más frecuente en todos los períodos desde el año 2005, la etiología alcohólica se ha mantenido estable, mientras que el causal de enfermedad hepática crónica por hígado graso no alcohólico y síndrome metabólico ha ido incrementándose, siendo en la actualidad la tercer causa de HCC en trasplantados en Latinoamérica (68). Es probable que existan otros biomarcadores o perfil biológico del HCC, independientemente de la AFP, sobre todo en la población HBV+. Esta población se ha asociado a un

perfil de HCC “proliferativo” (41), con mutación TERT y P53, patrón proliferativo en análisis de transcriptómica (G1-3)(42), y cambios epigenéticos hacia la sobreexpresión del factor de crecimiento derivado del endotelio vascular o VEGF (27).

### **7.9. Limitaciones.**

En esta etapa intentamos corregir la limitación en cuanto al tamaño muestral de la primer cohorte Latinoamericana. En segundo lugar, si bien no hubo una revisión centralizada de las imágenes, intentamos que la re evaluación de imágenes luego del tratamiento locorregional sea acorde a criterios RECIST 1.1 y no RECIST modificados, dado la variabilidad y la heterogeneidad que podría inducir esta última evaluación (69). Finalmente, si bien hemos evaluado la calibración y discriminación del modelo de AFP, lo hemos realizado mediante regresión Cox y no mediante riesgos competitivos (Wolbers). Por otro lado, no hemos estimado en esta etapa los intervalos de confianza de los índices de Harrell o de Somers, objetivo que nos propusimos realizarlo en una cohorte multicéntrica transcontinental, aun expandiendo más el tamaño muestral (ver nuevas etapas de la Tesis Doctoral).

### **7.10. Conclusiones de este capítulo.**

El modelo de selección Francés o de AFP discrimina adecuadamente dos poblaciones con distinto riesgo de recurrencia y sobrevida post trasplante hepático, tanto dentro como fuera de criterios de Milán. Globalmente, confirmamos que en esta cohorte Latinoamericana, el modelo de selección de AFP es superior a los criterios de Milán para la selección de candidatos a trasplante hepático. Permite por un lado identificar aquellos pacientes dentro

de Milán con mayor riesgo de recurrencia (siendo priorizados para trasplante) y por otro, aquellos fuera de Milán (excluidos de priorización de trasplante) que tiene excelente pronóstico post trasplante. Consideramos que el modelo de AFP optimiza la selección de candidatos a trasplante, confirmando que la incorporación de AFP, variable asociada de manera independiente con recurrencia y con tumores biológicamente más agresivos, es útil en el proceso de selección.



## **8. Capítulo 3. Evaluación de la incorporación de la AFP y del modelo de selección Francés en la asociación con progresión tumoral en lista de espera para trasplante hepático en una cohorte multicéntrica Latinoamericana (2012-2018).**

En esta etapa nos focalizamos en responder las siguientes preguntas de investigación:

a)-En pacientes con hepatocarcinoma enrolados en lista de trasplante hepático, ¿el valor de AFP se asocia con un mayor riesgo de progresión tumoral en lista de espera y delistamiento de trasplante?

b)-En pacientes con hepatocarcinoma enrolados en lista de trasplante hepático, ¿el score de AFP se asocia con un mayor riesgo de progresión tumoral en lista de espera y delistamiento de trasplante?

### **8.1. Breve introducción y Objetivos.**

La progresión tumoral radiológica del HCC durante el tiempo en lista de trasplante es un acontecimiento que puede suceder, dependiendo de las características tumorales en cuanto a diámetro y número tumoral y por sobre todas las cosas, el tiempo en lista de espera. En los pacientes dentro de criterios de Milán al enrolamiento en lista de espera la progresión tumoral por fuera de criterios trasplantológicos ocurre en un 9% y 20% a 12 y 24 meses, respectivamente (70-73).

Se ha identificado que el diámetro del nódulo mayor >3 cm, la multinodularidad (más de 2 nódulos)(70,74), y la ausencia de respuesta al tratamiento puente locorregional (29,75), se asocian de manera independiente con mayor riesgo de progresión en lista de espera (76). Asimismo, la no factibilidad de realización de tratamientos puente debido a enfermedad hepática avanzada (Child Pugh

C) o descompensación de la cirrosis, se ha asociado con mayor riesgo de progresión tumoral en lista de espera (72). En efecto, algunos autores han propuesto al test de tiempo en lista de espera como de selección natural de mejores candidatos a trasplante, en ausencia de progresión tumoral en lista de espera (77-79).

La AFP al enrolamiento en lista de espera es una variable que se ha asociado en distintas series como un factor pronóstico para la identificación de pacientes tanto dentro como fuera de Milán, con mayor riesgo de progresión tumoral y delistamiento (80). Se ha observado que niveles elevados de AFP al enrolamiento en lista, cortes propuestos  $>400$  ng/ml ó  $>500$  ng/ml, se asocian con mayor riesgo de progresión tumoral (71,73). El riesgo de progresión tumoral radiológica en lista de espera a 12 meses en pacientes con valores de AFP  $>400$  ng/ml ha sido reportado ser superior al 40% (73). En definitiva, impresiona que la ausencia de respuesta al tratamiento locorregional puente al trasplante, los pacientes con intención de reducción de estadio o "downstaging" y aquellos con valores de AFP  $>400$  ng/ml, presentan mayor probabilidad de progresión tumoral en la espera del trasplante y por lo tanto, mayor riesgo de ser excluidos del mismo (71,73).

Con el advenimiento de los modelos compuestos de selección para candidatos a trasplante hepático, incluidos el modelo de AFP o Francés y más recientemente, el Metroticket 2.0, el uso de éstos ha demostrado optimizar el proceso de selección (22,25). Sin embargo, estos modelos se han diseñado para predecir la probabilidad o riesgo de recurrencia o sobrevida post trasplante y no el riesgo de progresión tumoral en lista de espera.

Nuestro objetivo en esta etapa fue la evaluación de la incorporación de la AFP y del modelo Francés de AFP en la asociación con progresión tumoral en lista

de espera para trasplante hepático.

## **8.2. Pacientes y Métodos.**

*Diseño, centros participantes y criterios de elegibilidad.*

Se invitó a 20 centros de trasplante hepático de Latino América a participar de este estudio de cohorte retrospectivo. El protocolo del estudio se envió a todos los centros y el registro de datos se realizó tanto de manera escrita como electrónica (CRF electrónico), a través de una link web. Este estudio formó parte de un registro de conocimiento público, incorporado en [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (NCT03775863), siguiendo estándares para el diseño y desarrollo de estudios observacionales (guías STROBE)(52), y cumpliendo con requisitos éticos de investigación clínica, tanto nacionales como internacionales, de acuerdo a la última versión del 2008 de la Declaración de Helsinki.

Los criterios de inclusión fueron a) pacientes adultos (>17 años) enrolados en lista de trasplante hepático con hepatocarcinoma (3,28) o enrolados en lista por cirrosis descompensada con desarrollo de HCC durante el tiempo en lista de espera, y b) desde el 1 de enero de 2012 al 31 de diciembre del 2018. Se excluyeron aquellos pacientes no enrolados en lista de espera para TH debido a la extensión tumoral durante la evaluación pre trasplante (invasión macrovascular, compromiso extrahepático o ganglionar), y b) HCC de hallazgo incidental en el análisis de la anatomía patológica del explante.

*Variables de exposición.*

Se realizó un registró sistemático de variables incluidas en el CRF electrónico, incluyendo datos demográficos, de función hepática, etiología, valores de AFP y características tumorales de extensión del HCC al enrolamiento en lista de

espera o al diagnóstico del mismo (en aquellos con diagnóstico del HCC durante el tiempo en lista de espera).

Asimismo, dado la incertidumbre reciente, evaluamos otras co-intervenciones incluyendo el efecto de la erradicación de la hepatitis C con el tratamiento con antivirales de acción directa (DAA), habiéndose reportado mayor riesgo de recurrencia post tratamientos curativos (no trasplante) (81,82), siendo incierto este escenario en otros estudios en la progresión del HCC en lista de trasplante hepático (83,84). De acuerdo a esto, se registraron los antivirales utilizados, la respuesta virológica, sea antes o durante el tiempo en lista de espera o posterior al trasplante, siguiendo guías internacionales en ese momento (85). El criterio de erradicación viral fue el de una carga viral negativa a semana 12 luego de fin de tratamiento con DAAs (carga viral <15 UI/ml).

La extensión tumoral del HCC pre trasplante hepático se categorizó de acuerdo a los criterios de Milán (6) y del modelo de AFP o Francés (22). Los criterios de selección de candidatos a trasplante en todos los centros, fueron los criterios de Milán, de acuerdo a las políticas de salud en cada país. Los pacientes fuera de estos criterios fueron incluidos en el estudio, de acuerdo a la política institucional de cada centro. Se registraron además todas las terapias locorregionales realizadas como puente al trasplante y la re evaluación radiológica junto con valores de AFP luego de los mismos.

Asimismo, se evaluaron los cambios dinámicos en los límites tumorales de acuerdo a criterios de Milán y al modelo de AFP entre el enrolamiento en lista y la última evaluación en el período en lista de trasplante.

Durante el período post trasplante hepático, se registraron los datos del análisis del explante, eventos de rechazo celular agudo durante los primeros 3 meses y el tipo de inmunosupresión durante este período. Los hallazgos del explante

incluyeron: número y diámetro (cm) de cada nódulo de HCC, presencia de invasión macro o micro vascular (MVI), el grado de diferenciación celular (Edmonson-Steiner), considerando desdiferenciación a aquellos tumores con algún foco grado >II (26), y se evaluó también la extensión tumoral de acuerdo a los criterios de "Hasta-7" en el explante (18).

#### *Eventos de interés del estudio.*

El evento primario del estudio fue el delistamiento o dropout por desarrollo de progresión radiológica del HCC durante el período en lista de espera. Para esto, utilizamos la evaluación radiológica de acuerdo a los Criterios de Evaluación de Respuesta para Tumores Sólidos o *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST 1.1) (3,28), sistematizados a través de un calculador automático enviado a cada centro y confirmado de manera central y ciega. La evaluación radiológica se evaluó en un mínimo intervalo de cada 3 meses en lista de espera. Se registró el tiempo a la progresión radiológica de acuerdo a criterios RECIST 1.1 (aumento de un 20% de la suma de diámetros de todas las lesiones de HCC respecto al basal), desde el tiempo de enrolamiento en lista o diagnóstico de HCC a la progresión, fallecimiento en lista, delistamiento o trasplante o última fecha de seguimiento en lista de espera (para aquellos pacientes aun aguardando el trasplante al momento de este análisis). Asimismo, registramos el tipo o patrón de progresión radiológica, de acuerdo a Reig M y col, en intrahepática uninodular, intrahepática multinodular, intrahepática difusa, invasión macrovascular, invasión extrahepática (86). En todos los centros, el desarrollo de invasión macrovascular o extrahepática fue inequívoco para la exclusión o delistamiento. En los casos de progresión fuera de Milán, se decidió de manera individualizada en cada centro.

En aquellos pacientes que recibieron tratamientos locorregionales como puente al trasplante, la re evaluación radiológica se realizó a las 4-6 semanas luego de cada tratamiento locorregional, siendo registrada en el CRF (3,28). Para la evaluación post tratamiento locorregional, también utilizamos los criterios RECIST 1.1 en vez de los criterios RECIST modificados (mRECIST), que registran el diámetro residual de refuerzo arterial, con el fin de evitar heterogeneidad en esta evaluación y evitar así un sesgo de información (69).

Los eventos de interés secundarios fueron el desarrollo de progresión radiológica de acuerdo a criterios RECIST 1.1 (aún en ausencia de delistamiento), la sobrevida global desde el enrolamiento en lista de espera (fallecimiento en lista de espera) y el desarrollo de evento combinado de progresión tumoral global (progresión en lista de espera y/o recurrencia post trasplante hepático). Todos los pacientes se siguieron hasta el fallecimiento (se registró el causal de muerte), delistamiento o *dropout*, o hasta el último seguimiento pre o post trasplante hepático.

#### *Análisis estadístico.*

En función de evitar un potencial sesgo de selección en el análisis del evento primario, y evaluar la asociación causal específica, se analizó el evento primario mediante análisis de riesgos competitivos, con cálculo de sub-Hazard Ratios (SHR) y respectivos intervalos de confianza del 95% (IC) (método de Fine y Gray) (63). Los eventos que se consideraron como competitivos para el delistamiento por desarrollo de progresión tumoral en lista de espera fueron la muerte en lista de trasplante por otras causas (muerte no relacionada con HCC), el delistamiento por otras causas (no progresión del HCC) y el trasplante hepático.

Se analizaron curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier (test de log-rank), con análisis multivariable de regresión Cox (HR). Para el evento de progresión tumoral global, evaluamos también riesgos competitivos, teniendo en cuenta la fecha desde la evaluación a evento de progresión tumoral en lista o de recurrencia post trasplante hepático en toda la cohorte. Los eventos competitivos para progresión tumoral fueron mencionados con anterioridad y aquellos para la recurrencia fue la muerte post trasplante sin recurrencia.

Finalmente, en un sub-análisis, evaluamos el efecto del tratamiento de la hepatitis C con DAAs como co-intervención y su cambio en la progresión en lista de espera, realizando un score o macheo (propensity score matching analysis) de variables no balanceadas entre los pacientes con HCV que recibieron y no recibieron DAA pre trasplante, con el fin de reducir el sesgo de la intervención en este estudio observacional (intervención no aleatorizada). De esta manera, con el fin de evaluar la probabilidad de haber recibido DAAs en pacientes HCV+, realizamos un análisis multivariable de regresión logística con cálculo de Odds Ratios (OR) y sus respectivos IC de 95%. La calibración entre lo observado y esperado del modelo se realizó mediante el test de Hosmer-Lemeshow y su discriminación mediante el cálculo del área bajo la curva ROC. Las variables incluidas en el score de probabilidad o propensity score, fueron aquellas que consideramos asociadas con la decisión o no de tratar con DAAs pre trasplante: a) severidad de enfermedad o función hepática, b) variables de extensión del HCC, c) otras variables con potencial efecto confundidor incluyendo el país, fecha de evaluación pre trasplante previa al año 2015 (introducción de los DAAs en Latino América). Evaluamos el rango de distribución de las variables incluidas en el modelo en cada bloque del score de probabilidad, evaluando luego el

balance de cada variable en cada bloque. Todos los análisis los realizamos utilizando STATA 13.0 (StataCorp, Texas, Estados Unidos).

### **8.3. Resultados.**

Se enrolaron durante el período del estudio 994 pacientes con HCC (Argentina 38%, Brasil 34%, Colombia 10%, México 6%, Chile 5%, Uruguay 3%, Perú 2%, Ecuador 2%), de los cuales el 88.2% fueron enrolados por HCC y el 11.8% por cirrosis descompensada y que desarrollaron el HCC con una mediana de tiempo desde el enrolamiento en lista de trasplante de 10.8 meses (IQR 3.5-10.8) (Tabla 1). Al momento del análisis de esta etapa, de los 994 pacientes enrolados en lista de espera, el 65% recibió el trasplante hepático (n=650), 10% aún permanecía en lista de espera (n=91) y el 25% fue delistado (n=253) (Figura 1).

El 81.9% (n=814) del total de la cohorte, 81.3% de aquellos enlistados por HCC y 86.3% de aquellos con diagnóstico del HCC durante el tiempo en lista de espera se encontraban dentro de criterios de Milán al enrolamiento o al diagnóstico en lista, respectivamente. La mediana de AFP al enrolamiento en lista o al diagnóstico fue de 10.9 ng/ml (IQR 4.5-58.7); 79.8% (n=788) presentaron una AFP  $\leq$ 100 ng/ml, 15.9% (n=157) entre 101-1000 ng/ml y 4.3% (n=42)  $>$ 1000 ng/ml.

La mediana en tiempo en lista de espera fue de 6.1 meses (IQR 2.4-10.4) para toda la cohorte; más prolongado en pacientes con diagnóstico del HCC durante el tiempo en lista respecto a aquellos enrolados por HCC [14.8 meses (IQR 7.6-28.5) vs 6.7 meses (IQR 2.9-11.9)]. La mediana de tiempo entre la última evaluación radiológica hasta el trasplante fue de 2.2 meses (IQR 1.0-4.1), y fue similar entre aquellos que con o sin tratamiento puente [2.1 meses (IQR 0.9-3.8) vs 2.4 meses (IC 1.1-4.3); P=0.09]. Se realizó tratamiento puente locorregional en lista de espera en el 54.8% de la cohorte (n=545); este grupo de pacientes



presentó una mediana de tiempo en lista más larga que aquellos sin tratamiento locorregional [9.8 meses (IQR 5.7-16.8) vs 3.9 meses (IC 1.4-8.6);  $P < .0001$ ].

#### *Incidencia de progresión tumoral en lista de espera.*

La incidencia global de progresión del HCC de acuerdo a criterios de RECIST 1.1 fue del 24.2% (IC 21.2-26.9%;  $n=222$ ); 7.1% (IC 5.3-9.2%) y de 20.2% (IC 15.2-25.9%) a 12 y 24 meses, respectivamente. En aquellos que no presentaron progresión tumoral, lograron trasplantarse el 82.7% ( $n=575$ ) y un 10.1% ( $n=70$ ) presentó delistamiento por otras causas. Por otro lado, en pacientes con progresión tumoral por RECIST 1.1, el 33.8% ( $n=75$ ) recibió el trasplante hepático y 60.0% fue delistado ( $n=133$ ).

El tipo de progresión fue extrahepática en el 6.3% ( $n=14$ ), invasión macrovascular en el 8.6% ( $n=19$ ), infiltrativo difuso en el 16.7% ( $n=37$ ), intrahepática multinodular en el 61.3% ( $n=136$ ) y crecimiento uninodular intrahepático en 7.2% ( $n=16$ ).

Las variables asociadas de manera independiente a progresión tumoral en lista de espera en el análisis multivariable de riesgos competitivos fue el tratamiento locorregional [SHR 0.49 (IC 0.37-0.66)] y los valores de AFP 101-1000ng/ml [SHR 1.67 (IC 1.25-2.22)] y  $>1000$  ng/ml [SHR 2.13 (IC 1.25-3.62)], ajustados por sexo y HCV.

#### *Incidencia de delistamiento por progresión del HCC.*

La incidencia global de delistamiento por progresión del HCC de acuerdo a criterios de RECIST 1.1 fue del 11.2% (IC 9.7-13.8%); 7.1% (IC 5.3-9.2%) y de 20.2% (IC 15.2-25.9%) a 12 y 24 meses, respectivamente (Figura 2). Todos los pacientes con patrón de progresión extrahepática o invasión macrovascular fueron

delistados, mientras que la proporción de delistamiento por tipo de progresión fue del 70.3% en aquellos con compromiso infiltrativo difuso (n=26/37), 30.9% en aquellos con progresión multinodular (n=42/136) y del 25.0% en aquellos con aumento del diámetro de única lesión (n=4/16) (P<.0001).

Cuando evaluamos el efecto de variables asociadas a delistamiento por progresión del HCC en lista de espera en el análisis multivariable de riesgos competitivos, el diámetro del nódulo mayor y los valores de AFP 101-1000ng/ml [SHR 2.66 (IC 1.73-4.09)] y >1000 ng/ml [SHR 2.79 (IC 1.36-5.72)], se asociaron de manera independiente ajustados por el efecto del número de nódulos, el tratamiento locorregional puente en lista de espera, el sexo masculino y la etiología (HBV y HCV) (Tabla 2).

La sobrevida desde el enrolamiento en lista de espera fue significativamente inferior en aquellos que fueron delistados por progresión del HCC respecto a aquellos que no fueron delistados (Figura 3).

*Incidencia de progresión tumoral en lista de espera de acuerdo a criterios pre-trasplante.*

La incidencia de delistamiento por progresión tumoral radiológica de acuerdo a RECIST 1.1 fue mayor en pacientes fuera de Milán [24% (IC 16-28)] respecto a aquellos dentro de Milán [8% (IC 5-12%); P<.0001] con un SHR ajustado de 3.23 (IC 2.14-4.89)] (Figura 4 A). En pacientes dentro de criterios de Milán, los valores de AFP permitieron estratificar el riesgo de delistamiento por progresión del HCC en lista de espera (Figura 4 B).

De 994 pacientes, se analizaron 917 de los cuales se pudo computar el score de AFP. De acuerdo al modelo de AFP o Francés, el 84.9% (n=773) de la cohorte presentaba un score menor o igual a 2 puntos al enrolamiento en lista. En

pacientes dentro de Milán (n=755), el 92% y el 8% presentaban score de AFP  $\leq 2$  y  $> 2$  puntos, respectivamente. Por otro lado, en los pacientes fuera de Milán (n=162), el 47% y el 53% presentaban score de AFP  $\leq 2$  y  $> 2$  puntos, respectivamente.

Globalmente el modelo de AFP  $> 2$  puntos se asoció con un mayor riesgo de delistamiento por progresión tumoral en lista de espera con un SHR de 3.17 (IC 2.13-4.71;  $P < .0001$ ), con un índice de Harrell de 0.61 (IC 0.58-0.64). En pacientes dentro de criterios de Milán, el modelo de AFP discriminó dos poblaciones con mayor riesgo de progresión tumoral [AFP  $> 2$  puntos SHR 1.68 (IC 1.08-2.61)], ajustado por el tratamiento puente en lista (Figura 5 A). Sin embargo, en pacientes fuera de Milán, el modelo de AFP no discriminó grupos con diferente incidencia acumulada de progresión tumoral en lista de espera (Figura 5 B).

*Efecto en la progresión tumoral global de acuerdo a los criterios de Milán y al modelo de AFP.*

Finalmente, evaluamos el efecto de los cambios dinámicos durante el tiempo en lista de espera en función del score de AFP y el desarrollo del evento combinado de progresión tumoral global. Para una mediana de seguimiento desde la evaluación pre trasplante de 22.7 meses (IQR 9.8-43.1), observamos una incidencia del evento combinado de 29.8% (IC 26.6-33.2); de éstos 217 pacientes presentaron progresión tumoral en lista y 41 recurrencia post trasplante hepático con una incidencia de recurrencia a 5 años de 12.7% (IC 8.4-19.0).

Del total de pacientes dentro de Milán al enrolamiento en lista (n=814), 24.3% (n=198) progresaron fuera de dichos criterios durante el período en lista de espera. Por otro lado, 21.7% (n=39) del total de pacientes fuera de Milán (n=180),

redujeron su tamaño hacia dentro de estos criterios durante el tiempo en lista de espera, luego del tratamiento locorregional. La incidencia de progresión tumoral global (progresión radiológica en lista o recurrencia post TH) fue significativamente más alta en todos los estratos cuando se lo comparó con aquellos pacientes que se mantuvieron dentro de criterios de Milán en el tiempo en lista de espera (Figura 6 A).

De acuerdo a cambios dinámicos en el criterio de selección Francés, 69.5% permaneció con un score de AFP  $\leq 2$  (n=652), un 13.9% (n=130) cambio de  $\leq 2$  a  $>2$  puntos, 13.1% (n=123) permaneció con un score de AFP  $>2$  y un 3.5% (n=33) redujo el score de  $>2$  a  $\leq 2$  puntos. La incidencia acumulada de progresión tumoral global en pacientes con un score final de AFP  $\leq 2$  puntos fue inferior respecto a aquellos con un score de AFP final  $>2$  puntos (Figura 6 B). El modelo de AFP en su umbral de 2 puntos se asoció con un mayor riesgo de desarrollar el evento combinado en el tiempo [SHR 1.97 (IC 1.48-2.63);  $P < .0001$ ], con un índice de Harrell de 0.55 (IC 0.52-0.58).

#### 8.4. Tablas y figuras.

Tabla 1. Características de la población incluida (n=994).

<b>VARIABLE</b>	<b>Valor</b>
<b>Edad</b> , años ( $\pm$ SD)	59 $\pm$ 8
<b>Sexo masculino</b> , n (%)	737 (74.1)
<b>Diabetes mellitus</b> , n (%)	274 (27.6)
<b>Mediana de tiempo en lista de espera</b> , (IQR), meses	6.1 (2.4-10.4)
<b>Cirrosis</b> , n (%)	986 (99.2)
<b>Child Pugh</b> , n (%)	
<b>A</b>	521 (52.4)
<b>B</b>	370 (37.2)
<b>C</b>	103 (10.4)
<b>HCC de diagnóstico durante la lista de espera</b> , n (%)	117 (11.8)
<b>Etiología</b> , n (%)	
<b>Viral (HCV-HBV)</b>	546 (54.9)

<b>Alcohol</b>	169 (17.0)
<b>Colestática (CBP, CEP, CES)</b>	20 (2.0)
<b>Hígado graso no alcohólico</b>	115 (11.6)
<b>Criptogénica</b>	96 (10.0)
<b>Otras (Autoinmune, Hemocromatosis, misceláneas)</b>	39 (3.9)
<b>HCV, n (%)</b>	491 (49.4)
Previo tratamiento con Peg-Interferon, n (%)	177 (36.0)
Previo tratamiento con Boceprevir/Telaprevir, n (%)	12 (2.4)
<b>HCV y consumo de alcohol, n (%)</b>	75 (7.5)
<b>HBV, n (%)</b>	58 (5.8)
<b>HCV-HBV co-infección, n (%)</b>	7 (0.7)
<b>HIV, n (%)</b>	1 (0.1)
<b>Dentro de criterios de Milán, n (%)*</b>	814 (81.9)
<b>Modelo de AFP, n (%)*</b>	
≤2 points	830 (84.1)
>2 points	157 (15.9)
<b>Mediana de AFP, ng/ml (IQR)*</b>	10.9 (4.5-58.7)
≤100 ng/ml, n (%)	788 (79.8)
101-1000 ng/ml, n (%)	157 (15.9)
>1000 ng/ml, n (%)	42 (4.3)
<b>Puntos suplementarios de MELD, n (%)</b>	799 (80.4)

Abreviaciones: AFP: alfa-feto proteína, CBP: colangitis biliar primaria; CEP/CES: colangitis esclerosante 1ra y 2da; HBV: hepatitis B; HCV: hepatitis C; IQR: rango intercuartilo 25-75%; MELD: Modelo de Enfermedad Terminal Hepática.

Tabla 2. Análisis de riesgos competitivos en relación al evento primario de delistamiento por progresión del HCC en lista de espera.

<b>VARIABLE</b>	<b>Delistamiento por HCC (%)</b>	<b>SHR Crudo (95% CI)</b>	<b>P</b>	<b>SHR Ajustado (95% CI)</b>	<b>P</b>
<b>Edad, años</b>		1.01 (0.98;1.03)	0.36		
<b>Sexo</b>					
Masculino (n=737)	10.2				
Femenino (n=257)	14.0	0.70 (0.47;1.04)	0.08	0.75 (0.50;1.14)	0.18
<b>Diabetes mellitus</b>					
Si (n=274)	9.8				
No (n=729)	11.7	0.82 (0.53;1.27)	0.38		
<b>Child Pugh</b>					
A (n=521)	12.9	-	-		
B (n=370)	10.3	0.80 (0.54;1.19)	0.27		
C (n=103)	5.8	0.44 (0.19;1.01)	0.05		
<b>HCV</b>					
Si (n=491)	12.8				
No (n=503)	9.5	1.40 (0.96;2.03)	0.08	1.22 (0.81;1.87)	0.33
<b>HBV</b>					
Si (n=58)	17.2				
No (n=936)	10.8	1.53 (0.82;2.86)	0.18	1.63 (0.85;3.14)	0.14
<b>MELD suplementario</b>					
Si (n=799)	8.8				
No (n=195)	21.0	0.35 (0.24;0.51)	<.0001		

<b>Número de nódulos HCC</b>					
1-3 nódulos (n=954)	10.8				
≥4 nódulos (n=39)	20.5	2.04 (1.01;4.10)	0.04	1.30 (0.92;1.79)	0.13
<b>Diámetro del nódulo mayor</b>					
≤30 mm (n=578)	9.2	-	-	-	-
31-60 mm (n=383)	12.5	1.45 (0.99;2.14)	0.06	1.33 (0.89;1.99)	0.16
>60 mm (n=33)	30.3	3.88 (1.98;7.60)	<.0001	3.37 (1.61;7.05)	0.001
<b>AFP ng/ml</b>					
≤100 (n=788)	8.2	-	-	-	-
101-1000 (n=157)	21.7	2.90 (1.92;4.38)	<.0001	2.66 (1.73;4.09)	<.0001
>1000 (n=42)	23.8	3.55 (1.78;7.06)	<.0001	2.79 (1.36;5.72)	0.005
<b>Tratamiento puente en lista</b>					
Yes (n=666)	13.1	1.79 (1.13;2.82)	0.012	1.45 (0.90;2.35)	0.12
No (n=328)	7.3				

Abreviaciones: AFP: alfa-feto proteína, HBV: hepatitis B; HCV; hepatitis C; MELD: Modelo de Enfermedad Terminal Hepática.

Figura 1. Población incluida.

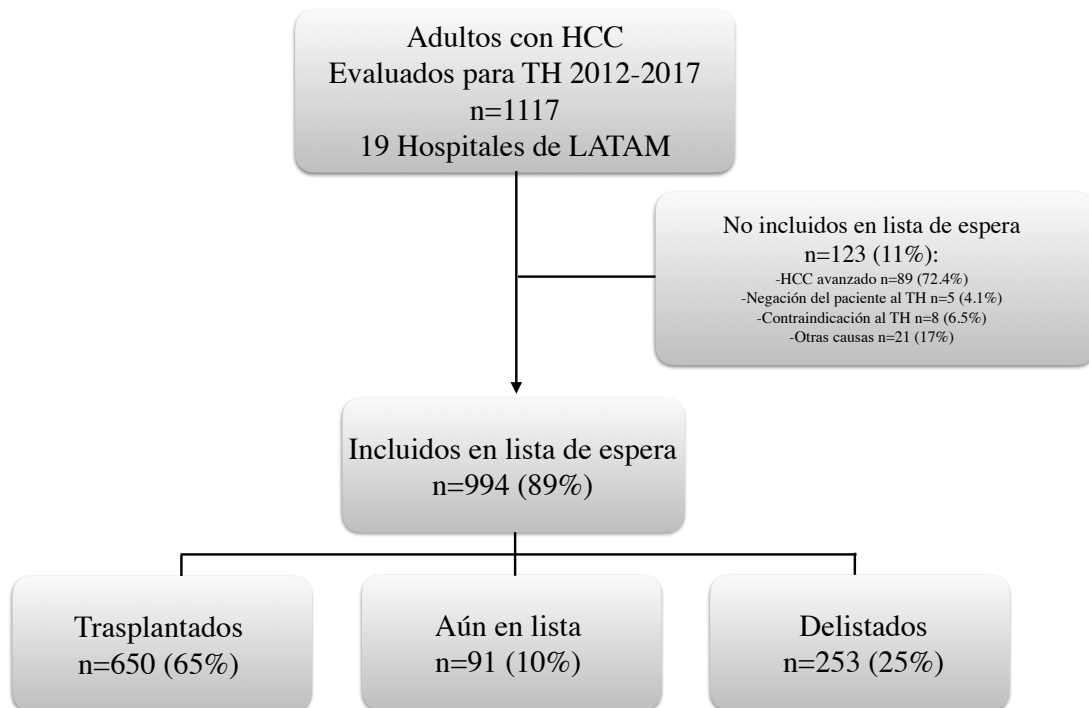


Figura 2. Incidencia acumulada de delistamiento o dropout por progresión del HCC.

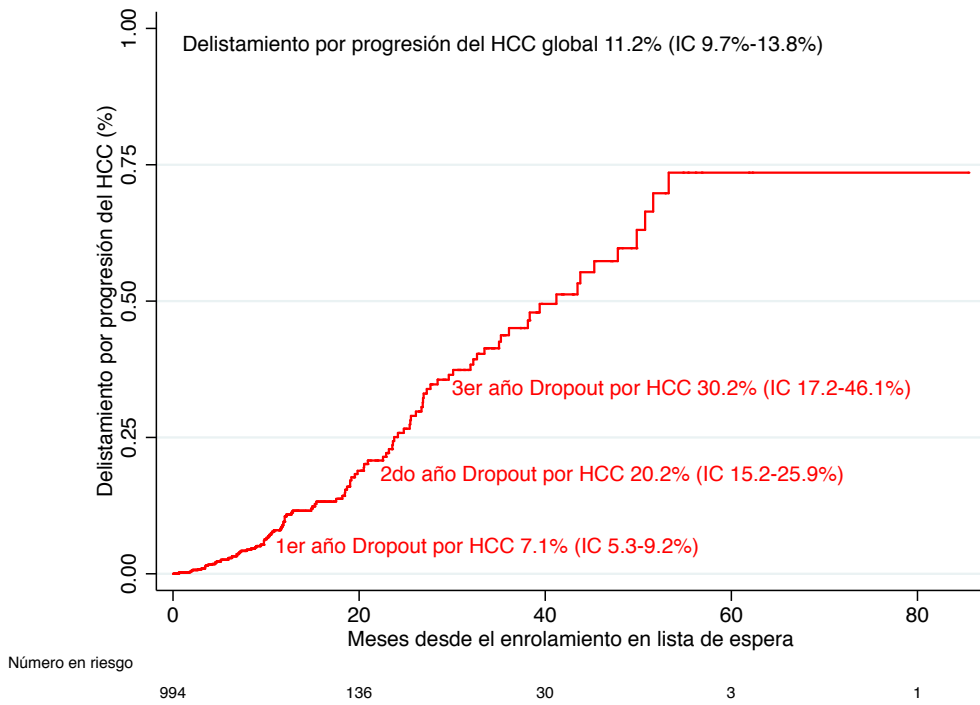


Figura 3. Sobrevida global desde el enrolamiento en lista de espera en aquellos con o sin delistamiento por progresión tumoral del HCC.

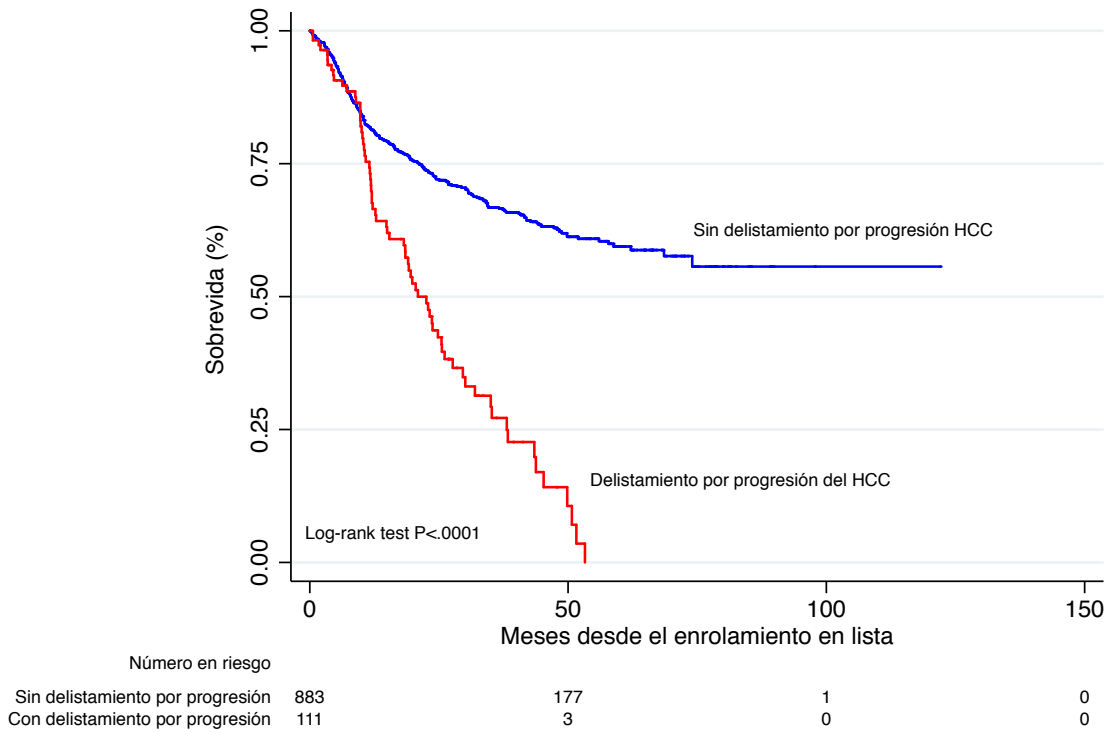
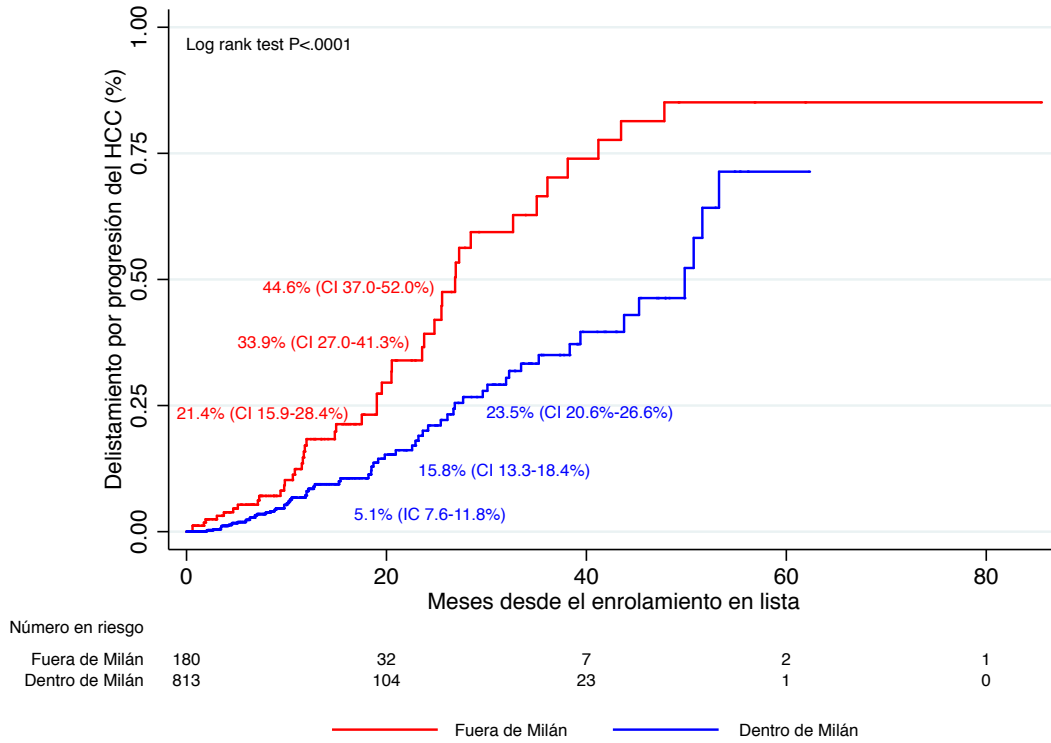
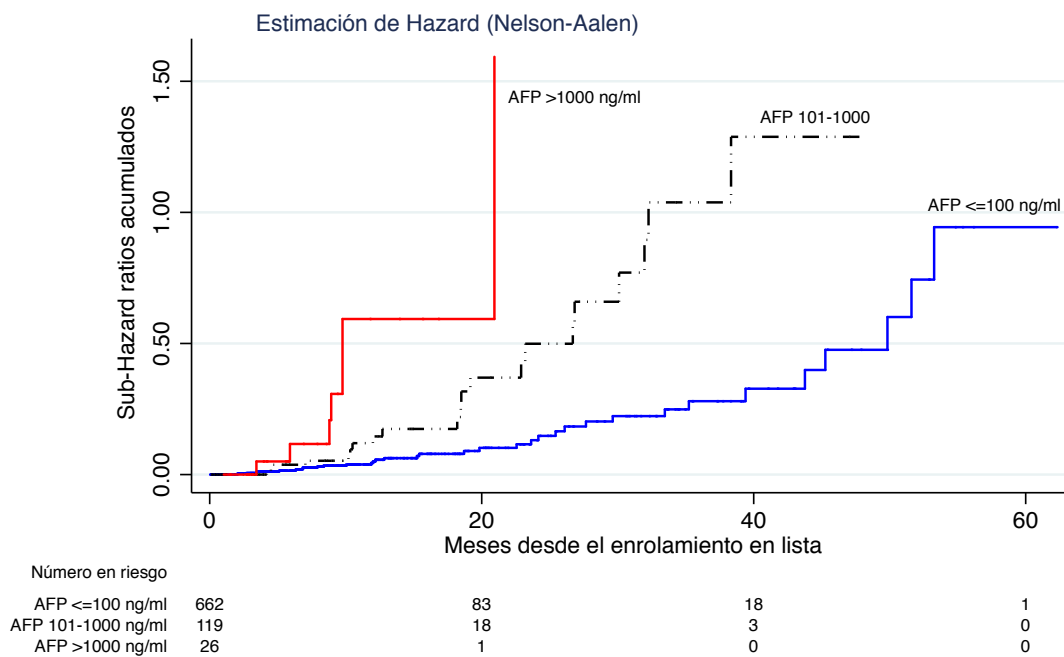


Figura 4. Incidencia acumulada de delistamiento por progresión tumoral de acuerdo a los criterios de Milán (A) y en aquellos dentro de Milán estratificados por valores de AFP (B).

A.



B.

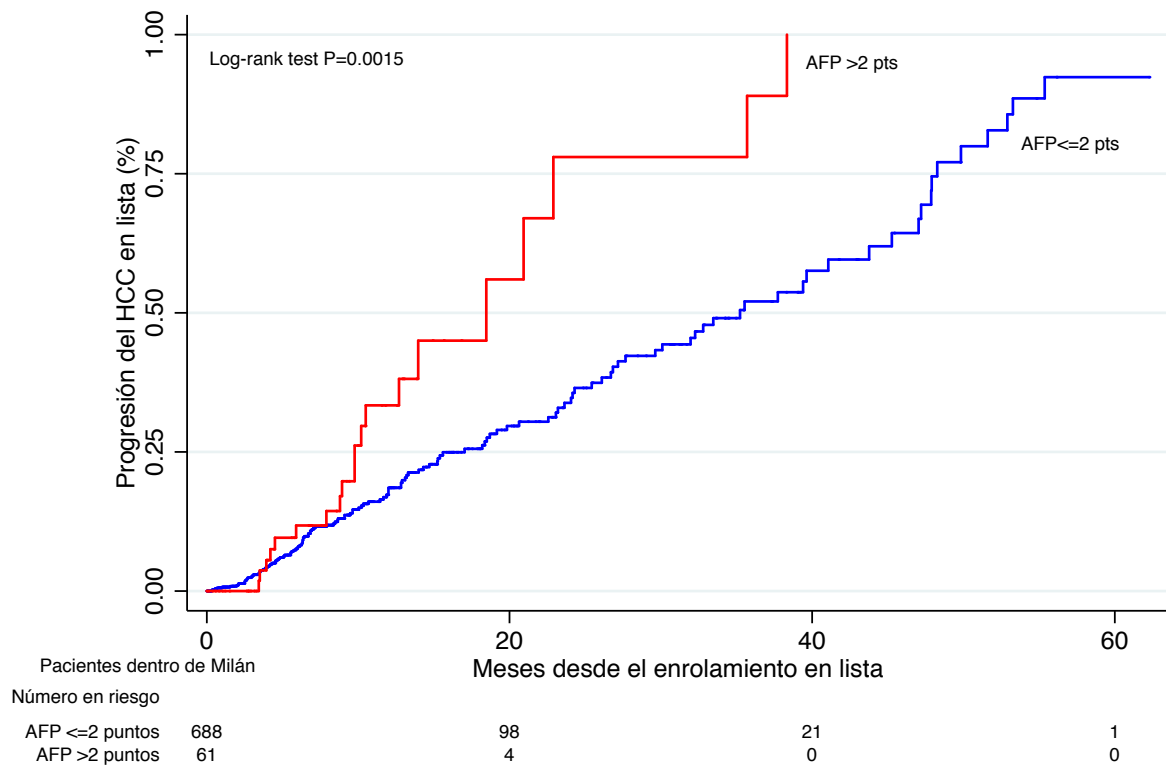




Nota: el riesgo de delistamiento por progresión del HCC en lista de espera fue incrementándose de acuerdo a valores de AFP  $\leq 100$  ng/ml (referencia), AFP 101-1000ng/ml [SHR 3.41 (IC 2.01-5.80)] y  $> 1000$  ng/ml [SHR 6.08 (IC 2.63-14.05)].

Figura 5. Incidencia acumulada de delistamiento por progresión tumoral en pacientes dentro de criterios (A) o fuera (B) de Milán, estratificados por el modelo de selección de AFP o Francés.

A.



B.

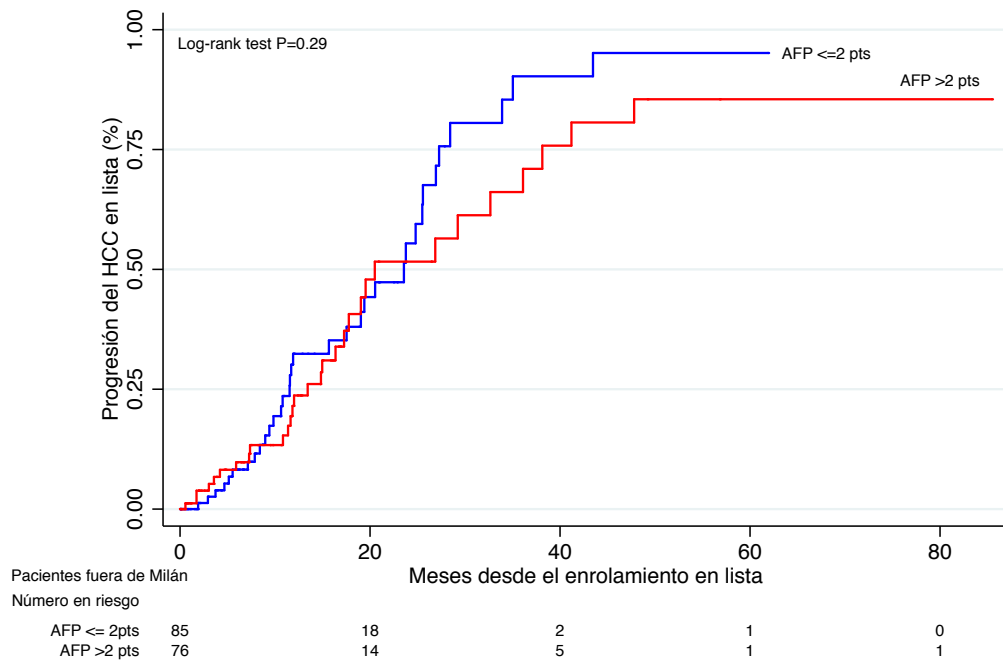
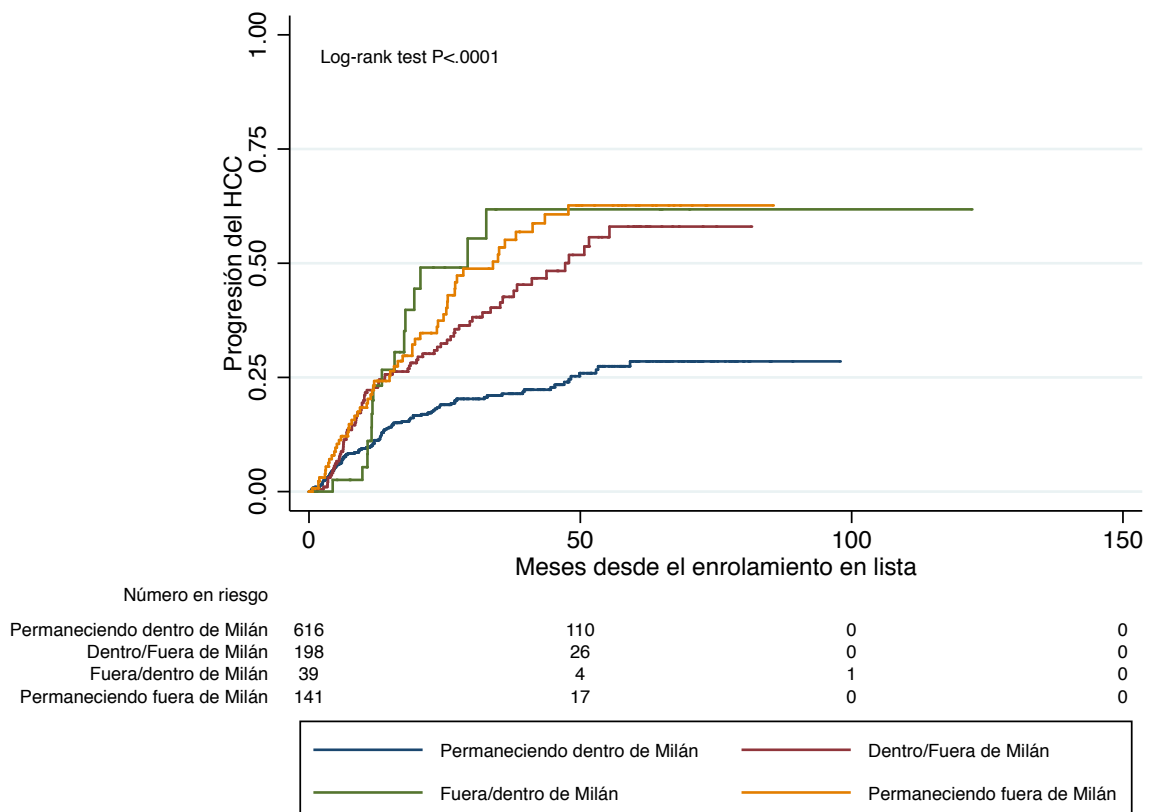


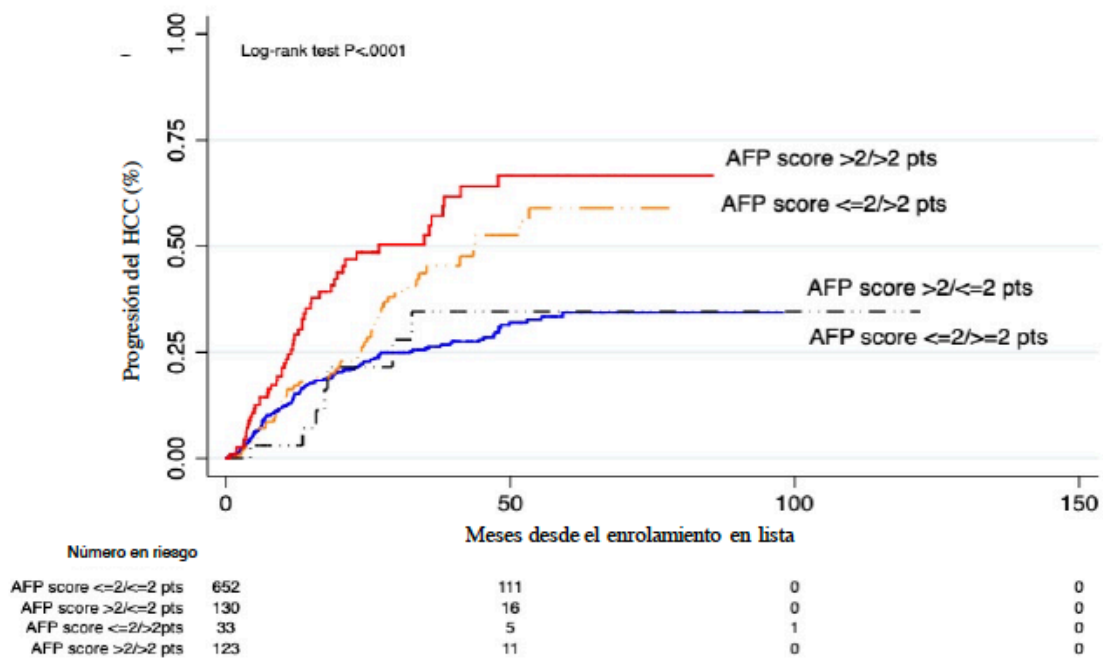
Figura 6. Incidencia acumulada de progresión tumoral global (progresión en lista o recurrencia post trasplante) de acuerdo a cambios dinámicos de criterios de Milán (A) o del modelo de selección Francés (B).

A.



Nota: el riesgo de progresión tumoral global fue superior en aquellos pacientes que progresaron fuera de Milán [SHR 2.20 (IC 1.65-2.95); P<.0001], redujeron su límite tumoral desde fuera hacia dentro de Milán [SHR 2.50 (IC 1.51-4.12); P<.0001] y se mantuvieron fuera de Milán [SHR 2.74 (IC 1.99-3.77); P<.0001]], respecto a aquellos pacientes que se mantuvieron dentro de criterios de Milán.

B.



Nota: el riesgo de progresión tumoral global fue superior en aquellos pacientes que incrementaron su score de AFP de  $\leq 2$  a  $>2$  puntos [SHR 1.66 (IC 1.22-2.26); P=0.001], o se mantuvieron con un score  $>2$  puntos [SHR 2.55 (IC 1.85-3.50); P<.0001], mientras que no hubo diferencias en aquellos que redujeron su score de AFP de  $>2$  a  $\leq 2$  puntos [SHR 0.89 (IC 0.42-1.85); P=75], su respecto a aquellos pacientes que mantuvieron un score de AFP  $\leq 2$  puntos.

### 8.5. El factor etiológico y otras co-intervenciones.

*Análisis del efecto de la co-intervención con DAA para la hepatitis C.*

En relación a la etiología, 50.6% eran HCV- (n=503), 32.9% eran HCV+ nunca

tratados con DAAs (n=327) y 16.5% (n=164) eran HCV+ tratados con DAAs pre (n=66) o post trasplante hepático (n=98). De los pacientes tratados con DAA antes o posterior al TH (n=164), 43.1% tenían genotipo de la HCV 1b, seguido de genotipo 1a 26.6%, genotipo 3 23.7%, genotipo 2 5.9% y genotipo 4 0.7%. Los pacientes con genotipo 3 fueron más frecuentemente tratados en el pre TH. El régimen de DAA más comúnmente utilizado fue sofosbuvir/daclatasvir en el 68.3% (n=112), luego paritaprevir/ritonavir/ombitasvir/dasabuvir en el 12.2% (n=20) y sofosbuvir/ledipasvir en el 6.7% de los pacientes (n=11). La erradicación viral con DAA o respuesta virológica sostenida fue del 89.8% (IC 81.0-97.1%), sin diferencias entre el pre TH [90.6% (CI 83.9-94.1%)] o después del TH [89.2% (CI 80.4-94.9%)]. La mayoría recibió un esquema de tratamiento de 12 semanas y el uso de ribavirina fue del 34.8% (n=57).

Durante el tiempo en lista de espera, 13.6% de los pacientes con HCV recibieron tratamiento antiviral con DAA (n=66) y 86.6% no recibieron (n=425). La mediana en tiempo en lista de espera fue más larga en aquellos tratados con DAA pre-TH. La incidencia de progresión tumoral en lista de espera fue similar en aquellos tratados con DAA [26.2% (CI 15.8%;39.1%)] comparándose con aquellos que no lo recibieron [26.9% (CI 22.5%;31.6%); P=0.47] y similar incidencia de delistamiento por progresión del HCC en lista [12.1% (CI 0.4-8.1%) versus 12.9% (CI 3.8-27.2%)], respectivamente. La progresión extrahepática del HCC no fue diferente entre ambos [4/66 (6.1%) vs 17/425 (4%); P=0.12].

Los SHR estimados demostraron que el efecto del tratamiento de la HCV con DAA en la progresión del HCC en lista de espera no fue significativo cuando se lo comparó con el grupo de pacientes HCV negativos [SHR 1.0 (CI 0.6;1.6); P=0.86] y cuando se lo comparó con aquellos HCV+ que no recibieron DAA, ajustado por variables tumorales, AFP y tratamiento puente locorregional en lista

de espera [SHR 0.7 (CI 0.4;1.1); P=0.17].

Finalmente, evaluamos el efecto de los DAA ajustado por el score de probabilidad o *propensity score matching* (sexo masculino, año de enrolamiento en lista antes/después del 2015, Child Pugh, HCC de diagnóstico en lista de espera, extensión tumoral, tratamiento locorregional y país de origen) (Tabla 3). El modelo multivariable de regresión logística para evaluar el Odds de haber recibido DAA en HCV+ tuvo adecuada calibración y un poder de discriminación de ROC 0.86 (IC 0.82-0.89) (Figura 6 A). La media del score de probabilidad y cada variable estuvo balanceada en cada bloque del score de probabilidad (Figura Suplementaria 6 B). El tratamiento con DAA no se asoció con mayor progresión en lista de espera en HCV+ luego de ajustar el efecto con el score de probabilidad y macheo de variables [SHR 0.9 (IC 0.6;1.6); P=0.95] (Figura 7).

Tabla 3. Score de probabilidad o *propensity score* de haber recibido antivirales de acción directa para la hepatitis C durante el tiempo en lista de trasplante hepático (DAA).

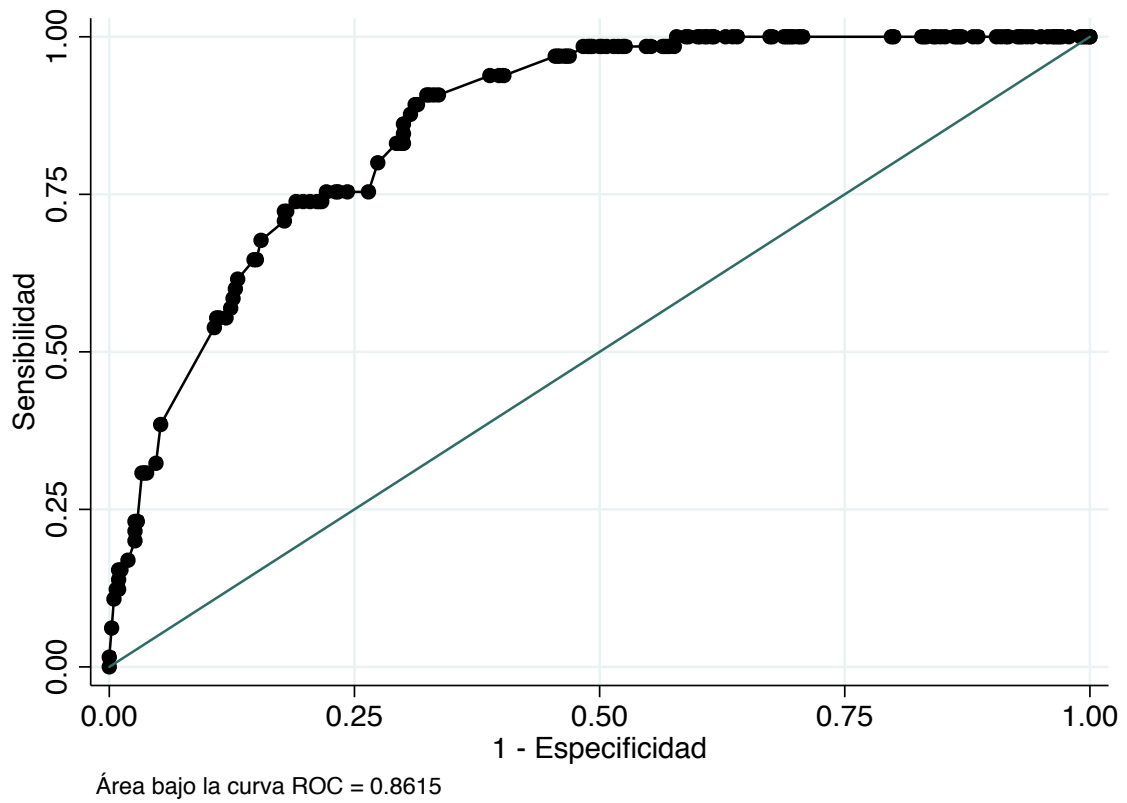
VARIABLE	DAA (%)	OR crudo (95% CI)	P	OR ajustado (95% CI)	P
<b>Edad (años)</b>		1.0 (0.9;1.04)	0.79		
<b>Sexo</b>					
Masculino (n=351)	15.1	1.7 (1.07;3.3)	0.09	2.5 (1.1;5.4)	0.02
Femenino (n=140)	9.3				
<b>País</b>					
Argentina (n=197)	23.9	-	-	-	-
Uruguay (n=19)	15.8	0.6 (0.2;2.1)	0.43	1.5 (0.3;6.7)	0.56
Chile (n=24)	4.2	0.1 (0.02;1.05)	0.06	0.1 (0.01;0.8)	0.03
Brazil (n=180)	3.3	0.1 (0.04;0.3)	<.01	0.1 (0.01;0.4)	<.01
Mexico (n=18)	27.8	1.2 (0.4;3.6)	0.71	1.5 (0.4;5.2)	0.52
Peru (n=5)	20.0	0.8 (0.1;7.3)	0.84	0.7 (0.1;5.4)	0.68
Colombia (n=45)	4.4	0.1 (0.03;0.6)	0.01	0.1 (0.03;0.7)	0.01
Ecuador (n=3)	33.3	1.6 (0.1;18.0)	0.70	2.4 (0.2;36.4)	0.52
<b>DBT mellitus</b>					
Si (n=84)	8.3	0.5 (0.2;1.2)	0.14		
No (n=407)	14.5				
<b>Child Pugh</b>					

A (n=280)	11.8	-	-	-	-
B (n=166)	16.9	1.5 (0.9;2.6)	0.13	1.5 (0.7;2.9)	0.3
C (n=45)	11.1	0.9 (0.3;2.5)	0.89	0.3 (0.1;1.2)	0.09
<b>Año de enrolamiento en lista</b>					
Previo al 2015 (n=245)	2.9				
Luego del 2015 (n=246)	21.9	5.5 (2.8;10.5)	<.01	7.5 (3.4;16.6)	<.01
<b>Enlistado por HCC</b>					
(n=437)	10.8				
<b>HCC en lista de espera</b>	35.2	4.5 (2.4;8.5)	<.01	5.7 (2.3;14.2)	<.01
(n=54)					
<b>Dentro de Milán</b>					
Si (n=397)	10.6				
No (n=94)	14.1	0.7 (0.3;1.5)	0.38		
<b>Modelo de AFP</b>					
≤2 puntos (n=398)	15.3				
>2 puntos (n=90)	4.4	0.3 (0.09;0.7)	0.01	0.2 (0.05;0.6)	<.01
<b>Tratamiento puente</b>					
Si (n=282)	72.7	2.2 (1.2;3.9)	<.01	2.4 (1.2;5.0)	0.01
No (n=209)	27.3				

NOTA: La calibración del modelo demostró que no hubo diferencias significativas entre valores observados y esperados (Hosmer-Lemeshow test P=0.79) y el poder de discriminación presentó una curva ROC de 0.86 (IC 0.82-0.89). Abreviaciones: OR: odds ratio.

Figura 6. Poder de discriminación del modelo de probabilidad de recibir DAA en pacientes con HCV: (A). Curva ROC 0.86 (IC 0.82-0.89); y balance previo y posterior al macheo (B).

A.



B.

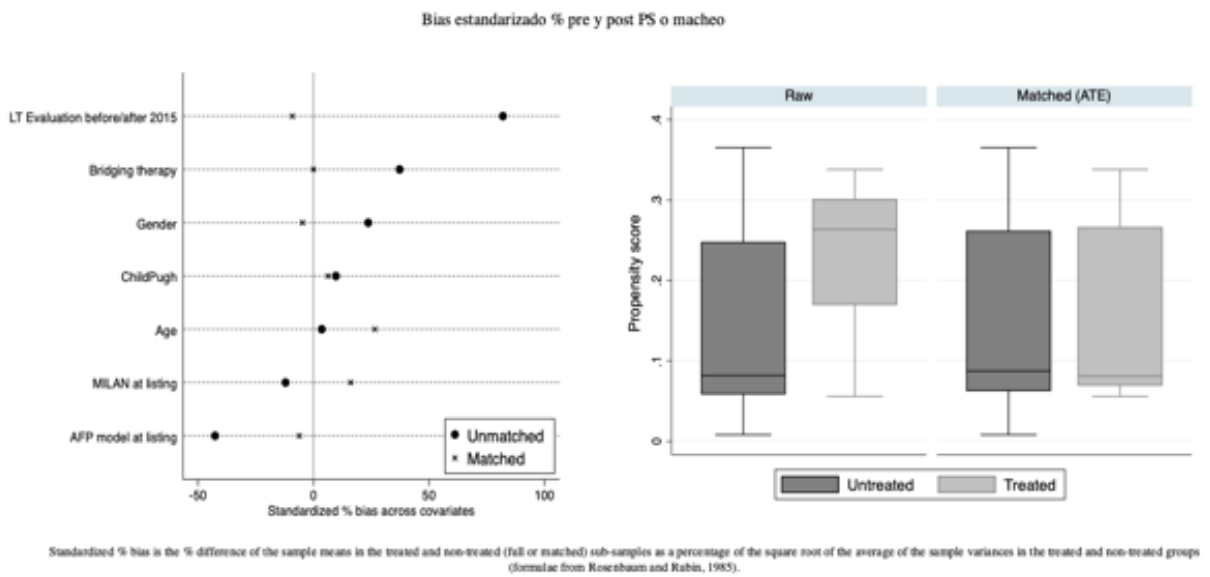
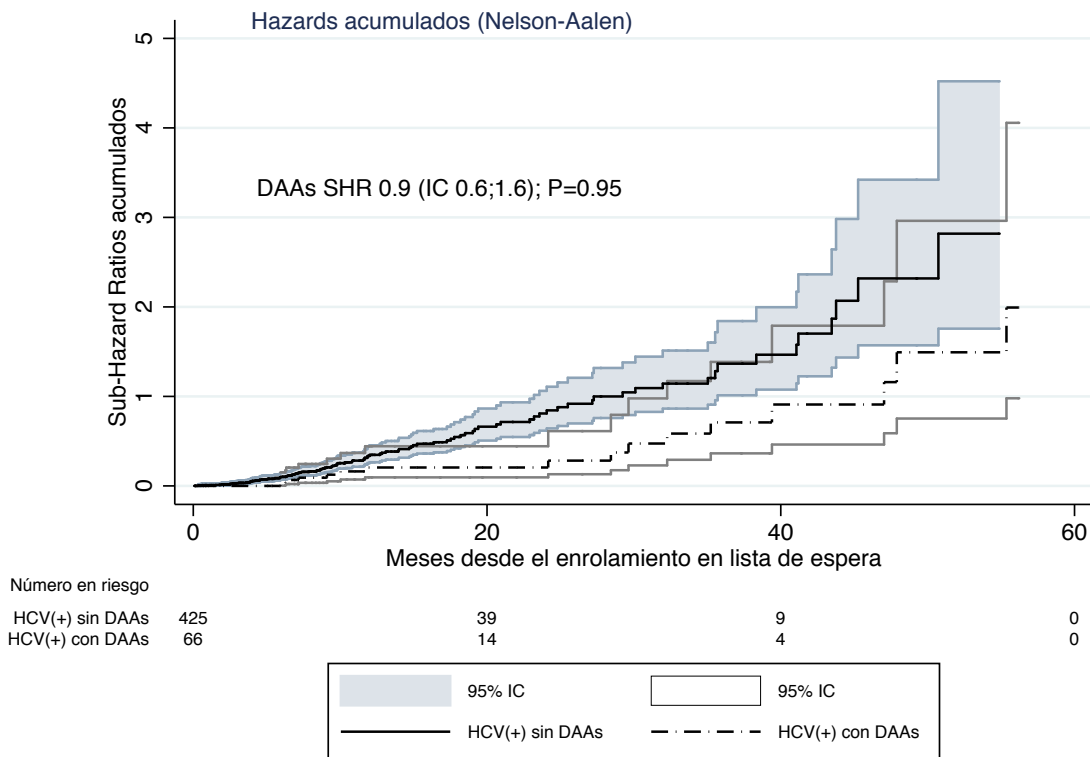


Figura 7. Incidencia acumulada de progresión tumoral en pacientes con HCV (con y sin DAAs).



## 8.6. Discusión.

En esta etapa, evaluamos el efecto y la incorporación de la AFP en modelos de selección, como herramienta para la identificación de una población con mayor riesgo de progresión y delistamiento por progresión del HCC. Esta es la primer gran cohorte Latino Americana que ha evaluado estos resultados, de manera multicéntrica, no reportados previamente.

Observamos que del total de inscriptos en lista de espera, casi dos tercios lograron acceder al trasplante y casi un tercio fue delistado, en su gran mayoría por progresión del HCC. La gran mayoría de la población se encontraba dentro de criterios de Milán y con niveles de AFP por debajo de 100 ng/ml. Un poco más de la mitad de la cohorte recibió tratamiento locorregional como puente al trasplante hepático, para una mediana de tiempo en lista de espera de seis meses.



La incidencia global de progresión radiológica a 1 y 2 años de enrolamiento en lista fue similar a la reportada en otras series (7% y 20%, respectivamente). Sin embargo, observamos que el delistamiento por progresión tumoral (7% al año), prioritariamente invasión vascular o extrahepática o compromiso infiltrativo difuso, fue algo menor a la reportada previamente en Argentina (4% al año)(46). En Italia, se ha observado un delistamiento por progresión tumoral del 19.9% a 12 meses (73,87).

El riesgo de progresión y delistamiento fue superior en pacientes fuera de Milán. Resultados similares se han observado en otros estudios observacionales. Se ha reportado un delistamiento por progresión tumoral en pacientes fuera de Milán del 13.6% en una cohorte de la Universidad de Toronto (30). Observamos que un diámetro tumoral mayor de seis centímetros y valores de AFP por encima de 100 o 1000 ng/ml se asociaron con mayor riesgo de delistamiento por progresión tumoral. C Toso y colaboradores propusieron un score de predicción de riesgo de delistamiento, que incluye el número y diámetro de tumores, los valores de AFP y el score de MELD (80).

Por otro lado, en pacientes dentro de Milán, observamos que los valores de AFP >100 ng/ml y >1000 ng/ml identifican subgrupos con mayor riesgo de delistamiento por progresión tumoral. En contra parte, en otras series se ha observado que aquellos pacientes con nódulos únicos <3 cm con niveles de AFP <20 ng/ml, presentan un riesgo de progresión tumoral a 12 meses inferior al 1%, en particular si presentan respuesta completa al tratamiento locorregional como puente al trasplante (70). Estos dos extremos identificarían dos poblaciones, la primera, asociada a mayor riesgo de progresión y la segunda, a un menor riesgo. Esto podría ser útil en la implementación o acreditación de puntaje suplementario de MELD para el trasplante hepático.

Finalmente, evaluamos como el modelo de selección Francés o AFP, predice progresión radiológica y delistamiento por progresión tumoral en lista de espera. Esto no ha sido reportado previamente. En efecto, este modelo fue diseñado para categorizar el riesgo de recurrencia post trasplante hepático. En el global de la cohorte, un score de AFP  $>2$  puntos se asoció con un riesgo 3 veces superior respecto a aquellos pacientes con un score  $\leq 2$  a puntos; particularmente dentro de pacientes de Milán. La concordancia estadística mediante el índice de Harrell del modelo de AFP para la discriminación de delistamiento por progresión tumoral fue de 0.61, inferior a la reportada por Duvoux y col en su diseño original para la asociación de este modelo con recurrencia post trasplante hepático (22). Luego de cambios dinámicos en lista de espera, aquellos pacientes con un score de AFP  $\leq 2$  a puntos presentaron menor riesgo de desarrollar el evento combinado progresión tumoral o recurrencia post trasplante hepático. Si bien el poder de discriminación del modelo de AFP para el evento combinado fue aún menor (0.55), esto posiblemente se deba al corto tiempo en lista de espera y al menor número de eventos de recurrencia post trasplante hepático.

Finalmente, evaluamos el efecto de otra co-intervención en la progresión tumoral en lista de espera. El tratamiento antiviral de la hepatitis C con DAA en pacientes con HCC que aguardaban un trasplante hepático, no se asoció a un mayor riesgo de progresión tumoral, ajustada por variables basales y por la probabilidad de haber recibido dicho tratamiento a través de un matcheo de variable desbalanceadas.

### **8.7. Limitaciones.**

En esta etapa, si bien no hubo una revisión centralizada de las imágenes, intentamos que la re evaluación de imágenes luego del tratamiento

locorregional sea acorde a criterios RECIST 1.1 y no RECIST modificados (69) y evaluamos el tipo de progresión (86). Finalmente, si bien hemos evaluado la calibración y discriminación del modelo de AFP en un escenario previamente no evaluado (progresión y delistamiento), lo hemos realizado mediante regresión Cox y no mediante riesgos competitivos (Wolbers).

### **8.8. Conclusiones de este capítulo.**

El delistamiento por progresión tumoral observada en esta cohorte Latino Americana fue similar a la reportada en la literatura. En esta etapa observamos que en pacientes con HCC enrolados en lista de trasplante hepático, el valor de AFP mayor a 100 o mayor de 1000 se asocia con un mayor riesgo de progresión tumoral en lista de espera y delistamiento de trasplante; en particular en pacientes dentro de Milán. Asimismo, el score de AFP se asocia con un mayor riesgo de progresión tumoral en lista de espera y delistamiento de trasplante. Aun así, aquellos pacientes con una reducción de su score inicial mayor de 2 puntos hacia menor o igual a 2 puntos, el riesgo de progresión o recurrencia post trasplante disminuye y es similar a aquellos que originalmente se presentaban con un score menor o igual a 2 puntos al enrolamiento en lista de espera.

## **9. Capítulo 4. Evaluar la optimización de selección de candidatos a estrategias de reducción de estadio o downstaging mediante la incorporación de AFP en un estudio multicéntrico transcontinental: cohortes Latinoamericana, Italiana, Belga y Francesa.**

En esta etapa nos focalizamos en responder las siguientes preguntas de investigación:

- a)- En pacientes con hepatocarcinoma y trasplante hepático fuera de criterios de Milán, ¿existe un límite tumoral para los criterios de reducción de estadio o downstaging?
- b)- En pacientes fuera de criterios de Milán con intención de downstaging, ¿la incorporación de la AFP es útil en la selección de candidatos a esta estrategia?

### **9.1. Objetivos.**

El objetivo de este capítulo de tesis Doctoral fue evaluar el efecto del tratamiento locorregional como puente al trasplante hepático en los resultados post trasplante, y por primera vez, testear de manera externa el protocolo UCSF-DS fuera de los Estados Unidos en una cohorte extensa multicéntrica, comparando el protocolo UCSF-DS con pacientes dentro de Milán. Asimismo, investigamos el grupo AC, de acuerdo a la controversia de la existencia o no de un límite tumoral para reducción tumoral, y finalmente, evaluamos variables asociadas con mejor pronóstico post trasplante en el grupo elegible para downstaging.

### **9.2. Pacientes y Métodos.**

*Diseño, centros participantes y criterios de elegibilidad.*

Este fue un estudio de cohorte retrospectiva, multicéntrica, transcontinental,

que incluyó pacientes con HCC y trasplante hepático en 47 centros de Europa y Latino América. Para este propósito, 4 bases de datos fueron integradas y coordinadas por el Hospital Universitario Austral, siendo responsable del registro, integración y análisis de los datos. El registro incluyó pacientes trasplantados de hígado por HCC en distintos centros de Francia (n=4), Italia (n=10) y Bélgica (n=11) entre los años 2000 y 2018 y de centros de Argentina, Uruguay, Chile, Brasil, Ecuador, Colombia y Méjico entre los años 2005 y 2018.

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las guías para estudios observacionales (STROBE) (52). El comité de ética institucional de cada centro aprobó el protocolo para el registro de datos de manera confidencial, de acuerdo a estándares internacionales y a la declaración de Helsinki, revisada en el 2008. Este estudio se registró públicamente (NCT03775863; [www.clinicaltrials.com](http://www.clinicaltrials.com)).

Incluimos pacientes adultos (>17 años de edad) que recibieron un primer TH, y fueron tratados con terapia locorregional como puente al trasplante. Excluimos aquellos pacientes que: 1) presentaron hallazgo incidental de HCC en el análisis anátomo patológico del explante y 2) presentaron otros tumores distintos a HCC en el explante.

#### *Grupos de reducción tumoral o downstaging y otras variables de exposición.*

Se registraron las siguientes variables en cada centro de trasplante: características demográficas, tamaño y número tumoral y valores de AFP en suero al diagnóstico, al enrolamiento en lista de espera y a la última evaluación pre trasplante, si disponible. Los criterios de Milan y el score de AFP fueron los estándares de selección, pero de acuerdo a reglas de alocación local, pacientes excediendo dichos límites con intención de reducción de estadio

fueron enrolados. Los valores de AFP se categorizaron de acuerdo a lo propuesto por Duvoux C, y col (22).

Se agruparon los pacientes al enrolamiento en lista en tres grupos: a) dentro de Milán, b) fuera de Milán pero dentro del protocolo de UCSF-DS, y c) "sin-límites" o restricción (fuera de UCSF-DS). El grupo UCSF-DS se definió de acuerdo a lo previamente reportado en la literatura: a) lesión única  $\leq 8$  cm, b) 2 ó 3 lesiones, cada una  $\leq 5$  cm y la suma total de diámetros  $\leq 8$  cm, y c) 4-5 lesiones cada una  $\leq 3$  cm y la suma total de diámetros  $\leq 8$  cm (34). Adicionalmente, ausencia de invasión macrovascular o extrahepática.

Por otro lado, evaluamos cambios longitudinales de límites tumorales y de valor de AFP luego del tratamiento con terapias locorreionales anti tumorales. Estas terapias puente al trasplante se realizaron y se decidieron de manera local en cada caso en particular. En todos los pacientes que recibieron estas terapias puente durante el tiempo en lista de espera, la última evaluación radiológica y valores de AFP fueron incluidos.

El downstaging exitoso se definió cuando los límites tumorales pasaban a estar fuera a dentro de criterios de Milán, de acuerdo al refuerzo arterial residual de cada lesión luego del efecto de tratamientos locorreionales.

Las variables incluidas del análisis de anatomía patológica en el explante fueron el número y diámetro tumoral, la presencia de invasión macro o microvascular y el grado de diferenciación nuclear de acuerdo a la clasificación de Edmonson y Steiner. Las lesiones necróticas fueron evaluadas y sus diámetros de porción necrótica y viable registradas. Se aplicaron los criterios de Milán también en el explante.

*Eventos de interés y análisis estadístico.*

El evento primario de interés analizado fue la recurrencia post trasplante hepático del hepatocarcinoma. El diagnóstico de la misma se realizó de acuerdo a criterios imagenológicos, valores de AFP y resultado de anatomía patológica (en caso de biopsia tumoral). Los eventos secundarios fueron la proporción de downstaging exitoso, la proporción de discordancia entre imágenes pre-trasplante y datos del explante, la proporción de invasión microvascular y desdiferenciación, y la supervivencia global desde el trasplante. Se definió downstaging exitoso cuando un paciente fuera de Milán fue finalmente incorporado a dichos criterios luego del tratamiento locorregional. Se compararon todos estos eventos entre los pacientes dentro de Milán, aquellos dentro del protocolo UCSF-DS y aquellos "sin límites". Todos los pacientes fueron seguidos hasta el fallecimiento o última visita clínica.

Los datos categóricos se reportan en proporciones y se compararon con el test de Chi<sup>2</sup> o el test de Fisher, según corresponda. Las variables continuas se presentan en medias ( $\pm$  desvío estándar) o medianas (rango intercuartilo 25-75% -IQR) y fueron comparadas con el test de Student o Wilcoxon Rank-sum test, de acuerdo a su distribución paramétrica o no paramétrica, respectivamente. Para variables categóricas ordinales, se reportaron en dummies. Las comparaciones múltiples para datos paramétricos y no paramétricos se realizó con test de ANOVA (comparación de medias) o test de Kruskal Wallis (comparación de medianas).

Para el análisis de supervivencia y tablas de incidencia acumulada, se realizó el método de Kaplan Meier y se compararon mediante el test de log-rank (Mantel-Cox). Se realizó un análisis multivariable de riesgos proporcionales de regresión Cox, estimando la medida de efecto de cada variable con el evento de interés reportándose respectivos HR y sus respectivos IC95%. Para la construcción de

modelos multivariantes, se incluyeron variables que en el análisis univariado presentaban un valor de  $P < .05$ , evaluando su incorporación paso a paso, evaluando su asociación con el evento primario (test de Wald) y su efecto confundidor con otras variables explicativas ( $>20\%$  de cambio en el HR crudo). Con el fin de evitar el sobre ajuste del modelo u *overfitting*, se incluyó una variable cada 10 eventos de interés en cada modelo multivariable final. La asunción de riesgo proporcional se evaluó en cada modelo mediante test gráficos y estadísticos (test de residuos de Schoenfeld) y su performance fue evaluada mediante curvas de eventos esperados versus observados (calibración) y el test de Harrells (discriminación).

Finalmente, debido a que el análisis de regresión Cox puede sobre estimar los riesgos o las asociaciones en presencia de eventos que compiten con el desarrollo del evento primario (en este caso, muerte previo al desarrollo de recurrencia), ocultando el desarrollo del evento de interés y por lo tanto, induciendo un sesgo de selección, realizamos un análisis de eventos competitivos para el evento primario (32). Se estimaron los SHR y sus respectivos IC95%. Todos los análisis se realizaron utilizando STATA 13.0.

### **9.3. Resultados.**

Un total de 2444 pacientes fueron incluidos, 55.5% de Europa ( $n=1356$ ) y 44.5% de Latino América ( $n=1085$ ). Participaron 20 centros de Francia ( $n=352$ ), 4 de Italia ( $n=480$ ), 6 de Bélgica ( $n=524$ ), 5 de Argentina ( $n=325$ ), 4 de Brasil ( $n=376$ ), 3 de Chile ( $n=90$ ), 2 de Colombia ( $n=157$ ), 2 de Méjico ( $n=63$ ) y 1 centro de Ecuador ( $n=13$ ), Perú ( $n=26$ ) y Uruguay ( $n=35$ ).

*Características demográficas y tumorales de pacientes que recibieron terapia*



*locorregional.*

Globalmente, 70.1% de los pacientes recibieron al menos 1 terapia locorregional pre trasplante (n=1711). Al enrolamiento en lista, el 80.1% de estos pacientes estaba dentro de criterios de Milán (n=1370), 12.3% dentro de UCSF-DS (n=211) y 7.6% "sin límite" (n=130). No hubo diferencias significativas entre los grupos respecto a la edad, el score de Child Pugh, la etiología de enfermedad hepática (más frecuentemente viral), mediana de tiempo en lista y mediana de tiempo desde el último tratamiento locorregional al trasplante.

El límite tumoral (número de nódulos y tamaño de la lesión mayor) fue significativamente mayor en el grupo UCSF-DS y "sin límites" respecto a aquellos dentro de Milán. La mediana de AFP al enrolamiento en lista no fue diferente entre grupos, mientras que la proporción de pacientes con un valor de AFP superior a 1000 ng/ml fue mayor en los grupos UCSF-DS y "sin límites". La gran mayoría de los pacientes recibieron TACE (85.8%) y menos frecuentemente RFA (20.5%) o PEI (7.2%) o resección quirúrgica pre trasplante (6.2%). La proporción del uso de TACE, RFA y resección hepática no fue diferente entre grupos. En el grupo UCSF-DS, la PEI fue más frecuentemente realizada.

En el análisis del explante, se observó un incremento en la frecuencia de invasión microvascular desde aquellos pacientes dentro de Milán (22.8%), comparado con aquellos dentro de UCSF-DS (32.7%) y "sin límites" (40.0%) (P<.0001). La proporción de pacientes finalmente dentro de Milán en el explante fue de 69.3%, 42.6% y 25.4% en grupos Milán, UCSFD-DS y "sin límites", respectivamente. No hubo diferencias significativas entre los grupos respecto a la presencia de tumores desdiferenciados (Tabla 1).

Los pacientes que recibieron terapia puente locorregional eran más añosos, presentaron una mediana de tiempo en lista de espera más larga, mayor

proporción de preservación de función hepática y menos frecuentemente etiología alcohólica, cuando se los comparó con pacientes que no recibieron terapia locorregional. Se observaron diferencias en el análisis del explante entre ambos grupos (Tabla suplementaria 1).

*Resultados en pacientes con terapia locorregional acorde grupos pre trasplante.*

Siguiendo un análisis por intención de tratar, los resultados post trasplante luego del tratamiento locorregional fue significativamente diferente entre grupos al enrolamiento en lista de espera. Se observó un incremento de la incidencia de recurrencia post trasplante a 5 años desde los pacientes dentro de Milán [17.6% (IC 14.8-20.9)], respecto a aquellos en el grupo UCSF-DS [26.1% (IC 18.5-35.9)] y aún mayor en el grupo "sin límites" [45.0% (IC 34.5-57.0)] (Figura 1A).

Las curvas de supervivencia correspondientes a cada grupo fue menor para aquellos "sin límites" [46.9% (IC 35.0-57.9)] cuando se comparó con aquellos dentro del UCSF-DS [63.2 (IC 54.5-70.6)] y aquellos dentro de Milán [64.3% (IC 60.8-67.5)], sin diferencias significativas entre este dos últimos grupos [HR 1.02 (IC 0.79-1.33); P=0.83] (Figura 1B).

*Resultados en pacientes con terapia locorregional y que presentaron downstaging exitoso.*

En el 53.5% de los pacientes que recibieron terapia locorregional (n=918/1713), se pudo realizar una segunda evaluación por imágenes. La Tabla 2 describe cambios longitudinales tumorales desde el enrolamiento en lista a la última evaluación pre trasplante. De 918 pacientes con una segunda imagen de control, al enrolamiento en lista de espera el 82.3% (n=756) se encontraban

dentro de criterios de Milán, 11.2% (n=102) dentro de criterios UCSF-DS y 6.5% (n=60) "sin límites".

La proporción de downstaging exitoso fue de 47.1% (IC 37.1-57.2) para aquellos pacientes dentro del protocolo UCSF-DS y de 38.3% (IC 26.1-51.8) para el grupo "sin límites" (Figura suplementaria 1). De los pacientes dentro de Milán al enrolamiento en lista, 92.3% (IC 90.2-94.2) permanecieron dentro de Milán durante el tiempo en lista de espera (Tabla 2).

En cada grupo, los resultados post-trasplante fueron comparados de acuerdo al downstaging exitoso. La recurrencia del HCC post trasplante a 5 años en aquellos con downstaging exitoso en el grupo UCSF-DS fue del 18.2% (IC 9.0-34.7), con un SHR de 1.93 (IC 0.88-4.29; P=0.11), comparado con aquellos pacientes que permanecieron dentro de criterios de Milán [13.0% (IC 9.3-19.0)] (Figura 2A). Por otro lado, en el grupo "sin límites" la recurrencia a 5 años fue significativamente superior [54.7% (IC 33.7-78.2)] con un SHR de 6.08 (IC 3.10-11.91; P<.0001) comparado con aquellos que permanecieron dentro de criterios de Milán (Figura 2B). El grupo dentro de Milán que tuvo progresión por fuera de criterios de Milán y en aquellos que no se logró un downstaging exitoso (n=147) presentaron una recurrencia a 5 años de 30.2% (IC 21.0-42.0) con un SHR de 2.94 (IC 1.88-4.61; P<.0001) comparando con aquellos que permanecieron dentro de criterios de Milán (Figura 2).

Se observó un decremento en la sobrevida a 5 años post trasplante hepático desde aquellos pacientes dentro de Milán 63.5% (IC 58.4-68.2), UCSF-DS [48.9% (IC 23.4-70.3)] a aquellos dentro del grupo "sin límites" [47.8% (IC 25.6-67.0)] y en el grupo con progresión dentro a fuera de Milán o que no lograron un downstaging exitoso [50.2% (IC 37.5-61.5)].

En el análisis del explante, existieron discrepancias entre la última evaluación por imágenes y la anatomía patológica en la categorización de acuerdo a criterios de Milán. En los pacientes dentro de Milán a la última evaluación pre trasplante, el 72.7% se encontraba dentro de dichos criterios anatómo patológicos, mientras que en los grupos con downstaging exitoso, dicha proporción fue menor [UCSF-DS 54.2% y "sin límites" 34.8%]. El grupo UCSF-DS con downstaging exitoso presentó la misma proporción de invasión microvascular (22.9%) que los pacientes dentro de Milán, mientras que esta proporción fue significativamente mayor en el grupo "sin límites" (52.2%) (Tabla 3, Tabla suplementaria 2).

*Valores de AFP como elemento clínico para la optimización de candidatos a downstaging.*

Evaluamos variables pronósticas asociadas de manera independiente con mejores resultados luego del trasplante hepático en todos los pacientes que ingresaron con intención de reducción de estadio, evaluando características tumorales al enrolamiento en lista, ajustado por el tiempo en lista de espera y tiempo al trasplante desde el último tratamiento locorregional. Los pacientes en el grupo "sin límites" presentaron un riesgo dos veces superior de recurrencia comparados con aquellos dentro del grupo UCSF-DS [SHR 2.0 (IC 1.26-3.15);  $P=0.003$ ]. La presencia de una lesión target  $>6$  cm de diámetro se asoció con un riesgo 6 veces superior respecto a lesiones con un diámetro  $<3$  cm [SHR 5.7 (IC 2.22-14.47);  $P<.0001$ ]. En pacientes con valores de AFP superiores a 20 ng/ml se observó un riesgo de recurrencia dos veces superior [SHR 2.5 (IC 1.59-3.81);  $P<.0001$ ] respecto a aquellos con valores inferiores a 20 ng/ml, independientemente del límite tumoral radiológico. Por otro lado, el tiempo en lista de espera y el tiempo desde el último tratamiento locorregional al trasplante

no se asociaron de manera significativa con recurrencia post trasplante (Tabla 4).

Finalmente, evaluamos si los valores de AFP podrían optimizar la elegibilidad de candidatos a estrategias de reducción de estadio. De un análisis de riesgos competitivos para la incidencia acumulada de HCC, valores de AFP menores a 20 ng/ml se asociaron con menor incidencia de recurrencia [22.2% (IC 13.5-36.6)] comparado con aquellos pacientes con valores >20 ng/ml [50.0% (IC 36.1-62.5)] con un SHR 2.2 (IC 1.34-3.59; P=0.0001)(Figura 3B). En el grupo “sin límites”, también los valores de AFP <20 ng/ml se asociaron con un menor riesgo de recurrencia [SHR 2.48 (IC 1.39-4.48; P=0.002)], pero la incidencia acumulada de recurrencia a 5 años fue elevada en este subgrupo de pacientes aún con o sin AFP superior a 20 ng/ml [64.5% (IC 46.1-82.3) y 32.5% (21.5-47.4)].

#### 9.4. Tablas y figuras.

Tabla 1. Características de la población que recibió terapia locorregional pre trasplante.

	<b>Categorización al enrolamiento en lista de espera</b>			<b>P</b>
	<b>Dentro de Milán n=1370 (80.1%)</b>	<b>UCSF-DS n=211 (12.3%)</b>	<b>“Sin límites” n=130 (7.6%)</b>	
<i>Variables al enrolamiento en lista</i>				
<b>Edad</b> , años (± SD)	58 ± 8	58 ± 7	57 ± 10	0.24
<b>Sexo masculino</b> , n (%)	1083 (70.9)	184 (87.2)	114 (87.7)	0.002
<b>Tiempo en lista</b> , mediana (IQR)	6.8 (3.0-12.1)	5.9 (2.6-11.0)	5.6 (2.5-9.2)	0.07
<b>Child Pugh</b> , n (%)				
<b>A</b>	694 (50.7)	121 (57.3)	71 (54.6)	0.15
<b>B</b>	517 (37.7)	69 (32.7)	51 (39.2)	
<b>C</b>	159 (11.6)	21 (9.9)	8 (6.1)	
<b>Etiología</b> , n (%)				
<b>Viral</b>	830 (60.6)	122 (57.8)	70 (53.8)	0.39
<b>Alcohol</b>	307 (22.4)	47 (22.3)	30 (23.1)	
<b>Otra</b>	233 (17.0)	42 (19.9)	30 (23.1)	
<b>Nº de nódulos de HCC</b> , mediana (IQR)	1 (1-2)	2 (2-3)	4 (2-6)	0.0001
<b>1-3</b> , n (%)	1370 (100)	163 (77.2)	57 (43.8)	<.0001
<b>≥4</b> , n (%)	0	48 (22.7)	73 (56.1)	

<b>Diámetro mayor (cm), mediana (IQR)</b>	2.5 (2.0-3.2)	3.8 (3.2-4.9)	4.5 (3.5-6.0)	0.0001
<b>≤3 cm, n (%)</b>	1002 (73.1)	48 (22.7)	20 (15.4)	<.0001
<b>3-6 cm, n (%)</b>	368 (28.9)	143 (67.8)	80 (61.5)	
<b>&gt;6 cm, n (%)</b>	0	20 (9.5)	30 (23.1)	
<b>AFP (ng/ml), mediana (IQR)</b>	9.7 (4.4-40.0)	9.4 (4.3-37.2)	9.9 (4.1-43.6)	0.98
<b>≤100 ng/ml, n (%)</b>	1163 (85.0)	180 (85.3)	109 (85.1)	
<b>101-1000 ng/ml, n (%)</b>	180 (13.1)	21 (10.0)	12 (9.4)	
<b>&gt;1000 ng/ml, n (%)</b>	26 (1.9)	10 (4.7)	7 (5.5)	0.013
<b>Tiempo desde t local regional al trasplante, (IQR), meses</b>	4.9 (2.0-8.2)	7.8 (3.8-10.8)	3.9 (0.9-9.8)	0.37
<b>Tipo tratamiento local regional, n (%)</b>				
<b>TACE</b>	1177 (85.9)	180 (85.3)	111 (85.4)	0.96
<b>RFA</b>	267 (19.5)	48 (22.7)	36 (27.7)	0.07
<b>PEI</b>	79 (5.8)	31 (14.7)	12 (9.2)	<.0001
<b>Resección hepática</b>	77 (5.6)	17 (8.1)	13 (10.0)	0.09
<i>Análisis del explante</i>				
<b>Invasión microvascular, n (%)</b>	313 (22.8)	69 (32.7)	52 (40.0)	<.0001
<b>Desdiferenciación, n (%)</b>	282 (23.0)	53 (26.5)	27 (22.7)	0.55
<b>Dentro de Milán, n (%)</b>	950 (69.3)	90 (42.6)	33 (25.4)	<.0001

**Abreviaturas:** UCSF: Universidad de California San Francisco, \*UCSF-DS: UCSF protocolo de reducción de estadio o down-staging; TACE: quimioembolización transarterial; RFA: ablación por radiofrecuencia; PEI: alcoholización percutánea.

Tabla 2. Última categorización por imágenes pre trasplante en los grupos incluidos en lista de espera.

Variables a última evaluación	Categorización al enrolamiento en lista de espera			P
	Dentro de Milán n=756 (82.3%)	UCSF-DS* n=102 (11.1%)	"Sin límites" n=60 (6.5%)	
<b>Meses desde última evaluación al trasplante, mediana (IQR)</b>	2.2 (1.0-4.2)	2.3 (0.8-4.2)	1.9 (0.9-2.91)	0.48
<b>Dentro de Milán, n (%)</b>	700 (92.3)	48 (47.1)	23 (38.3)	<.0001
<b>Downstaging exitoso (95% CI)</b>		47.1 (37.1-57.2)	38.3 (26.1-51.8)	

Tabla 3. Análisis de hallazgos del explante de acuerdo a grupos al última evaluación pre trasplante.

Datos del explante	Categorización al enrolamiento en lista de espera				P
	Dentro de Milán n=700 (76.2%)	UCSF-DS n=48 (5.2%)	"Sin límites" n=23 (2.5%)	Progresados o no reducidos n=147 (16.0%)	
<b>Necrosis completa, n (%)</b>	23 (3.3)	2 (4.2)	0	5 (3.4)	0.65
<b>Invasión microvascular, n (%)</b>	149 (21.3)	11 (22.9)	12 (52.2)	50 (34.0)	<.0001

<b>Desdiferenciación, n (%)</b>	181 (27.1)	17 (37.8)	4 (18.2)	43 (31.2)	0.25
<b>Dentro de Milán, n (%)</b>	509 (72.7)	26 (54.2)	8 (34.8)	50 (34.0)	<.0001

Table 4. Análisis multivariable de riesgos competitivos de variables asociadas con recurrencia post trasplante hepático en pacientes con intención de reducción de estadio tumoral pre trasplante (n=341).

	<b>SHR crudo (IC 95%)</b>	<b>P</b>	<b>SHR ajustado (IC 95%)</b>	<b>P</b>
<i>Datos al enrolamiento en lista</i>				
<b>Edad</b>	0.99 (0.96-1.02)			
<b>Criterios de trasplante</b>				
UCSF-DS (n=211)	-	-	-	-
"Sin límites" (n=130)	2.24 (.45-3.45)	<.0001	2.00 (1.26-3.15)	0.003
<b>AFP score</b>				
≤2 puntos (n=213)	0.31 (0.19-0.48)	<.0001		
>2 puntos (n=126)				
<b>Lesion target mayor</b>				
≤3 cm (n=68)	1.17 (1.08-1.29)	<.0001		
3-6 cm (n=223)	2.87 (1.22-6.75)	0.015	2.75 (1.18-6.45)	0.02
>6 cm (n=50)	6.54 (2.63-16.29)	<.0001	5.67 (2.22-14.47)	<.0001
<b>Nº de nódulos</b>				
1-3 nódulos (n=220)	-	-	-	-
≥4 nódulos (n=121)	0.89 (.56-1.43)	0.64		
<b>AFP (ng/ml)</b>				
≤20 ng/ml (n=218)	1.00 (1.00-1.01)	0.002		
>20 ng/ml (n=121)	2.28 (1.48-3.52)	<.0001	2.46 (1.59-3.81)	<.0001
<i>Datos en lista de espera</i>				
<b>Tiempo en lista de espera</b>				
<3 meses (n=148)	0.99 (0.97-1.02)	0.81		
3-6 meses (n=57)	-	-		
>6 meses (n=136)	0.93 (0.51-1.67)	0.80		
	0.79 (0.49-1.28)	0.35		
<b>Tiempo desde último tratamiento puente al trasplante</b>				
≤3 meses (n=63)	0.99 (0.85-1.15)	0.91		
>3 meses (n=29)	1.37 (58-3.24)	0.47		
<b>Downstaging exitoso</b>				
Si (n=71)	0.88 (0.47-1.65)	0.70		
No (n=91)				

Tabla Suplementaria 1. Comparación entre pacientes con y sin tratamiento locorregional pre trasplante hepático.

	<b>Con n=1713 (70.1%)</b>	<b>Sin n=731 (29.9%)</b>	<b>P</b>
<i>Variables al enrolamiento en lista</i>			
<b>Edad, años (± SD)</b>	58 ± 8	57 ± 9	0.002
<b>Sexo masculino, n (%)</b>	1381 (80.6)	587 (80.3)	0.86

<b>Tiempo en lista</b> , mediana (IQR)	6.5 (2.9-11.9)	3.8 (1.4-7.3)	<.0001
<b>Child Pugh</b> , n (%)			
<b>A</b>	888 (51.8)	292 (39.9)	<.0001
<b>B</b>	637 (37.2)	293 (40.1)	
<b>C</b>	188 (11.0)	146 (20.0)	
<b>Etiología</b> , n (%)			
<b>Viral</b>	1024 (59.8)	372 (50.9)	<.0001
<b>Alcohol</b>	384 (22.4)	225 (30.8)	
<b>Otra</b>	305 (17.8)	134 (18.3)	
<b>Criterios de trasplante</b> , n (%)			
Dentro de Milán	1370 (80.1)	608 (83.3)	0.07
UCSF-DS*	211 (12.3)	84 (11.5)	
"Sin límites"	130 (7.6)	38 (5.2)	
<i>Última evaluación pre trasplante</i>			
<b>Dentro de Milán</b> , n (%)	773 (84.0)	392 (85.8)	0.39
<i>Análisis del explante</i>			
<b>Invasión microvascular</b> , n (%)	435 (25.4)	183 (25.0)	0.85
<b>Desdiferenciación</b> , n (%)	362 (23.4)	90 (13.6)	<.0001
<b>Dentro de Milán</b> , n (%)	1075 (62.8)	493 (67.4)	0.027

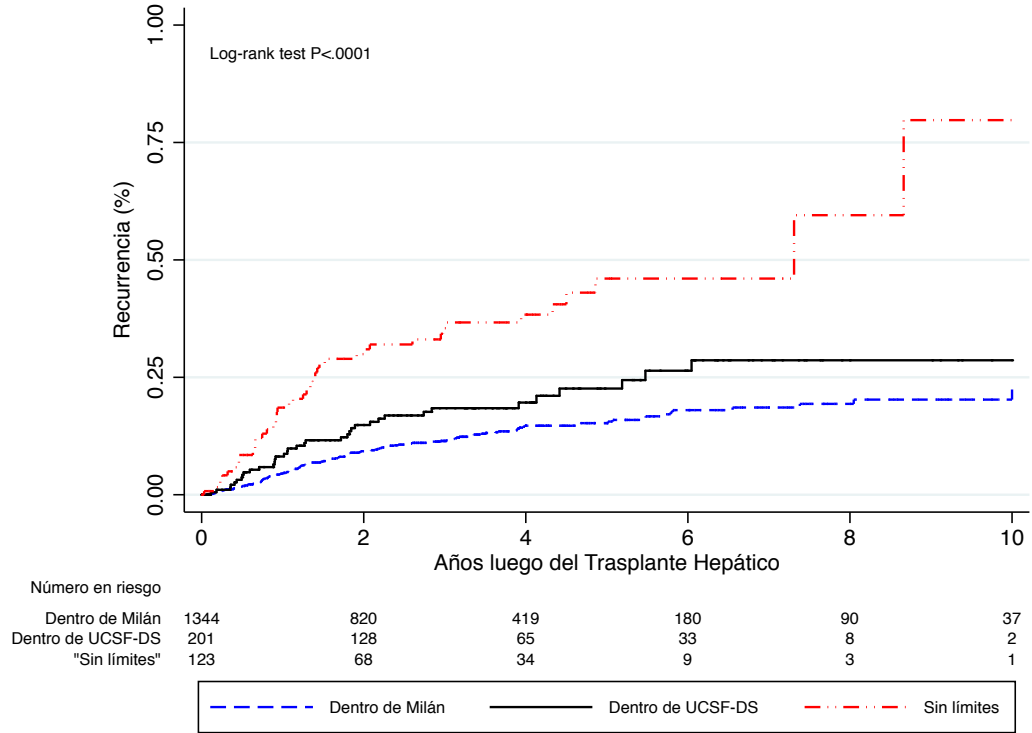
Tabla Suplementaria 2. Recurrencia de HCC post trasplante a 5 años de acuerdo a última evaluación en pacientes con y sin reducción de estadio tumoral.

	<b>Dentro de Milán</b>	<b>Con downstaging (n=71)</b>		<b>Sin downstaging (n=91)</b>		<b>Progresados fuera de Milán</b>
		<b>UCSF-DS</b>	<b>"Sin límites"</b>	<b>UCSF-DS</b>	<b>AC</b>	
<b>N</b>	700	48	23	54	37	56
<b>Recurrencia % (CI)</b>	13.0 (9.4-17.9)	18.2 (9.0-34.7)	54.7 (33.7-78.2)	24.7 (14.3-40.8)	47.7 (26.3-74.9)	24.3 (11.6-46.8)
<b>SHR (IC 95%)</b>			3.1 (1.22-8.16)		1.49 (0.67-3.32)	
<b>Valor de P</b>			0.018		0.32	
<b>MVI, n (%)*</b>	149 (21.3)	11 (22.9)	12 (52.2)	19 (35.2)	16 (43.2)	15 (26.8)
<b>Valor de P</b>			<.0001		0.50	



Figura 1. Curvas de incidencia acumulada de recurrencia (A) y sobrevida post trasplante hepático (B) de acuerdo a grupos al enrolamiento en lista de espera.

A.



B.

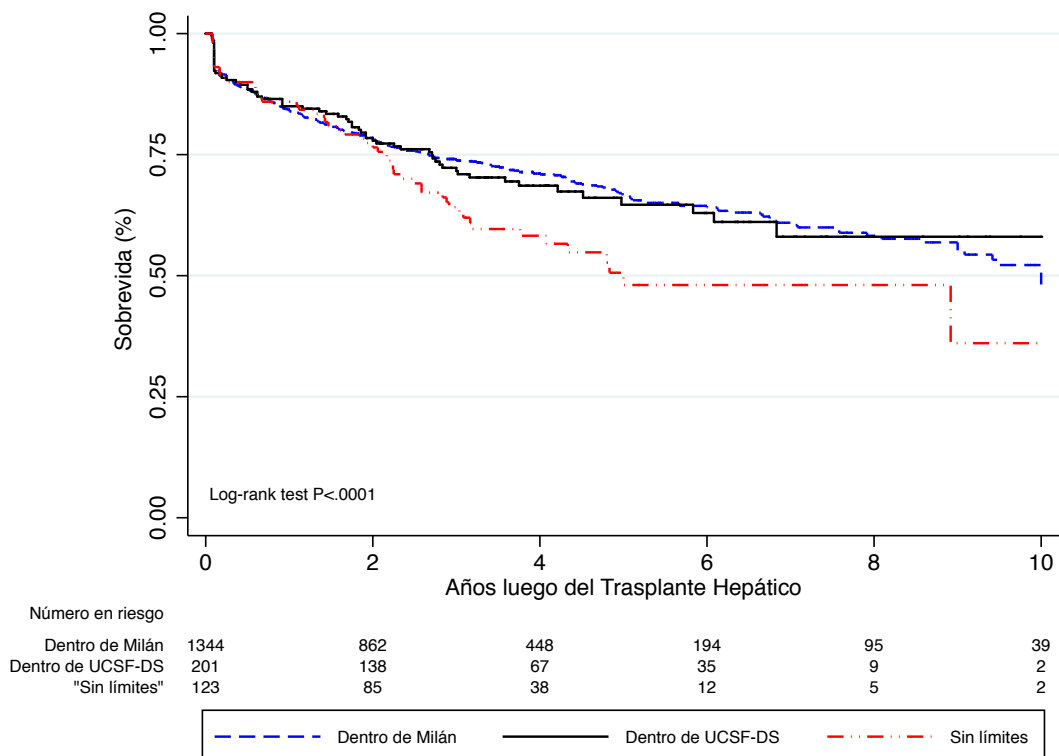


Figura 2. Curvas de incidencia acumulada de recurrencia post trasplante hepático de acuerdo a grupos a última re evaluación radiológica.

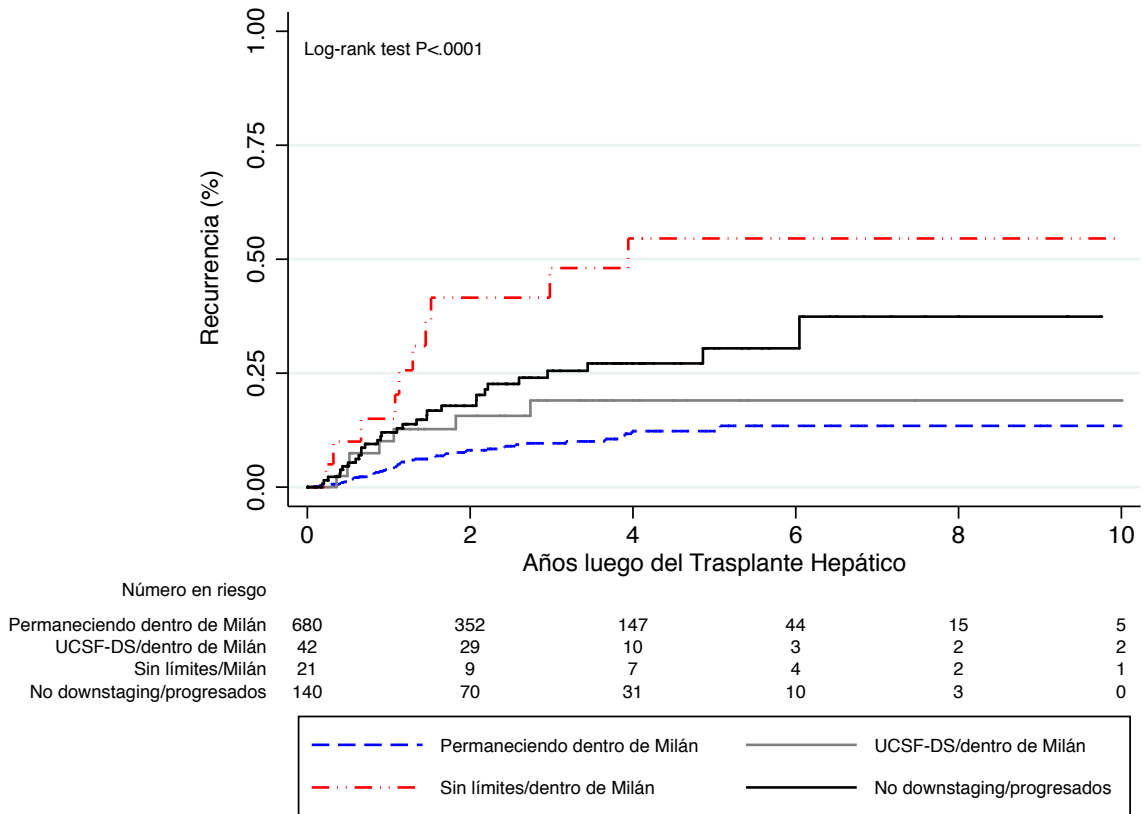
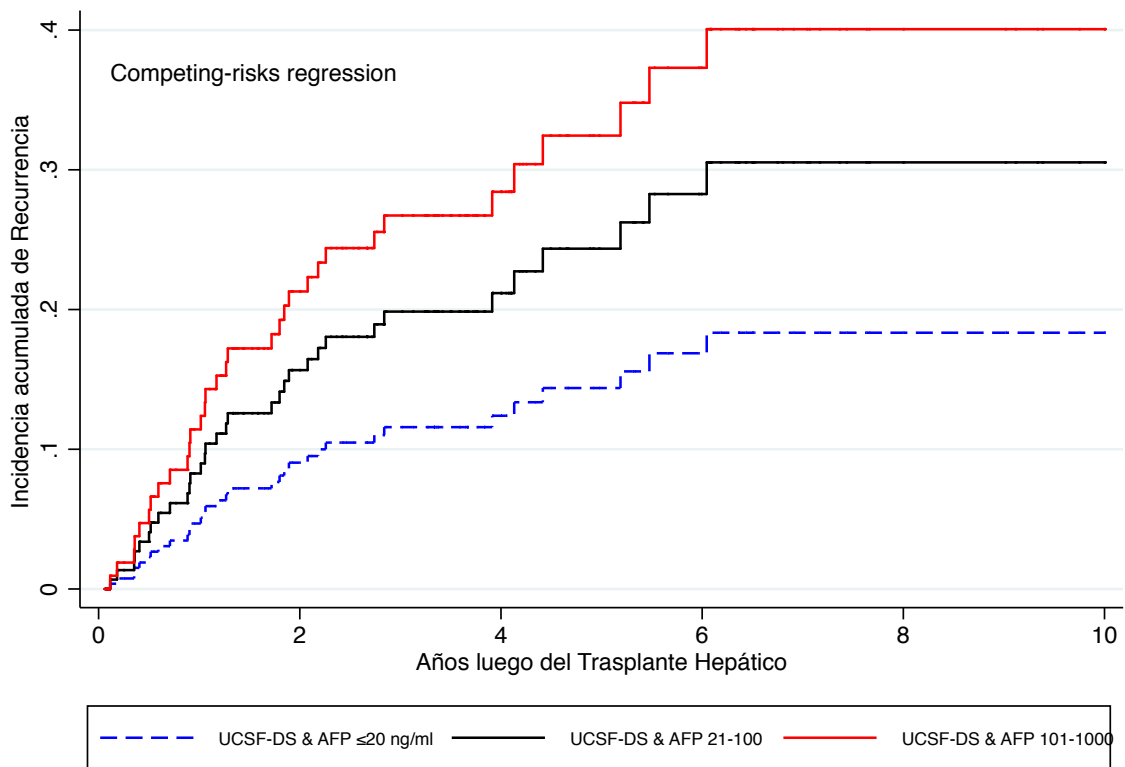
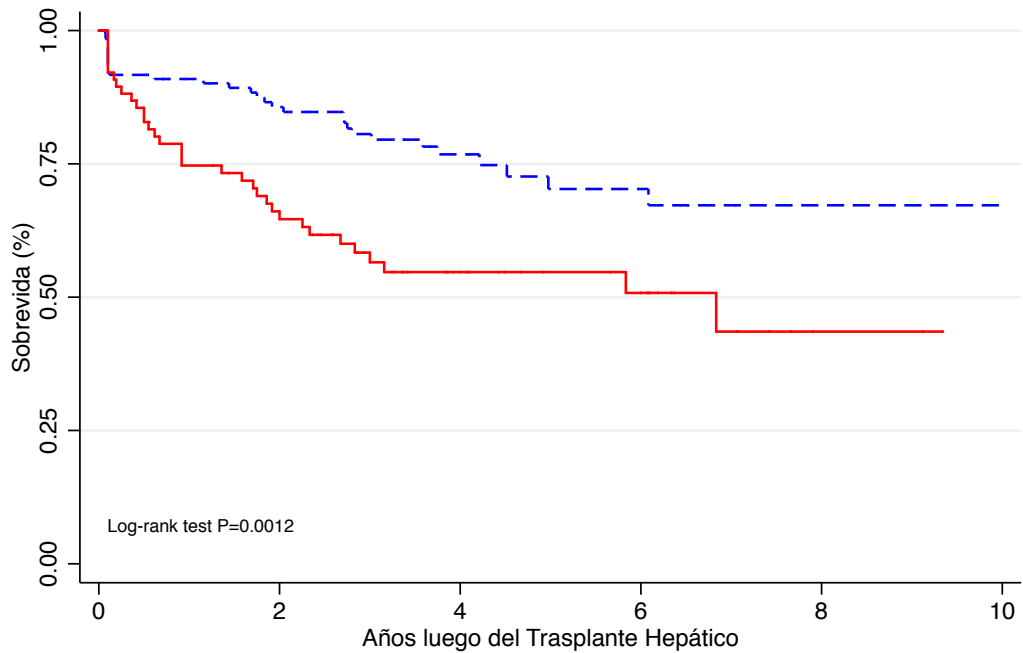


Figura 3. Curvas de incidencia acumulada de recurrencia (A) y sobrevida post trasplante hepático (B) de acuerdo a valor de AFP mayor de 20 ng/ml en el grupo UCSF-DS.

A.

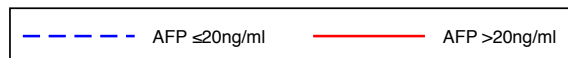


B.



Número en riesgo

AFP $\leq 20$ ng/ml	134	93	45	23	7	2
AFP $>20$ ng/ml	67	45	22	12	2	0



## 9.5. Discusión.

En esta etapa de la tesis doctoral nos propusimos evaluar la incorporación de la AFP como criterio de optimización en pacientes que ingresan con intención de reducción de estadio tumoral o downstaging. En este estudio colaborativo multicéntrico a nivel mundial, observamos que hubo un mayor riesgo de recurrencia en aquellos pacientes con intención de downstaging, sea por criterios UCSF-DS o "sin límites". Mientras que este último grupo, el riesgo es significativamente elevado, en el grupo UCSF-DS, valores de AFP no superiores a 20 ng/ml se asociaron con menor recurrencia y mejor sobrevida post trasplante hepático. En este subgrupo de pacientes entonces, proponemos la incorporación de este criterio adicional para la elegibilidad de pacientes que ingresan en el protocolo UCSF-DS. Este límite de AFP ha sido recientemente identificado por otro grupo (88).

Observamos que debe existir un límite "realista" para la selección de pacientes que se incorporan con intención de reducción de estadio hacia criterios de Milán. En el grupo "sin límites" el éxito del downstaging fue significativamente inferior y aun así, los resultados claramente inferiores. Subrayamos entonces que en este grupo de pacientes, aún una AFP inferior a 20 ng/ml no optimiza la selección de candidatos. Demostramos un límite en cuanto carga tumoral por imágenes. Además, este subgrupo de pacientes presentó la mayor proporción de discordancia con el análisis del explante, lo que indicaría que a mayor carga tumoral radiológica, existiría mayor error en la interpretación de las mismas (sea por diámetros, respuesta o necrosis radiológica o nódulos adicionales con presentación inespecífica por imágenes).

Estos resultados han sido replicados en otras cohortes, incluso en la aplicación del UCSF-DS a nivel nacional Americano los resultados han sido inferiores a los

esperados (37). Esta discordancia de resultados, a los originalmente propuestos por Yao y colaboradores, posiblemente se debe en gran parte a los criterios de elegibilidad. Muchas cohortes incluyeron pacientes que estaban solo marginalmente fuera de criterios de Milán. En nuestra cohort, 22.7% de los pacientes presentaron 4 lesiones y en el 67.8% el diámetro de la lesión mayor fue entre 3 y 6 cm, mientras que 9.5% tenían un diámetro superior a 6 cm.

La proporción de éxito real de reducción tumoral fue menor en nuestra cohorte respecto a aquella reportada por Yao y colaboradores (60%) (34). En una revisión sistemática con metanálisis que incluyeron estudios evaluando el efecto del downstaging, la proporción de éxito real de reducción de estadio hacia criterios de Milán fue de un 40% (IC 24-69) (36). En nuestra cohorte solo la mitad de los pacientes lograron un downstaging exitoso.

Cuando comparamos los hallazgos patológicos, observamos que la proporción de invasión microvascular fue similar entre el grupo dentro de Milán y el UCSF-DS, mientras que fue significativamente más alta en aquellos "sin límite". En otros estudios, se ha observado similares resultados (37,65).

En otras secciones de esta tesis ya hemos subrayado el rol pronóstico de la AFP en el ámbito de trasplante hepático. En esta oportunidad, evaluamos su rol como variable de selección y de optimización en el grupo de pacientes que se incorporaron a una estrategia de reducción de carga tumoral radiológica hacia criterios de Milán. En este grupo de pacientes, valores de AFP inferiores a 20 ng/ml se asociaron con menor incidencia de recurrencia post trasplante y mejor supervivencia global. Sin embargo, este efecto fue significativo en el grupo UCSF-DS, mientras que en el grupo "sin límites", el riesgo basal permaneció elevado.

## **9.6. Limitaciones.**

Limitaciones de este estudio en esta etapa incluyen el diseño retrospectivo con sesgos de información en el registro de datos. Además, no incluimos ni evaluamos el delistamiento por progresión tumoral como verdadero análisis por intención de tratar en todos los pacientes incorporados a estrategia de reducción de estadio. En esta cohorte, todos los pacientes fueron trasplantados. Sin embargo, esto implica un mensaje aún más específico. A pesar de que pudiera haber habido un sesgo de selección, como consecuencia de la heterogeneidad en la evaluación radiológica luego de tratamientos locorregionales, para esto realizamos una exhaustiva revisión de los datos de manera centralizada. Probablemente una revisión centralizada de imágenes hubiese sido lo idealmente correcto, pero definitivamente no factible.

#### **9.7. Conclusiones de este capítulo.**

En resumen, globalmente los resultados post trasplante hepático en pacientes incorporados a estrategias de reducción de estadio fueron inferiores a los criterios de Milán. La carga tumoral contemplada únicamente mediante criterios radiológicos es imprecisa, insuficiente y con probables discordancias mayores respecto a la evaluación anátomo patológica. El éxito real de la reducción de estadio por fuera de criterios de UCSF-DS pareciera ser irreal, asociado a mayor riesgo de recurrencia y muy pobre supervivencia post trasplante. Por lo tanto, este subgrupo de pacientes no debiera ser priorizado el trasplante hepático como opción terapéutica antes la escasez de donantes. Finalmente, en el grupo UCSF-DS, hemos resaltado la optimización de la selección de candidatos con valores de AFP no superiores a 20 ng/ml.

**10. Capítulo 5. A) Comparación de dos modelos compuestos (utilizando como biomarcador de selección la AFP pre TH), el score Francés versus el Metroticket 2.0, y B) Evaluación de los modelos compuestos y de los criterios de Milán en pacientes con hepatocarcinoma biológicamente menos agresivo. Cohortes Latinoamericana, Italiana, Belga y Francesa.**

En esta etapa nos focalizamos en responder las siguientes preguntas de investigación:

- a)- En pacientes con hepatocarcinoma y trasplante hepático, ¿el score de AFP predice de manera similar al Metroticket 2.0 el riesgo de recurrencia, sobrevida global y sobrevida específica del HCC post trasplante hepático?
- b)- En pacientes un perfil de de HCC biológicamente menos agresivo, ¿el score de AFP predice de manera similar al Metroticket 2.0 el riesgo de recurrencia, sobrevida global y sobrevida específica del HCC post trasplante hepático?

**10.1. Objetivos.**

En este capítulo, nuestros objetivos fueron a) comparar el modelo de AFP y el Metroticket 2.0 en una cohorte multicéntrica transcontinental, evaluando la calibración y el poder de discriminación respecto a recurrencia post trasplante, sobrevida global y HCC específica, y b) evaluar y comparar la performance de estos modelos en una población HCC biológicamente menos agresivo, comparándolos contra los criterios de Milán.

**10.2. Pacientes y Métodos.**

*Diseño, centros participantes y criterios de elegibilidad.*

Este estudio fue una cohorte multicéntrica, transcontinental de pacientes adultos con HCC, que recibieron un trasplante hepático en 47 centros de

trasplante de Europa y Latino América. Los pacientes incluidos de Francia, Italia y Bélgica fueron entre los años 2000 y 2018, mientras que los pacientes de Argentina, Uruguay, Chile, Brasil, Ecuador, Colombia y Méjico, entre los años 2005 y 2018.

Todos los procedimientos inherentes al estudio fueron realizados de acuerdo a la guía STROBE para estudios observacionales (52). Cada comité de Ética institucional aprobó el estudio, contemplando y resguardando la confidencialidad de los datos registrados, de acuerdo a estándares de la última versión de la Declaración de Helsinki (2008). El protocolo del estudio ha sido registrado para su conocimiento público (NCT03775863; [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Incluimos pacientes adultos consecutivamente trasplantados de hígado por HCC. El diagnóstico pre trasplante del HCC fue realizado de acuerdo a guías internacionales, sea por imágenes o por biopsia tumoral (3,28). Excluimos aquellos pacientes con 1) invasión macrovascular o extrahepática, observadas durante el período pre trasplante hepático, y 2) aquellos pacientes con hepatocarcinoma de hallazgo incidental en el análisis del explante.

*Variables de exposición al enrolamiento y durante el tiempo en lista de espera.*

Se registraron variables demográficas, características del HCC por imágenes pre trasplante, sea TC o RMN, incluyendo el número y diámetro de los nódulos pareados con valores de AFP al diagnóstico, al enrolamiento en lista, durante el período de tiempo en lista de espera y a última evaluación pre trasplante. Adicionalmente, en pacientes que recibieron terapias locorregionales como puente al trasplante durante el período de tiempo en lista de espera, se registraron número y diámetro de los tumores junto con valores de AFP a la reevaluación posterior a dichos procedimientos.



Todos los pacientes se categorizaron de acuerdo a criterios de Milán (6), al modelo de selección Francés o modelo de AFP (22) y al Metroticket 2.0, tanto al diagnóstico, al enrolamiento en lista y a última re evaluación pre trasplante. Los criterios de Milán fueron los criterios estándares de selección en todos los centros. De acuerdo a prácticas locales, se incluyeron pacientes fuera de Milán, de acuerdo a una decisión individualizada en cada centro. En relación a los pacientes incorporados en Francia, éstos fueron previos al cambio de implementación del modelo de AFP a nivel nacional (año 2013)(89). El score de AFP (0 a 9 puntos) fue calculado en cada paciente de acuerdo a Duvoux y col (22) y el Metroticket 2.0 de acuerdo a la suma del diámetro del nódulo mayor y el número de nódulos, y el logaritmo en base 10 de los valores de AFP (25). Se evaluaron dichos modelos en su formato original y también en su formato de cortes umbrales, para el modelo de AFP  $\leq 2$  puntos y para el Metroticket 2.0 utilizamos los 3 umbrales propuestos por Mazzaferro y col, incluyendo: suma de diámetro + nódulos  $\leq 7$  y valor de AFP  $< 200$  ng/ml, suma  $\leq 5$  y valores de AFP  $< 400$  ng/ml, y suma  $\leq 4$  y valores de AFP hasta 1000 ng/ml (25).

Finalmente, se analizaron y registraron los datos del análisis del explante, incluyendo el número y diámetro de los nódulos de HCC, la presencia de invasión macro o microvascular (MVI), el peor grado de dediferenciación tumoral (Edmonson-Steiner) (26). Se registró el grado de necrosis tumoral en el explante, luego del efecto del tratamiento locorregional pre trasplante. Como criterios de límite tumoral en el explante se utilizaron también los criterios de Milán y los de "Hasta-7" (18).

*Definición de tumores biológicamente menos agresivos.*

Definimos una población de pacientes que presentaban criterios de HCC

“biológicamente más agresivos”. Para esta definición utilizamos variables pre trasplante o del explante asociadas a un mayor riesgo de recurrencia en estudios previamente publicados , cualquiera estuviese presente. El primer criterio, fue la presencia de un valor de AFP >1000 ng/ml en cualquier momento pre trasplante, sea al diagnóstico, al enrolamiento o durante el tiempo en lista de espera (21,90,91), independientemente si esos valores sea reducían durante el tiempo pre trasplante. El segundo criterio, fue la presencia de al menos uno de los siguientes hallazgos del explante: presencia de MVI (18,23), tumores desdiferenciados (24,26,53), o aquellos fuera de “Hasta-7” (18).

De acuerdo a la presencia de al menos una de estas variables, sea AFP pre trasplante >1000 ng/ml o alguna de las mencionadas del explante, fueron definidas dos poblaciones con y sin HCC “biológicamente agresivos”.

#### *Eventos de interés del estudio.*

El evento primario de interés fue la recurrencia post trasplante del HCC, porque consideramos que es el evento de mayor relevancia que afecta la sobrevida post trasplante de estos pacientes (25). El monitoreo y seguimiento de los pacientes, como el diagnóstico de la recurrencia fue similar a los criterios antes mencionados en la etapa 2 de esta Tesis Doctoral (92). Los eventos de interés secundarios fueron la sobrevida global y la sobrevida específica del HCC desde la fecha del trasplante hasta la fecha de último seguimiento o fallecimiento.

#### *Análisis estadístico*

Las curvas y tablas de sobrevida se analizaron mediante el método de Kaplan Meier y estadístico de Mantel Cox (log-rank test). Realizamos en primer lugar, un análisis multivariable de regresión Cox, evaluando la asunción del modelo de

riesgos proporcionales (de manera gráfica y estadística –test de residuos de Schoenfeld), con estimación de la medida de efecto o HR y respectivos IC de 95% de variables asociadas con el evento primario o secundarios, respectivamente. Aquellas variables asociadas al evento de interés con un estadístico  $P < .05$  en el análisis univariado (test de Wald) fueron incluidas de manera secuencial, una por una, en el modelo multivariable, con el fin de evaluar efecto confundidor ( $>20\%$  de cambio en el HR crudo), manteniendo la regla de “1 variable independiente por cada 10 eventos” con el fin evitar la sobre estimación del modelo final. Con el fin de evitar la sobre estimación de los eventos de recurrencia o de sobrevida específica de HCC con el análisis de regresión Cox, realizamos un análisis de regresión de riesgos competitivos, definiendo como evento competitivo al fallecimiento por otras causas en ausencia de recurrencia, y calculando los SHR y respectivos IC del 95% (método de Fine y Gray) (63).

Comparamos cada modelo o criterio de trasplante evaluados al enrolamiento en lista y a última evaluación pre trasplante tanto en su formato original como en aquellos umbrales propuestos, en función del performance global, tanto para los modelos de regresión Cox como aquellos correspondientes para el análisis de riesgos competitivos. La calibración de los modelos para el análisis de regresión Cox fue realizado mediante la evaluación de residuos de Cox-snell y comparación de curvas de valores predichos y observados. El poder de discriminación de cada modelo de regresión Cox se evaluó estimando y comparando los IC del 95% de los índices de Harrell y de Somers (93), mientras que el poder de discriminación a través de modelos de riesgos competitivos se evaluó mediante el índice de Wolbers (94).

Finalmente, evaluamos la mejora neta de reclasificación o NRI entre uno u otro criterio de selección (95,96). Comparamos de manera global la recategorización en cada estrato de riesgo, los “eventos” y “no-eventos” de cada criterio de trasplante. Para los modelos o criterios de trasplante en su formato umbral, realizamos el cálculo de NRI para el análisis de sobrevida y de riesgos competitivos. Todos los análisis fueron realizados mediante el paquete estadístico STATA 13.0 (StataCorp, Texas, USA).

### **10.3. Resultados.**

Se incluyeron 2444 pacientes trasplantados de hígado con HCC, 55.6% de Europa y 44.4% de Latino América. La etiología más frecuente asociada al HCC fue la hepatitis C crónica (47.5%), el consumo crónico de alcohol (24.9%) y la hepatitis B crónica (9.9%). La mediana del tiempo en lista de espera fue de 5.5 meses. Al enrolamiento en lista, el 80.9% (n=1978) de la cohorte se encontraba dentro de criterios de Milán, el 88.7% (n=2163) presentaban un score de AFP  $\leq 2$  puntos, 91.9% (n=2243) estaban dentro de la suma de diámetro + nódulos  $\leq 7$  y valor de AFP  $< 200$  ng/ml, 66.4% (n=1620) dentro de la suma  $\leq 5$  y valores de AFP  $< 400$  ng/ml, y 44.5% (n=1087) dentro de la suma  $\leq 4$  y valores de AFP hasta 1000 ng/ml. El 70.1% de la cohorte (n=1713) recibió algún tratamiento puente al trasplante (Tabla 1).

La recurrencia y sobrevida global a 5 años post trasplante fue de 17.1% (IC 15.2-19.1) y 66.7% (IC 64.4-68.9), respectivamente. La proporción de fallecimientos relacionados y no relacionados a la recurrencia del HCC post trasplante fue de 31.9% (n=232) y 68.1% (n=496). Los pacientes con un score de AFP  $\leq 2$  puntos presentaron un menor riesgo de recurrencia en el tiempo, comparados con aquellos con un score  $> 2$  puntos al enrolamiento en lista de espera [SHR 0.27 (CI

0.21-0.34);  $P < .0001$ ]. Cada corte umbral propuesto por el Metroticket 2.0 se asoció con menor recurrencia y mayor sobrevida post trasplante (Tabla 2 A-B). Ambos modelos presentaron un mejor poder de discriminación para recurrencia, sobrevida HCC específica y sobrevida global post trasplante, respecto a los criterios de Milán ( $P < .0001$ ), tanto como modelos originales o umbrales (Tablas 3 A-C).

De lo contrario, los índices de Harrell y Somers fueron similares entre el modelo de AFP [0.66 (CI 0.63-0.69)] y el Metroticket 2.0 [0.69 (CI 0.66-0.72)], tanto es sus modelos originales como umbrales propuestos para el evento primario de recurrencia post trasplante hepático ( $P > .05$ ), así como también para sobrevida HCC específica y sobrevida global (Tablas 3 A-C).

Finalmente no hubo significativa mejora en el NRI del Metroticket 2.0 respecto al modelo de AFP. Ambos mejoraron significativamente la reclasificación respecto a los criterios de Milán para el evento primario de recurrencia post trasplante hepático (Tabla 4).

#### *Comparación de los modelos pre trasplante en una población sin HCC biológicamente agresivo.*

Considerando cambios longitudinales de AFP durante el periodo pre trasplante en tres puntos de evaluación anteriormente mencionados (al diagnóstico, al enrolamiento o durante al tiempo en lista de espera), 3.9% ( $n=96$ ) de la cohorte presentó valores por encima de 1000 ng/ml (Figura 1). El 25.3% y el 20.5% de la cohorte presentó invasión microvascular o tumores desdiferenciados, respectivamente; el 35.8% de la cohorte estuvo fuera de criterios de "Hasta-7" en el explante. Sólo 4.3% ( $n=105$ ) presentaron necrosis completa del nódulo mayor en el explante.

De estas variables, 48% (n=1173) y 52% (n=1271) de la cohorte fueron definidos con y sin HCC biológicamente agresivo. Como era esperable, aquellos pacientes con HCC agresivo se encontraban mayormente fuera de criterios de Milán, presentaron una mayor proporción de pacientes con un score de AFP >2 puntos y fuera de todos los umbrales del Metroticket 2.0 (Tabla 5). La recurrencia a 5 años fue significativamente inferior en el grupo sin respecto a aquellos con HCC biológicamente agresivo [7.8% (CI 5.9%-10.1) vs 26.6% (CI 25.3%-32.3%); P<.0001].

En pacientes sin HCC agresivo las variables pre trasplante al enrolamiento en lista que se asociaron de manera independiente con recurrencia del HCC fueron el número de nódulos [SHR ajustado de 1.22 (IC 1.04-1.44); P=0.01], el diámetro del nódulo mayor [SHR ajustado de 1.18 (IC 1.04-1.34); P=0.008] y los valores de AFP >100 ng/ml [SHR ajustado de 2.31 (IC 1.14-4.68); P=0.02]. En este grupo de pacientes, los umbrales del modelo de AFP [SHR ajustado por tratamiento locorregional para un score  $\leq$ 2 puntos 0.4 (IC 0.15-0.82); P=0.02], y el Metroticket 2.0 [SHR ajustado para suma de hasta 7 y AFP <200 ng/ml 0.3 (IC 0.17-0.60); P<0.001] se asociaron con menor recurrencia post trasplante (Figuras 2 A-B), mientras que esto no sucedió aplicando los criterios de Milán [SHR ajustado de 0.6 (IC 0.29-1.10); P=0.09] (Figura 2 C).

Cuando comparamos el poder de discriminación de los modelos al enrolamiento en lista de espera en la población global y en aquella con HCC biológicamente agresivo, tanto el modelo de AFP como el Metroticket 2.0 fueron superiores a los criterios de Milán para el evento primario y secundarios. Sin embargo, en pacientes sin HCC biológicamente agresivo, solo el Metroticket 2.0 fue superior a los criterios de Milán, únicamente cuando se lo evaluó como modelo original. Cuando evaluamos y comparamos estos modelos en esta sub-

población de acuerdo a umbrales, el poder de discriminación no fue diferente entre los criterios de Milán [0.53 (IC 0.48;0.58)], el modelo de AFP [0.53 (IC 0.49;0.57)] y el Metroticket 2.0 [0.56 (IC 0.51;0.61)] (Tabla 3A). Tampoco hubo una mejora significativa en el NRI.

#### 10.4. Tablas y figuras.

Tabla 1. Características demográficas y tumorales de la población (n=2444).

<b>VARIABLE</b>	<b>Valor</b>
<b>Edad</b> , años ( $\pm$ SD)	58 $\pm$ 8.1
<b>Sexo masculino</b> , n (%)	1968 (80.5)
<b>Mediana de tiempo en lista de espera</b> , (IQR), meses	5.5 (2.5-10.5)
<b>MELD</b> , ( $\pm$ DE)*	12.2 $\pm$ 4.7
<b>No cirrosis</b> , n (%)	21 (0.9)
<b>Child Pugh A/B/C</b> , n (%)	1180 (48.3)/930 (38.0)/334 (13.7)
<b>Etiología</b> , n (%)	
<i>Hepatitis C</i>	1153 (47.2)
<i>Hepatitis B</i>	234 (9.6)
<i>HCV-HBV co-infección</i>	9 (0.4)
<i>Alcohol</i>	609 (24.9)
<i>Otras</i>	439 (18.0)
<i>*Variables al enrolamiento en lista de espera</i>	
<b>AFP, ng/ml</b> , mediana (IQR)	9.1 (4.2-33.9)
<b>AFP <math>\leq</math>100 ng/ml</b> , n (%)	2089 (85.6)
<b>AFP 101-1000 ng/ml</b> , n (%)	294 (12.0)
<b>AFP &gt;1000 ng/ml</b> , n (%)	57 (2.3)
<b>Dentro de criterios de Milán</b> , n (%)	1978 (80.9)
<b>AFP score</b> , mediana (IQR)	0 (0-1)
$\leq$ 2 puntos, n (%)	2163 (88.7)
>2 puntos, n (%)	276 (11.3)
<b>Metroticket 2.0 suma hasta 7 + AFP &lt;200 ng/ml</b> , n (%)	
Dentro	2026 (83.1)
Fuera	413 (16.9)
<b>Metroticket 2.0 suma hasta 5 + AFP &lt;400 ng/ml</b> , n (%)	
Dentro	1620 (66.4)
Fuera	820 (33.6)
<b>Metroticket 2.0 suma hasta 4 + AFP &lt;1000 ng/ml</b> , n (%)	
Dentro	1087 (44.5)
Fuera	1354 (55.5)
<b>Tratamiento locorregional puente al trasplante</b> , n (%)	1713 (70.1)
Quimioembolización (TACE)	1419
Ablación por radiofrecuencia (RFA)	351
Alcoholización percutánea (PEI)	123
Resección quirúrgica	107
<i>*Variables a última evaluación pre trasplante</i>	
<b>Dentro de criterios de Milán</b> , n (%)	1165 (84.6)

<b>AFP (ng/ml), mediana (IQR)</b>	9.0 (4.1-32.9)
<b>≤100 ng/ml, n (%)</b>	2084 (85.7)
<b>101-1000 ng/ml, n (%)</b>	283 (11.6)
<b>&gt;1000 ng/ml, n (%)</b>	66 (2.7)
<b>AFP score, mediana (IQR)</b>	0 (0-1)
<b>≤2 puntos, n (%)</b>	1203 (87.9)
<b>&gt;2 puntos, n (%)</b>	166 (12.1)
<b>Metroticket 2.0 suma de hasta 7 + AFP &lt;200 ng/ml, n (%)</b>	
Dentro	1121 (78.1)
Fuera	314 (21.9)
<b>Metroticket 2.0 suma de hasta 5 + AFP &lt;400 ng/ml, n (%)</b>	
Dentro	920 (65.4)
Fuera	486 (34.6)
<b>Metroticket 2.0 suma de hasta 4 + AFP &lt;1000 ng/ml, n (%)</b>	
Dentro	644 (46.7)
Fuera	735 (53.3)
<b>**Datos de análisis del explante.</b>	
<b>Hasta 7, n (%)</b>	
Dentro	1569 (64.2)
Fuera	875 (35.8)
<b>Presencia de MVI, n (%)</b>	618 (25.3)
<b>Diferenciación tumoral, n (%)</b>	
Gado I-II	1756 (79.5)
Grado >II	452 (20.5)

Abreviaciones: AFP: alfa-feto proteína en suero. MVI: invasión microvascular.

Tabla 2. Recurrencia (A) y sobrevida (B) post trasplante de acuerdo a modelos pre trasplante.

A.

<b>Modelos al enrolamiento en lista de espera</b>	<b>1-año R-HCC (95% IC)</b>	<b>5-años R-HCC (95% IC)</b>	<b>10-años R-HCC (95% IC)</b>
<b>Criterios de Milán</b>			
Dentro (n=1978)	8.2 (6.9-9.6)	15.1 (13.0-17.5)	17.0 (14.3-20.2)
Fuera (n=466)	20.3 (16.6-24.6)	32.8 (27.5-38.8)	39.1 (30.8-48.7)
<b>Modelo de AFP o Francés</b>			
≤2 puntos (n=2163)	8.4 (7.2-9.8)	15.2 (13.2-17.5)	17.6 (14.8-20.8)
>2 puntos (n=276)	27.0 (21.7-33.2)	43.6 (36.3-51.7)	49.4 (39.5-60.2)
<b>Dentro de Milán</b>			
AFP score ≤2 puntos (n=1875)	7.7 (6.4-9.1)	14.4 (12.3-16.9)	21.2 (13.3-32.6)
AFP score >2 puntos (n=102)	17.9 (11.1-28.0)	27.5 (18.3-40.0)	27.5 (18.3-40.0)
<b>Fuera de Milán</b>			
AFP score ≤2 puntos (n=288)	13.0 (9.3-18.0)	20.0 (14.7-27.0)	25.4 (15.8-39.2)
AFP score >2 puntos (n=174)	32.0 (25.2-40.0)	52.4 (42.9-62.7)	59.7 (47.3-72.4)



<b>Suma 7 + AFP &lt;200 ng/ml</b>			
Dentro (n=2243)	7.8 (6.6-9.2)	14.5 (12.5-16.9)	21.7 (14.0-32.7)
Fuera (n=198)	24.1 (19.9-28.9)	37.6 (31.9-44.0)	41.5 (34.2-49.8)
<b>Suma 5 + AFP &lt;400 ng/ml</b>			
Dentro (n=1620)	7.3 (6.0-8.9)	13.8 (11.6-16.3)	21.3 (12.8-34.0)
Fuera (n=820)	17.0 (14.3-20.0)	28.0 (24.0-32.4)	31.9 (26.2-38.5)
<b>Suma 4 + AFP &lt;1000 ng/ml</b>			
Dentro (n=1087)	6.9 (5.4-8.8)	11.8 (9.4-14.7)	20.3 (10.3-37.9)
Fuera (n=1354)	13.6 (11.7-15.7)	24.5 (22.2-29.1)	28.4 (24.0-33.5)
<b>Tratamiento puente</b>			
Si (n=1713)			33.7 (20.0-53.1)
No (n=731)			15.1 (12.0-18.9)

Abreviaciones: AFP: alfa-feto proteína en suero. R-HCC: recurrencia del HCC post trasplante hepático.

B.

<b>Modelos al enrolamiento en lista de espera</b>	<b>1-año sobrevida (95% IC)</b>	<b>5-años sobrevida (95% IC)</b>	<b>10-años sobrevida (95% IC)</b>
<b>Criterios de Milán</b>			
Dentro (n=1978)	79.3 (77.4-81.1)	66.3 (63.6-68.8)	52.3 (46.4-57.8)
Fuera (n=466)	78.5 (74.4-82.1)	57.5 (51.7-62.9)	45.6 (36.7-54.1)
<b>Modelo de AFP o Francés</b>			
≤2 puntos (n=2163)	80.2 (78.4-81.9)	67.1 (64.6-69.5)	53.4 (47.9-58.6)
>2 puntos (n=276)	70.9 (65.0-76.0)	46.1 (38.6-53.2)	33.3 (22.8-44.2)
<b>Dentro de Milán</b>			
AFP score ≤2 puntos (n=1875)	79.9 (78.0-86.5)	67.4 (64.7-70.0)	52.8 (46.7-58.5)
AFP score >2 puntos (n=102)	68.0 (57.7-73.4)	48.3 (36.0-59.5)	48.3 (36.0-59.5)
<b>Fuera de Milán</b>			
AFP score ≤2 puntos (n=288)	82.1 (77.0-86.2)	65.5 (58.1-71.6)	57.7 (46.5-67.5)
AFP score >2 puntos (n=174)	72.6 (65.1-78.8)	44.8 (35.4-53.9)	27.8 (15.7-41.2)
<b>Suma 7 + AFP &lt;200 ng/ml</b>			
Dentro (n=2243)	80.2 (78.3-81.9)	67.6 (64.9-70.0)	53.7 (48.0-59.0)
Fuera (n=198)	73.8 (69.2-77.9)	50.4 (44.2-56.3)	38.2 (28.2-48.1)
<b>Suma 5 + AFP &lt;400 ng/ml</b>			
Dentro (n=1620)	80.1 (78.0-82.1)	67.3 (64.4-70.1)	54.2 (48.2-59.8)
Fuera (n=820)	77.1 (74.0-79.9)	59.2 (54.9-63.3)	44.2 (34.9-53.2)
<b>Suma 4 + AFP &lt;1000 ng/ml</b>			
Dentro (n=1087)	80.7 (78.2-83.0)	68.9 (65.4-72.2)	57.2 (50.1-63.6)
Fuera (n=1354)	77.8 (75.4-80.0)	60.8 (57.4-64.0)	45.0 (37.6-52.0)

Abreviaciones: AFP: alfa-feto proteína en suero.

Tabla 3. Comparación del poder de discriminación de recurrencia (A), sobrevida HCC específica (B) y sobrevida global (C) post trasplante hepático.

A. Recurrencia.

Modelos	Harrell's C (95% CI)	Somers' D (95% CI)	P vs Milan	P value vs modelo de AFP
<b>Toda la cohorte</b>				
<i>Modelos originales</i>				
<b>Milán</b>	0.59 (0.56-0.62)	0.18 (0.13-0.24)		-
<b>AFP score</b>	0.66 (0.63-0.69)	0.33 (0.26-0.40)	<.0001	-
<b>Metroticket 2.0</b>	0.69 (0.66-0.72)	0.38 (0.32-0.47)	<.0001	0.04
<i>Modelos umbrales</i>				
<b>Milán</b>	0.59 (0.56-0.62)	0.18 (0.13-0.24)		-
<b>AFP model ≤2 points</b>	0.60 (0.58-0.63)	0.21 (0.15-0.26)	<.0001	-
<b>Suma 7 + AFP &lt;200 ng/ml</b>	0.62 (0.59-0.65)	0.24 (0.18-0.29)	<.0001	0.10
<b>Suma 5 + AFP &lt;400 ng/ml</b>	0.60 (0.57-0.63)	0.20 (0.15-0.26)		0.96
<b>Suma 4 + AFP &lt;1000 ng/ml</b>	0.58 (0.56-0.61)	0.17 (0.11-0.22)		0.20
<b>Población CON HCC biológicamente agresivo</b>				
<i>Modelos originales</i>				
<b>Milán</b>	0.58 (0.55-0.61)	0.16 (0.09-0.22)	-	
<b>AFP score</b>	0.64 (0.60-0.68)	0.29 (0.21-0.37)	<.0001	-
<b>Metroticket 2.0</b>	0.65 (0.61-0.69)	0.31 (0.23-0.39)	<.0001	0.48
<i>Modelos umbrales</i>				
<b>Milán</b>	0.58 (0.55-0.61)	0.16 (0.09-0.22)	-	
<b>AFP model ≤2 points</b>	0.59 (0.56-0.62)	0.19 (0.13-0.26)	0.29	-
<b>Suma 7 + AFP &lt;200 ng/ml</b>	0.60 (0.57-0.63)	0.21 (0.14-0.28)	0.13	0.46
<b>Población SIN HCC biológicamente agresivo</b>				
<i>Modelos originales</i>				
<b>Milán</b>	0.53 (0.48;0.58)	0.06 (-0.04;0.17)	-	
<b>AFP score</b>	0.58 (0.51;0.66)	0.17 (0.01;0.32)	0.13	-
<b>Metroticket 2.0</b>	0.69 (0.66;0.72)	0.41 (0.26;0.56)	<.0001	0.004
<i>Modelos umbrales</i>				
<b>Milán</b>	0.53 (0.48;0.58)	0.06 (-0.04;0.17)	-	
<b>AFP model ≤2 points</b>	0.53 (0.49;0.57)	0.06 (-0.02;0.14)	0.99	-
<b>Suma 7 + AFP &lt;200 ng/ml</b>	0.56 (0.51;0.61)	0.12 (0.01;0.23)	0.35	0.19

B. Sobrevida HCC específica.

Modelos	Harrell's C (95% CI)	Somers' D (95% CI)	P vs Milan	P value vs modelo de AFP
<b>Toda la cohorte</b>				
<i>Modelos originales</i>				
<b>Milán</b>	0.58 (0.56-0.61)	0.17 (0.11-0.22)		
<b>AFP score</b>	0.66 (0.63-0.70)	0.34 (0.26-0.41)	<.0001	
<b>Metroticket 2.0</b>	0.69 (0.65-0.72)	0.40 (0.32-0.47)	<.0001	0.08
<i>Modelos umbrales</i>				
<b>Milán</b>	0.58 (0.56-0.61)	0.17 (0.11-0.22)		
<b>AFP model ≤2 points</b>	0.60 (0.57-0.63)	0.21 (0.15-0.27)		

<b>Suma 7 + AFP &lt;200</b> ng/ml	0.62 (0.59-0.65)	0.24 (0.18-0.30)		0.18
<b>Suma 5 + AFP &lt;400</b> ng/ml	0.60 (0.57-0.63)	0.21 (0.14-0.27)		0.92
<b>Suma 4 + AFP &lt;1000</b> ng/ml	0.59 (0.56-0.61)	0.17 (0.11-0.23)		0.27

C. Sobrevida Global.

<b>Modelos</b>	<b>Harrell's C (95% CI)</b>	<b>Somers' D (95% CI)</b>	<b>P vs Milan</b>	<b>P value vs modelo de AFP</b>
<b>Toda la cohorte</b>				
<i>Modelos originales</i>				
<b>Milán</b>	0.58 (0.56-0.61)	0.17 (0.11-0.23)		
<b>AFP score</b>	0.66 (0.63-0.70)	0.38 (0.26-0.41)	<.0001	
<b>Metroticket 2.0</b>	0.69 (0.65-0.72)	0.40 (0.32-0.47)	<.0001	0.08
<i>Modelos con umbrales</i>				
<b>Milán</b>	0.58 (0.56-0.61)	0.17 (0.11-0.23)		
<b>AFP model ≤2 points</b>	0.60 (0.57-0.63)	0.21 (0.15-0.27)		
<b>Suma 7 + AFP &lt;200</b> ng/ml	0.62 (0.59-0.65)	0.23 (0.18-0.30)		0.18
<b>Suma 5 + AFP &lt;400</b> ng/ml	0.60 (0.57-0.63)	0.20 (0.14-0.27)		0.92
<b>Suma 4 + AFP &lt;1000</b> ng/ml	0.59 (0.56-0.61)	0.17 (0.11-0.23)		0.27

Tabla 4. Mejora neta de reclasificación (NRI) en modelos originales (A) y umbrales (B).

<b>Modelos</b>	<b>NRI global</b>	<b>Valor de Z</b>	<b>Valor de P</b>
<b>AFP score ≤2 puntos</b>			
<b>Suma 7 + AFP &lt;200</b> ng/ml	-0.033	-1.52	0.064
<b>Suma 5 + AFP &lt;400</b> ng/ml	-0.006	-0.21	0.41
<b>Suma 4 + AFP &lt;1000</b> ng/ml	0.023	0.59	0.72

Tabla 5. Población con o sin HCC biológicamente agresivo.

<b>VARIABLE</b>	<b>CON HCC agresivo n=1173 (48%)</b>	<b>SIN HCC agresivo n=1271 (52%)</b>	<b>P</b>
<b>Edad, años (± SD)</b>	57 ± 8	58 ± 8	0.06
<b>Sexo masculino, n (%)</b>	928 (79.1)	1040 (81.8)	0.09
<b>Tiempo en lista, meses, mediana (IQR)</b>	6.0 (2.6-11.1)	5.1 (2.4-9.9)	0.017
<i>*Al enrolamiento en lista.</i>			

<b>AFP, ng/ml</b>	7.5 (3.9-22.0)	11.6 (4.8-55.2)	<.0001
<b>AFP ≤100 ng/ml, n (%)</b>	1078 (91.9)	1011 (79.8)	<.0001
<b>101-1000 ng/ml, n (%)</b>	95 (8.1)	199 (15.7)	
<b>&gt;1000 ng/ml, n (%)</b>	0	57 (4.5)	
<b>Dentro de Milán, n (%)</b>	1034 (88.1)	944 (74.3)	<.0001
<b>AFP modelo ≤2 points, n (%)</b>	1123 (95.8)	1040 (82.1)	<.0001
<b>Suma de 7 + AFP &lt;200 ng/ml, n (%)</b>	1076 (91.9)	950 (74.9)	<.0001
<b>Suma de 5 + AFP &lt;400 ng/ml, n (%)</b>	882 (75.3)	738 (58.2)	<.0001
<b>Suma de 4 + AFP &lt;1000 ng/ml, n (%)</b>	600 (51.2)	487 (38.3)	<.0001
<b>Tratamiento puente, n (%)</b>	781 (66.6)	932 (73.3)	<.0001
<i>*Variables a última evaluación.</i>			
<b>AFP, ng/ml</b>	7.0 (3.7-19.0)	12.0 (5.0-67.0)	<.0001
<b>AFP ≤100 ng/ml, n (%)</b>	1084 (92.6)	1000 (79.2)	<.0001
<b>101-1000 ng/ml, n (%)</b>	87 (7.4)	196 (15.5)	
<b>&gt;1000 ng/ml, n (%)</b>	0	66 (5.2)	
<b>Dentro de Milán, n (%)</b>	614 (90.3)	551 (79.0)	<.0001
<b>AFP modelo ≤2 points, n (%)</b>	650 (95.6)	553 (80.0)	<.0001
<b>Suma 7 + AFP &lt;200 ng/ml, n (%)</b>	622 (90.7)	499 (66.6)	<.0001
<b>Suma 5 + AFP &lt;400 ng/ml, n (%)</b>	525 (77.3)	395 (54.3)	<.0001
<b>Suma 4 + AFP &lt;1000 ng/ml, n (%)</b>	375 (55.4)	269 (38.3)	<.0001
<i>Variables del explante</i>			
<b>Fuera de "Hasta 7", n (%)</b>	-	875 (68.8)	<.0001
<b>Con MVI, n (%)</b>	-	618 (48.6)	<.0001
<b>Grado nuclear &gt;II, n (%)</b>	-	452 (43.7)	<.0001

Abreviaciones: AFP: alfa-feto proteína en suero. MVI: invasión microvascular.

Figura 1. Flujo de elegibilidad en la definición de HCC biológicamente agresivo, de acuerdo a valores dinámicos de AFP >1000 ng/ml durante el período pre trasplante hepático.

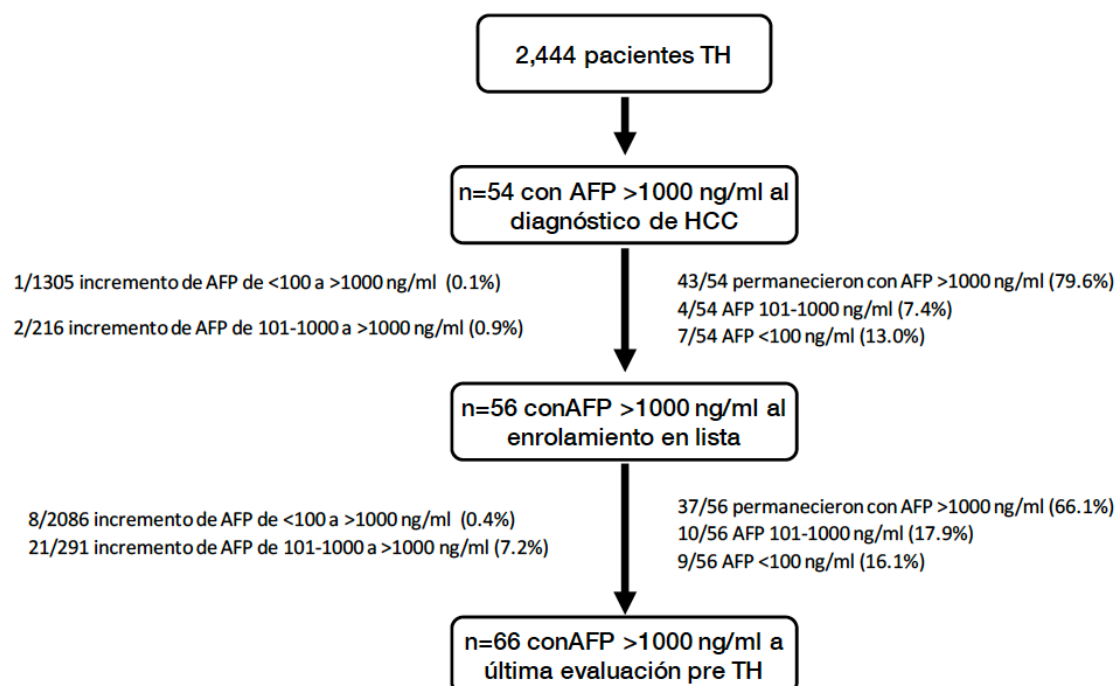
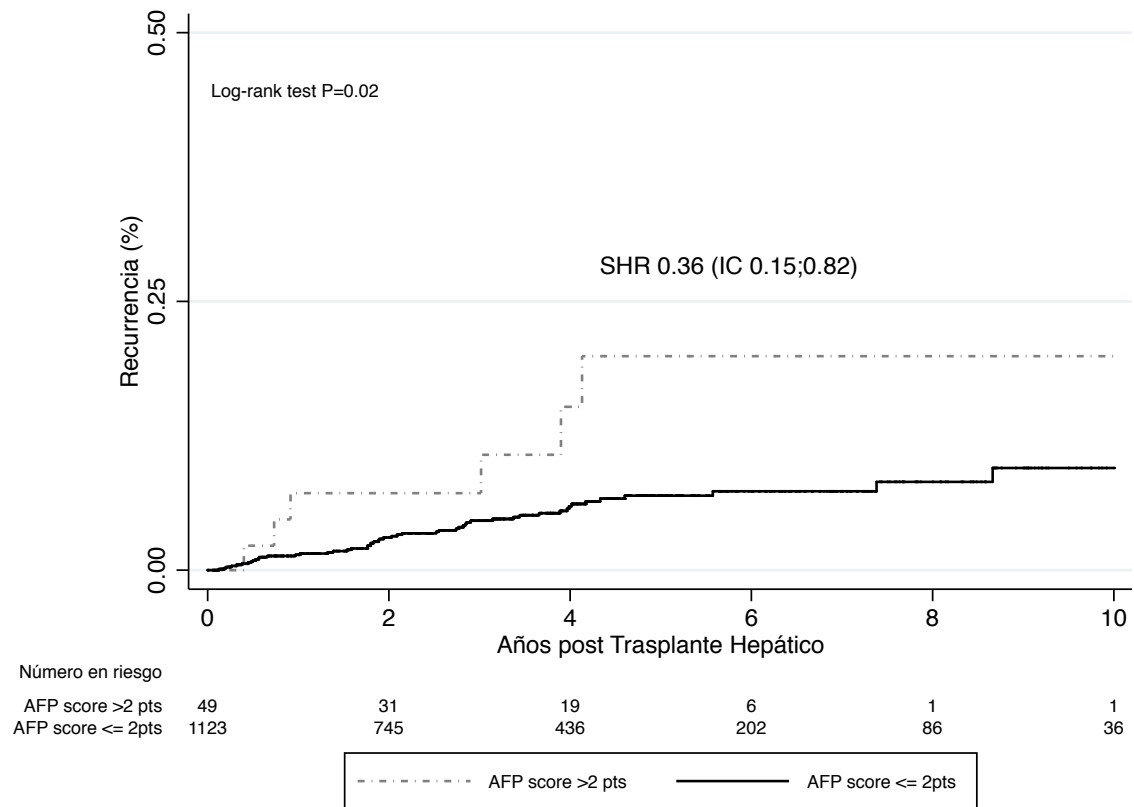
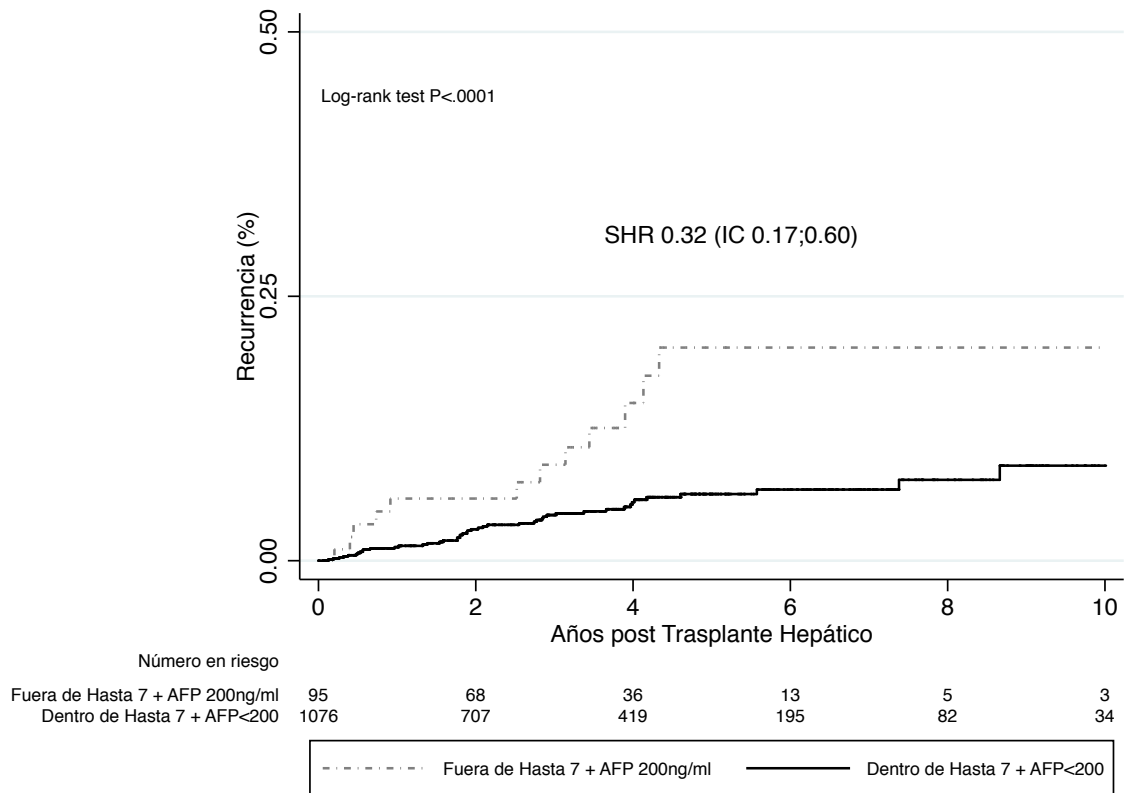


Figura 2. Recurrencia post trasplante hepático de acuerdo a criterios de selección pre trasplante en pacientes sin HCC biológicamente agresivo.

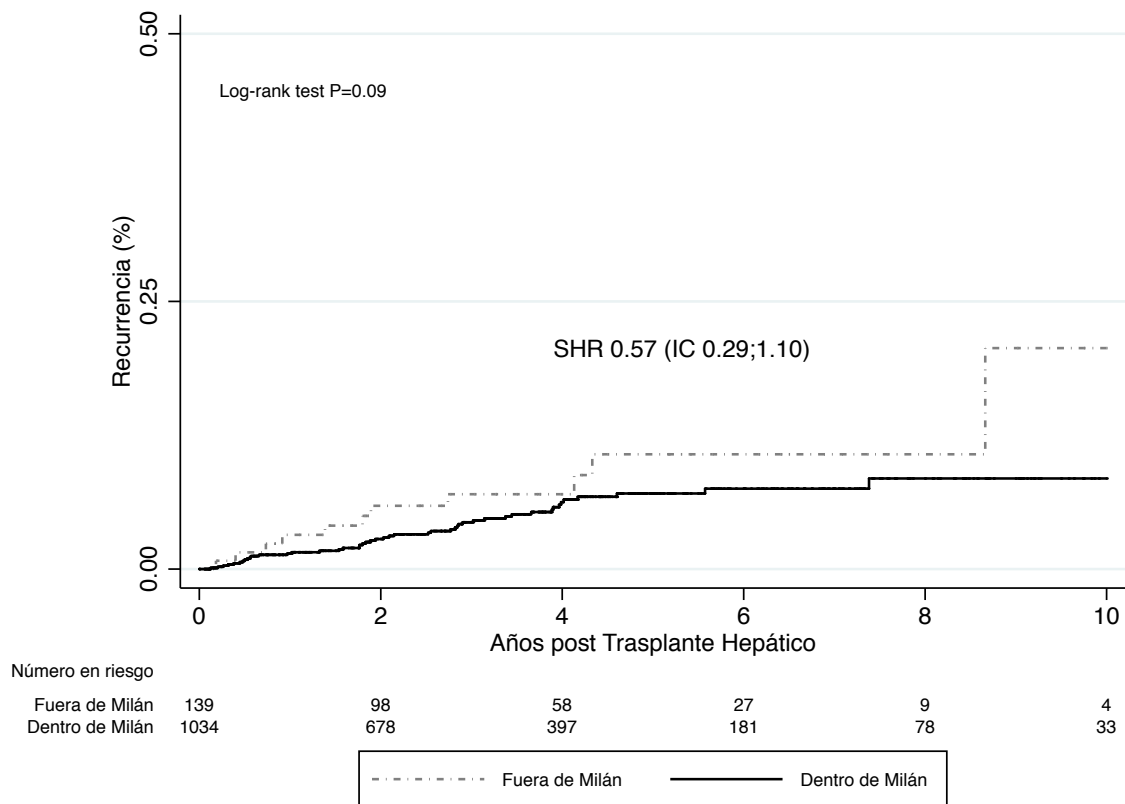
A. Modelo Francés o AFP.



B. Suma de 7 y AFP <200 ng/ml (umbral Metroticket 2.0).



C. Criterios de Milán.



## 10.5. Discusión.

En este estudio de cohorte transcontinental que hemos liderado, junto con la colaboración del Dr Christophe Duvoux y el Dr Fernando Rubinstein, evaluamos los modelos compuestos de AFP o Francés y el Metroticket 2.0, comparándolo con los criterios de Milán, en la discriminación de recurrencia, sobrevida específica por HCC y sobrevida global. En la cohorte global, estos modelos compuestas han discriminado mejor que los criterios de Milán, similar a lo previamente reportado en la literatura (22,25). Sin embargo, en pacientes sin tumores biológicamente agresivos, definición que hemos utilizado contemplando variables que previamente hemos observado de estar asociadas de manera independiente con un mayor riesgo de recurrencia, el poder de discriminación no fue significativamente superior entre los modelos compuestos y los criterios de Milán. Sin embargo, en esta población, valores de AFP superiores a 100 ng/ml se asociaron con un mayor riesgo de recurrencia post trasplante hepático.

A pesar que la evaluación por riesgos competitivos demostró que en la población sin HCC biológicamente agresivo, los modelos compuestas diferenciaron dos poblaciones de mayor o menor riesgo de recurrencia respecto a los criterios de Milán, el poder de discriminación fue discretamente superior al cincuenta por ciento. Esto puede haber sido debido al menor número de eventos en esta población.

En modelos de regresión Cox, primero debe evaluarse la asunción del modelo con la asunción de riesgos proporcionales y luego, la calibración y discriminación de cada modelo. La calibración evaluada por el índice de Harrell determina la probabilidad de supervivencia que tiene un sujeto respecto a otro en el tiempo sumado a la probabilidad empardada. El índice de Somer, implica

que cuando un sujeto ha sobrevivido en el tiempo respecto a otro, el modelo predice que el sobreviviente tiene mayor probabilidad de tener la menor chance del evento respecto al no sobreviviente (93). Ambos índices se pueden comparar y estimar sus respectivos intervalos de confianza, aunque la magnitud de la diferencia resulta clínicamente difícil de entender. ¿Existe algún valor clínicamente relevante? ¿Cuán clínicamente significativo o relevante es un índice de 0.69 respecto a otro de 0.70?

Desde un punto de vista estadístico, esta diferencia podría ser significativa, pero no clínicamente relevante. Consideramos que, para que un modelo sea superior a otro, el modelo debe calibrar y discriminar mejor, pero por sobre todas las cosas, ser clínicamente relevante en cuanto a la mejora neta o reclasificación (NET) (97) y ser clínicamente útil, accesible y fácil de usar en el práctica diaria. EL NET entre ambos modelos compuestos respecto a los criterios de Milán han sido superiores en la cohorte global, y no así en la población sin HCC biológicamente agresivo. Esto podría deberse al número de eventos pero también, a la exclusión de aquellos pacientes con valores de AFP superiores a 1000 ng/ml, quizás con mayor riesgo de recurrencia. Esto determinó una mayor "exigencia" en la evaluación de los modelos compuestos. Aún así, observamos que valores superiores a 100 ng/ml, se asocian con mayor riesgo de recurrencia post trasplante en esta población.

¿Por qué evaluamos o determinamos un doble proceso de elegibilidad para definir la población tumores biológicamente agresivos? En primer lugar, valores de AFP >1000 ng/ml han sido claramente asociados de manera independiente a un mayor riesgo de recurrencia, y por otro lado a invasión microvascular y tumores desdiferenciados. También, valores elevados de AFP han sido asociados a peor pronóstico en estadios avanzados (40,98) y a otras vías



oncogénicas (27). Por lo tanto, aún en ausencia de invasión microvascular o dediferenciación en el explante, valores elevados de AFP se asocian con un comportamiento biológico más agresivo y peor pronóstico en la historia natural del HCC.

Nuestros resultados van en línea de esta hipótesis. Valores de AFP mayores a 100 ng/ml, aun en una población donde se espera un menor riesgo de recurrencia, se asociaron con un peor pronóstico. Por lo tanto, aún en este escenario, los valores de AFP tienen utilidad clínica relevante, aún no presentando variables de riesgo en el explante (18,24,26,27).

#### **10.6. Limitaciones.**

Sumado a las limitaciones comunes a estudios de diseño de cohorte retrospectivos, podría haber un sesgo de selección no reportado en la elegibilidad local de candidatos a trasplante entre distintos centros involucrados. A pesar de esto, y con el fin de evitar sesgos de información, todos los datos fueron revisados de manera central. Segundo, podrían haber otras variables no incluidas en los modelos, determinante para un mayor riesgo de recurrencia y que no hemos podido evaluar, como por ejemplo la localización y la bilobaridad. Asimismo, el efecto de los cambios dinámicos en cuanto a extensión tumoral y valores de AFP en lista de espera no fueron evaluados mediante análisis de regresión de datos longitudinales. Esto permitiría estimar no solo el promedio de riesgo poblacional, sino también inferir la variabilidad inter individual (99,100). Asimismo, no hemos evaluado otros biomarcadores que podrían asociarse a mayor riesgo de recurrencia y supervivencia post trasplante hepático (101).

### **10.7. Conclusiones de este capítulo.**

En esta etapa observamos que los modelos compuestos, tanto el modelo de AFP como el Metroticket 2.0, son superiores a los criterios de Milán en la categorización del riesgo de recurrencia, sobrevida HCC específica y sobrevida global post trasplante. Estos modelos permitan optimizar los criterios de selección tanto en pacientes dentro como fuera de Milán y debieran ser incorporados en los procesos de selección de candidatos a trasplante hepático. Sin embargo, en una población con un perfil de HCC biológicamente menos agresivo, un escenario aún más exigente de evaluación, son similares entre ambos y no fueron superiores a los criterios de Milán. Probablemente se deba a escaso número de eventos en esta sub población de esta cohorte, pero permite inferir que estos modelos aún distan de ser perfecto y deben ser mejorados en un futuro.

## **11. Capítulo final: Evaluación de un modelo de implementación, incorporando la AFP en la priorización de pacientes con HCC para la alocaión de órganos, mediante un análisis de decisiones clínicas y sanitarias. Propuesta a nivel Nacional.**

En esta última etapa nos propusimos comparar distintas políticas de alocaión y expansión de criterios de trasplante hepático, como consecuencia de una serie de reuniones en el Consejo Asesor ante el INCUCAI de la Sociedad Argentina de Trasplantes (SAT), el cual el Dr Piñero formo parte del mismo.

En esta serie de reuniones, realizadas durante los años 2017 a 2019, expusimos estos resultados, proponiendo el cambio en la política de elegibilidad en función de los criterios de Milán hacia el modelo de selección Francés o de AFP. Detallamos nuestra cohorte de validación externa del modelo de AFP (la primer validación a nivel mundial) y dado algunas objeciones, por ej: aduciendo que se impactaría en una notoria expansión de pacientes con HCC en lista de espera, propusimos un modelo de combinación de elegibilidad o Doble Criterio de Elegibilidad (DCE) para ser implementado en Argentina.

### **11.1. Objetivos.**

El objetivo de esta etapa fue la de comparar resultados pre y post trasplante hepático y el potencial incremento en el número de pacientes trasplantados por HCC de tres políticas públicas de alocaión de órganos utilizando un análisis de decisiones clínicas y sanitarias, en una región con elevada mortalidad en lista de espera para pacientes sin HCC.

### **11.2. Pacientes y Métodos.**

*Políticas de alocaión y análisis de decisiones clínicas.*

Tres modelos o políticas de elegibilidad de priorización de pacientes con HCC de acuerdo a los más relevantes modelos de selección de regiones del Este y Oeste en el mundo se compararon. Estos modelos son los criterios de Milán (6), el modelo de AFP (22), y el de la UCSF-DS (37,65).

Política A o símil Americana. Criterios de Milán y restricción en pacientes con valores de AFP inferiores a 1000 ng/ml (21). Dentro de esta política, se incorpora un criterio de expansión para aquellos fuera de Milán de acuerdo a 1) protocolo de downstaging de la UCSF-DS (1 lesión  $>5$  cm y  $\leq 8$  cm, o 2-3 lesiones con al menos una  $>3$  cm y  $\leq 5$  cm con un diámetro tumoral total  $\leq 8$  cm, o hasta 4-5 lesiones, todas  $\leq 3$  cm y con un diámetro tumoral total  $\leq 8$  cm) (37,65) y 2) aquellos pacientes fuera de UCSF-DS ("sin límites") (Figura 1A) (37).

Política B- El score de AFP (0 a 9 puntos) (22). Este score se calculó de acuerdo al diámetro del nódulo mayor, al número de nódulos y a los valores de AFP en suero ng/ml (22). Este modelo ha sido implementado en Francia desde el año 2013 (Figura 1B) (89). Puede expandir por fuera de criterios de Milán en pacientes con un score menor o igual a 2 puntos.

Política C- Toma de decisiones en función de un modelo de análisis de decisiones clínicas al que llamamos Doble Criterio de Elegibilidad (DCE): exploramos el uso de combinación de modelos mediante un análisis de decisiones clínicas. Esta propuesta no se diseñó para ser un nuevo modelo sino que contempla un análisis de decisiones en base a la combinación de modelos previamente publicados (1,22,36) y contemplando también cambios tumorales longitudinales en el tiempo en lista de espera luego del tratamiento locorregional como puente al trasplante hepático, para realizarlo más aplicable a la vida real (78,102). Para este análisis de decisiones consideramos los criterios de Milán como eje o estándar de selección pero optimizados con el score de

AFP y la respuesta al tratamiento locorregional. El DCE incluye como elegibles para la priorización para trasplante hepático aquellos pacientes dentro de Milán y con un score de AFP  $\leq 2$  puntos. En última instancia, el propósito del DCE es aplicar un proceso de evaluación de candidatos a trasplante más estricta y de manera longitudinal a lo largo del tiempo en lista de trasplante, evitando un incremento excesivo de pacientes con HCC que reciben priorización para trasplante (Figura 1C).

Al enrolamiento en lista de espera, 4 categorías o grupos de pacientes se definieron y compararon. El primer grupo de pacientes fueron aquellos dentro del DCE, el segundo grupo aquellos dentro de Milán pero con un score  $> 2$  puntos, el tercer grupo aquellos pacientes fuera de Milán con un score de AFP  $\leq 2$  puntos y finalmente, el cuarto grupo aquellos fuera de Milán y con un score  $> 2$  puntos. El criterio final de priorización o corte dicotómico clínico se definió para aquellos pacientes tanto dentro de Milán y con un score de AFP  $\leq 2$  puntos, contemplando cambios dinámicos en lista de espera. Por lo tanto, se priorizó aquellos pacientes que se mantuvieron dentro del DCE o que lograron acceder al DCE mediante downstaging posterior al tratamiento locorregional o puente.

*Análisis de potencial expansión en el número de candidatos a trasplante por HCC.*

En base a la distribución de probabilidades poblacionales previamente reportados (22,37), analizamos la aplicabilidad de cada política de priorización usando un árbol de decisiones clínicas y sanitarias mediante el programa treeage software (TreeAge Software, Inc; USA). La distribución de probabilidades poblacionales dentro o fuera de cada modelo se detallan en las Figuras 1 A-C (22,36,37). Evaluamos el potencial incremento en el número de candidatos a

trasplante hepático de cada política aplicando este modelo de análisis de decisiones clínicas en una cohorte de pacientes trasplantados con HCC de Argentina entre el 1ero de Enero del 2009 al 1ero de Julio del 2019. Se analizaron datos públicos registrados de manera prospectiva del INCUCAI ([www.sintra.incucai.gov.ar](http://www.sintra.incucai.gov.ar)). De esta cohorte Argentina, se recolectaron número de trasplantes global y por HCC en cada período/año. Todos los pacientes con HCC trasplantados en este registro público recibieron previamente priorización para trasplante y se encontraban dentro de criterios de Milán (con puntaje suplementario de MELD). Nos focalizamos específicamente en los datos de número de pacientes enrolados en lista de espera, número de trasplantados por año y la proporción de candidatos a trasplante con HCC que recibieron priorización (n=7532 total de pacientes trasplantados, n=684 pacientes trasplantados con priorización por HCC). Estimamos el potencial incremento del número de pacientes con HCC priorizados y trasplantados desde el 2009 al 2019 aplicando las tres políticas de manera retrospectiva.

#### *Cohortes Latino Americanas.*

La probabilidad de recurrencia y sobrevida post trasplante hepático de acuerdo a las tres políticas de priorización se compararon aplicándolas en dos cohortes Latino Americanas, previamente detalladas en las etapas 2 y 3 de la Tesis (cohorte de trasplantados n=1085 y cohorte de enrolados en lista de espera n=917).

#### *Análisis estadístico.*

El evento primario de interés para la comparación entre políticas fue la recurrencia post trasplante hepático. Los eventos secundarios fueron el

delistamiento por progresión tumoral y la sobrevida global post trasplante hepático. Para los eventos post trasplante se analizó la cohorte Latino Americana de pacientes trasplantados (n=1085) y para los eventos en lista de espera, la cohorte descrita en la Etapa 3 de esta Tesis Doctoral (n=917).

Realizamos la misma metodología de análisis para la incidencia acumulada de recurrencia o de delistamiento por progresión tumoral, mediante riesgos competitivos, previamente detallados en etapas 2 y 3 de la Tesis (método de Fine y Gray)(63). Para la sobrevida global utilizamos el método de Kaplan Meier utilizando el test de log-rank (Mantel-Cox). Utilizamos STATA 13.0 (StataCorp, Texas, USA).

### **11.3. Resultados.**

Las cohortes Latino Americanas han sido descritas previamente en etapas 2 y 3 y en función de esta etapa se detallan en las Tablas 1 y 2. Globalmente la mediana en lista de espera fue de 4.9 meses (IQR 1.7-10.1), con una mediana de tiempo desde última evaluación radiológica al trasplante de 2.3 meses (IQR 1.0-4.6). La sobrevida global y la recurrencia post trasplante a 5 años fueron de 64.2% (CI 60.5-67.6) y de 16.6% (CI 13.5-20.3). Al enrolamiento en lista de espera el 84.4% de los pacientes estaba dentro de criterios de Milán con una sobrevida global de 64.0% (IC 59.9-67.8) y 52.5% (CI 41.3-62.7) para aquellos fuera de estos criterios. La recurrencia del HCC a 5 años post trasplante correspondiente a pacientes dentro y fuera de Milán fue de 13.7% (CI 10.5-17.8) y 34.2% (CI 24.5-46.4) [SHR 0.35 (CI 0.23;0.52; P<.0001)], respectivamente.

*Performance de cada política en eventos post trasplante hepático.*

*Política A. Criterios de Milán con restricción a valores de AFP <1000 ng/ml y expansión utilizando el protocolo UCSF-DS (n=1042).* Excluyendo pacientes con valores de AFP >1000 ng/ml al enrolamiento en lista de espera (n=39), 87.5% de la cohorte se encontraba dentro de Milán (n=912), 8.0% dentro de UCSF-DS (n=83) y 4.5% eran "sin límites" (n=47). A última evaluación tumoral radiológica pre trasplante, el 79.4% estaban dentro de criterios de Milán (n=827); 96% de éstos se mantuvo dentro de dichos criterios a lo largo del tiempo en lista de espera (n=794/827). El resto de los pacientes lograron *downstaging* hacia criterios de Milán desde el protocolo UCSF-DS (n=25/83) y desde el grupo "sin límites" (n=8/47). Por lo tanto, el *downstaging* exitoso hacia criterios de Milán ocurrió en el 30.1% (IC 20.5-41.7) de los pacientes dentro del grupo UCSF-DS y en el 17.0% (IC 7.6-30.8) en el grupo "sin límites". La recurrencia acumulada post trasplante hepático fue significativamente más alta tanto en los pacientes en el grupo UCSF-DS [SHR 2.81 (CI 1.12-7.06)] como en los del grupo "sin límites" [SHR 2.79 (CI 0.74-10.5)] comparados con aquellos pacientes que se mantuvieron dentro de criterios de Milán a lo largo del periodo de tiempo en lista de espera (Tabla 3; Figura 2A).

*Política B. Selección de pacientes y priorización de acuerdo al modelo Francés de AFP.* Al enrolamiento en lista, el 86.4% de los pacientes presentó un score  $\leq 2$  puntos (n=936) (Tabla 1). Cuando evaluamos cambios longitudinales a lo largo del tiempo en lista de espera, el 92.3% de los pacientes con un score de AFP  $\leq 2$  puntos al enrolamiento en lista se mantuvo con ese puntaje. Por otro lado, el 30.1% de los pacientes con un score de AFP >2 al enrolamiento en lista presentó una reducción de su score de AFP a menor o igual de puntos a la última evaluación tumoral pre trasplante. La recurrencia a 5 años fue superior en aquellos pacientes con scores de AFP >2 puntos comparados con aquellos con



un score  $\leq 2$  puntos [SHR 3.64 (IC 2.44-5.43);  $P < 0.0001$ ] (Tabla 3). La supervivencia y la recurrencia post trasplante fue similar en pacientes tanto dentro como fuera de Milán con un score de AFP  $\leq 2$ , pero fue significativamente superior en aquellos con un score  $> 2$  puntos, sea dentro o fuera de criterios de Milán (Figura 2B).

*Política C.* De acuerdo a lo propuesto, el DCE tuvo como objetivo la optimización de la selección de candidatos hacia dentro de Milán con un score de AFP  $\leq 2$ , utilizando cambios longitudinales en lista de espera (Tabla 4). Del total de pacientes que inicialmente se encontró dentro de criterios de Milán con un score  $\leq 2$  puntos (DCE), 84.9% de éstos se mantuvo dentro del DCE ( $n=736/867$ ). Del grupo de pacientes dentro de Milán pero con un score  $> 2$ , 32.9% ( $n=23/70$ ) se incorporaron al criterio DCE manteniéndose dentro de Milán y reduciendo su score de AFP a menor o igual a 2 puntos. Un 24.6% de pacientes fuera de Milán con un score de AFP  $\leq 2$  fueron incorporados al DCE luego de estrategias de reducción tumoral post tratamientos locorregionales ( $n=17/69$ ). Finalmente, solo un 17.1% del grupo fuera de Milán y con un score  $> 2$  puntos pudieron ser incorporados al DCE ( $n=13/77$ ).

La proporción de pacientes en cada subgrupo dentro y fuera del DCE a última evaluación pre trasplante se detalla en la Tabla 4. Globalmente, el DCE excluyó un 18.0% (IC 15.5-20.6), 73.5% (IC 62.7-82.7) y un 83.3% (IC 69.8-92.5) de pacientes dentro cada grupo acorde a la política A (dentro de Milán y exclusión AFP  $> 1000$  ng/ml, UCSF-DS y "sin límites", respectivamente). Para pacientes con un score de AFP  $\leq 2$  y  $> 2$  puntos, la proporción de exclusión aplicando el DCE fue de 19.1% (IC 16.6-21.2) y de 75.3% (IC 67.5-82.1), respectivamente.

La recurrencia post trasplante hepático fue significativamente inferior en todos los grupos dentro del DCE, a excepción de aquellos pacientes que se incorporaron al DCE desde fuera de Milán y con un score de AFP  $> 2$  puntos

(Tabla 5). En resumen, los pacientes dentro del DCE a última evaluación pre trasplante presentaron menor recurrencia que aquellos fuera del DCE [SHR 0.50 (CI 0.34;0.74); P=0.001] (Figura 2C).

#### *Performance de cada política en eventos pre trasplante hepático.*

En la segunda cohorte Latino Americana (n=917), incluyendo todos los pacientes enrolados en lista por HCC (Tabla 2), el delistamiento global por progresión tumoral en lista de espera a 1 y 2 años fue de 7.1% (IC 5.3-9.2%) y 20.2% (IC 15.2-25.9%). El delistamiento por progresión del HCC en lista de espera se incrementó desde los criterios de Milán 8.1% (IC 6.2-10.3%) a UCSF-DS 23.9% (IC 15.8-33.7%) y "sin límites" 27.3% (IC 16.1-41.0%) en la Política A (P<.0001). Los pacientes con un score de AFP >2, tanto dentro [24.6% (IC 14.5-37.3)] como fuera de Milán [25.9% (IC 17.0-36.5)] presentaron un mayor riesgo de delistamiento por progresión del HCC en lista cuando se los comparó con aquellos con un score ≤2 puntos, tanto dentro [7.1% (IC 5.3-9.3)] como fuera de criterios de Milán [23.7% (CI 15.0-33.9)]. Se observó un menor delistamiento por progresión tumoral en aquellos dentro del DCE al ingreso en [7.1% (IC 5.3-9.3%)] cuando se los comparó con aquellos fuera del DCE [24.8% (IC 19.2-31.0%); P<.0001] (Tabla Suplementaria).

#### *Expansión potencial en el número de pacientes trasplantados por HCC.*

Finalmente, exploramos la expansión en el número absoluto y relativo del número de pacientes que podrían haberse trasplantado entre los años 2009 y 2019 en Argentina aplicando las tres políticas de priorización (Milán/UCSF-DS, score de AFP, y DCE) en el registro prospectivo del INCUCAI ([www.sintra.incucai.gov.ar](http://www.sintra.incucai.gov.ar)). Los criterios de Milán-UCSF-DS podrían haber

resultado en un incremento relativo de 10.9% en el número total de pacientes trasplantados con HCC y un incremento del 2.1% en el total de pacientes trasplantados. El score de AFP podría haber generado un incremento de 3.3% y 0.6%, respectivamente. El DCE podría resultar de una optimización sin un incremento absoluto ni relativo en el número de pacientes trasplantados por HCC (Figura 3 A-C).

#### 11.4. Tablas y figuras.

Tabla 1. Características basales al enrolamiento en lista y a última valoración pre trasplante hepático en la cohorte Latino Americana con HCC y trasplante hepático.

<b>VARIABLE</b>	<b>Valor</b>
<b>Edad</b> , años ( $\pm$ SD)	58 $\pm$ 8
<b>Sexo masculino</b> , n (%)	844 (77.8)
<b>Mediana de tiempo en lista de espera</b> , (IQR), meses	4.9 (1.7-10.1)
<b>Cirrosis</b> , n (%)	
Si	1077 (99.3)
No	8 (0.7)
<b>Child Pugh A/B/C</b> , n (%)	499 (46)/420 (39)/166 (15)
<b>Etiología de enfermedad hepática asociada</b> , n (%)	
<i>Viral</i>	610 (56.4)
<i>Alcohol</i>	183 (16.9)
<i>Colestasis (CBP, CEP, CES)</i>	27 (2.0)
<i>Síndrome metabólico e hígado graso</i>	108 (10.0)
<i>Criptogénica</i>	98 (9.1)
<i>Autoinmune</i>	18 (1.7)
<i>Trastornos del metabolismo del hierro</i>	21 (1.9)
<i>Otros</i>	19 (1.7)
<b>HCV</b> , n (%)	463 (42.7)
<b>HBV</b> , n (%)	151 (13.9)
<b>Puntaje con priorización de MELD</b> , n (%)	875 (80.6)
<i>Datos tumorales al enrolamiento en lista</i>	
<b>Mediana de AFP</b> , ng/ml (IQR)	11.0 (4.5-52.3)
$\leq$ 100 ng/ml, n (%)	876 (81.0)
101-1000 ng/ml, n (%)	166 (15.4)
>1000 ng/ml, n (%)	39 (3.6)
<b>Dentro de Milán</b> , n (%)	938 (86.4)
AFP score $\leq$ 2 puntos	867 (92.5)
AFP score >2 puntos	71 (7.5)

<b>Fuera de Milán, n (%)</b>	147 (13.5)
AFP score ≤2 puntos	78 (52.7)
AFP score >2 puntos	69 (47.3)
<b>Milán + AFP &lt;1000 ng/ml, n (%)</b>	912 (87.5)
<b>UCSF-DS, n (%)</b>	83 (8.0)
<b>Sin límites, n (%)</b>	47 (4.5)
<b>Tratamiento locorregional, n (%)</b>	601 (55.4)
<i>Datos tumorales a última re evaluación</i>	
<b>Mediana de AFP, ng/ml (IQR)</b>	10.3 (4.4-44.2)
≤100 ng/ml, n (%)	892 (82.7)
101-1000 ng/ml, n (%)	148 (13.7)
>1000 ng/ml, n (%)	39 (3.6)
<b>Dentro de Milán, n (%)</b>	859 (79.2)
AFP score ≤2 puntos	771 (89.8)
AFP score >2 puntos	88 (10.2)
<b>Fuera de Milán, n (%)</b>	226 (20.8)
AFP score ≤2 puntos	166 (73.7)
AFP score >2 puntos	60 (26.3)
<b>Milán + AFP &lt;1000 ng/ml, n (%)</b>	827 (79.4)
Permaneció dentro de Milán + AFP <1000 ng/ml, n (%)	794 (96.0)
Downstaged desde UCSF-DS hacia Milán, n (%)	25 (3.0)
Downstaged desde "sin límites" hacia Milán, n (%)	8 (1.0)

**Abreviaciones:** AFP: alfa-fetoproteína; IQR: rango intercuartilo 25-75%; MELD: modelo para enfermedad hepática terminal; CBP: colangitis biliar primaria; CEP: colangitis esclerosante primaria y CES: secundaria.

Tabla 2. Cohorte Latino Americana de enrolados en lista de espera (n=917).

<b>VARIABLE</b>	<b>Valor</b>
<b>Edad, años (± SD)</b>	59 ± 8
<b>Sexo masculino, n (%)</b>	679 (74.0)
<b>Diabetes mellitus, n (%)</b>	264 (28.8)
<b>Mediana de tiempo en lista de espera, (IQR), meses</b>	7.4 (3.1-13.3)
<b>Etiología, n (%)</b>	
<b>Viral (HCV-HBV)</b>	495 (54.0)
<b>Alcohol</b>	161 (17.6)
<b>Colestasis</b>	19 (2.1)
<b>Síndrome metabólico e hígado graso</b>	112 (12.2)
<b>Criptogenica</b>	87 (9.5)
<b>Otras (Autoinmune, Hemocromatosis, misceláneas)</b>	43 (4.6)
<b>HCV, n (%)</b>	444 (48.4)
<b>HBV, n (%)</b>	54 (5.9)
<b>HCV-HBV co-infección, n (%)</b>	6 (0.6)
<b>Política A: (exclusión AFP &gt;1000 ng/ml), n (%)*</b>	
Dentro de Milán	731 (83.9)
Dentro de UCSF-DS	96 (10.9)
Sin límites	55 (6.2)
<b>Política B: AFP modelo, n (%)*</b>	

≤2 puntos	773 (84.9)
>2 puntos	137 (15.1)
<b>Política C: dentro de DCE, n (%)*</b>	688 (75.6)
<b>Tratamiento puente locorregional, n (%)</b>	638 (69.6)

**Abreviaciones:** DCE: doble criterio de elegibilidad. **Notas:** \*al enrolamiento en lista de espera.

Tabla 3. Resultados post trasplante de cada política de priorización en la cohorte de trasplantados de Latino América a última evaluación pre trasplante, intervalos de confianza del 95% (IC).

	<b>% Recurrencia a 5 años (IC 95%)</b>	<b>% Sobrevida a 5 años (IC 95%)</b>
<b>Política A*</b>		
Dentro Milán (n=794)	13.1 (9.9-17.2)	66.0 (61.8-70.0)
UCSF-DS (n=25)	28.4 (11.5-60.1)	51.0 (26.6-71.1)
"Sin límites" (n=8)	32.9 (11.9-71.3)	58.6 (26.7-80.5)
<b>Política B</b>		
AFP score ≤2 puntos (n=908)	12.2 (CI 9.4-15.9)	67.4 (63.4-70.9)
AFP score >2 puntos (n=175)	37.3 (CI 27.7-50.0)	49.4 (39.5-58.5)
<b>Política C</b>		
Dentro DCE (n=789)	13.3 (10.1-17.3)	67.0 (63.0-70.7)
Fuera DCE (n=294)	24.2 (17.4-33.1)	56.2 (48.0-65.9)

**Nota:** \*todos los pacientes con un valor de AFP <1000 ng/ml.

Tabla 4. Cambios longitudinales durante el tiempo en lista de espera en pacientes trasplantados.

	<b>DCE al enrolamiento en lista de espera</b>				<b>P</b>
	<b>DCE</b> n=867 (80.1%)	<b>Dentro Milán + AFP score &gt;2 pts</b> n=71 (6.5%)	<b>Fuera Milán + AFP score ≤2 pts</b> n=69 (6.4%)	<b>Fuera Milán + AFP score &gt;2 pts</b> n=78 (7.1%)	
<i>Datos al enrolamiento en lista</i>					
<b>Edad, años (± SD)</b>	58 ± 8	55 ± 11	58 ± 7	57 ± 11	0.02
<b>Sexo masculino, n (%)</b>	667 (76.9)	54 (77.1)	60 (87.0)	61 (79.2)	0.28
<b>MELD suplementario, n (%)</b>	722 (83.3)	54 (77.1)	53 (76.8)	44 (57.1)	<.0001
<b>Mediana de AFP, ng/ml (IQR)*</b>	9 (4-29)	668 (221-1254)	11 (4-38.9)	102 (7-631)	<.0001
≤100 ng/ml, n (%)	770 (88.8)	-	68 (98.5)	37 (49.3)	<.0001
101-1000 ng/ml, n (%)	97 (11.2)	45 (64.3)	1 (1.4)	24 (32.0)	
>1000 ng/ml, n (%)	-	25 (35.7)	-	14 (18.7)	

<b>Dentro de Milán, n (%)*</b>	867 (100)	70 (100)	0	0	<.0001
<b>AFP modelo, n (%)*</b>					
≤2 puntos	867 (100)	-	69 (100)	77 (100)	
>2 puntos	-	70 (100)	-	-	
<b>Tiempo en lista, mediana (IQR)</b>	5.0 (2.0-10.1)	4.0 (1.7-8.4)	3.8 (1.1-8.5)	3.9 (1.0-11.2)	0.12
<b>Tratamiento locorregional, n (%)</b>	445 (51.3)	44 (62.9)	51 (73.9)	60 (77.9)	<.0001
<i>Datos a última re evaluación</i>					
<b>Mediana AFP, ng/ml (IQR)*</b>	8 (4-23)	342 (124-1000)	13 (4-40)	47 (7-800)	<.0001
≤100 ng/ml, n (%)	773 (89.3)	14 (20.3)	64 (92.7)	41 (54.7)	<.0001
101-1000 ng/ml, n (%)	87 (10.0)	38 (55.1)	4 (5.8)	19 (25.3)	<.0001
>1000 ng/ml, n (%)	6 (0.7)	17 (24.6)	1 (1.4)	15 (20.0)	<.0001
<b>Criterios de Milán, n (%)*</b>					
Dentro	753 (86.8)	65 (92.9)	18 (26.1)	23 (29.9)	<.0001
Fuera	114 (13.1)	5 (7.1)	51 (73.9)	54 (70.1)	<.0001
<b>AFP modelo, n (%)*</b>					
≤2 puntos	801 (92.4)	23 (32.9)	63 (91.3)	21 (27.3)	<.0001
>2 puntos	66 (7.6)	47 (67.1)	6 (8.7)	55 (72.4)	<.0001
<b>Milán + AFP modelo, n (%)*</b>					
Dentro Milán/≤2 pts	736 (84.9)	23 (32.9)	17 (24.6)	13 (17.1)	<.0001
Dentro Milán/>2 pts	17 (2.0)	42 (60.0)	1 (1.4)	9 (11.8)	<.0001
Fuera Milán/≤2 pts	65 (7.5)	0	46 (66.7)	8 (10.5)	<.0001
Fuera Milán/>2 pts	49 (5.6)	5 (7.1)	5 (7.3)	46 (60.5)	<.0001

**Abreviaciones y notas:** \*A última evaluación pre trasplante. DCE: doble criterio de elegibilidad. Pts: puntos.

Tabla 5. Proporción de exclusión de pacientes en cada subgrupo de acuerdo a la última re evaluación de acuerdo al Doble Criterio de Elegibilidad (DCE)\*.

<b>Resultados, % (95% CI)</b>	<b>DCE al enrolamiento en lista</b>				<b>P</b>
	<b>DEC n=867</b>	<b>Dentro Milán + AFP score &gt;2 pts n=71</b>	<b>Fuera Milán + AFP score ≤2 pts n=69</b>	<b>Fuera Milán + AFP score &gt;2 pts n=78</b>	
<b>Exclusión**</b>	15.1 (12.8-17.7)	67.1 (54.9-77.9)	75.4 (63.5-84.9)	82.9 (72.9-90.7)	<.0001
<b>Inclusión a DCE</b>	-	32.9 (21.7-44.5)	24.6 (15.0-36.5)	17.1 (9.2-26.8)	<.0001
<b>Recurrencia 5-años</b>					
Dentro DCE final	7.7 (3.7-15.7)	8.1 (2.7-23.9)	4.5 (0.6-28.1)	44.2 (18.8-80.6)	.0006
Fuera DEC final	12.6 (9.4-16.9)	23.4 (8.1-56.7)	30.9 (17.1-52.0)	47.4 (32.4-65.5)	
<b>Sobrevida 5-años</b>					
Dentro DCE final	67.2 (63.0-71.1)	69.7 (41.7-86.1)	72.2 (47.8-86.6)	45.1 (15.5-71.2)	0.14
Fuera DEC final	67.9 (57.0-77.0)	66.6 (42.3-80.3)	44.3 (26.9-60.5)	49.4 (34.8-62.3)	

**Nota:** Cambios longitudinales durante el tiempo en lista luego del tratamiento locorregional y a última evaluación pre trasplante, de acuerdo a cada grupo propuesto en el DCE.

Tabla Suplementaria. Resultados pre trasplante en la cohorte Latino Americana de enrolados en lista de espera.

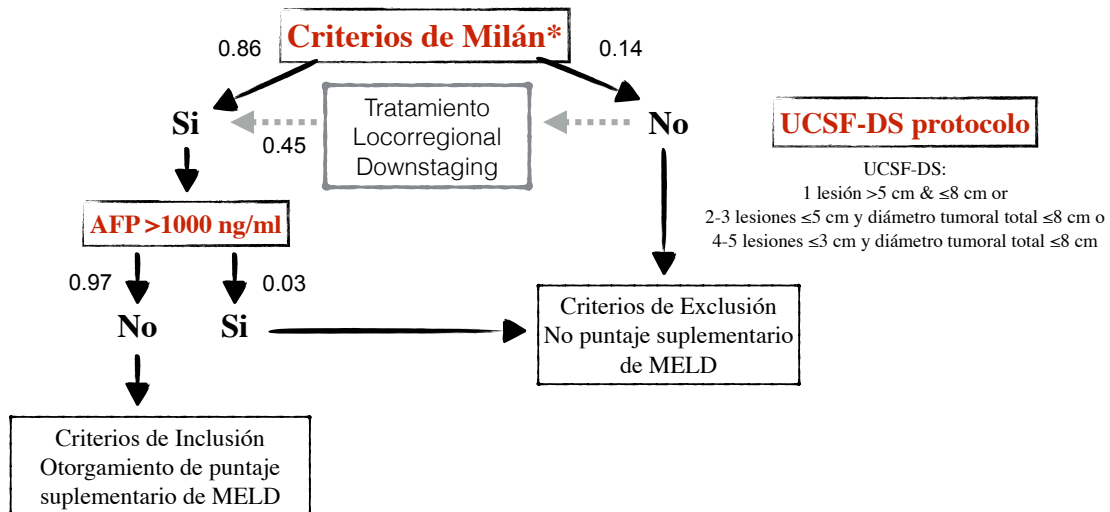
	% Mortalidad en lista (IC 95)	% Delistamiento por progresión del HCC (95% IC)
<b>Política A</b>		
Dentro Milán (n=731)	6.5 (4.9-8.4)	8.1 (6.2-10.3)
UCSF-DS (n=96)	11.5 (6.6-18.3)	23.9 (15.8-33.7)
"Sin límites" (n=55)	14.0 (5.8-26.7)	27.3 (16.1-41.0)
<b>Política B</b>		
AFP score ≤2 puntos (n=773)	6.7 (5.1-8.7)	9.2 (7.2-11.4)
AFP score >2 puntos (n=137)	11.5 (6.9-17.5)	24.1 (17.2-32.1)
<b>Política C</b>		
Dentro DCE (n=688)	6.3 (4.7-8.3)	7.1 (5.3-9.3)
Fuera DCE (n=222)	11.0 (7.4-15.5)	24.8 (19.2-31.0)

**Nota:** \*todos los pacientes con un valor de AFP <1000 ng/ml.

**Abreviaciones:** AFP: alfa-feto proteína; UCSF-DS: Universidad de California San Francisco; DS: protocolo de *downstaging*; DCE: doble criterio de elegibilidad.

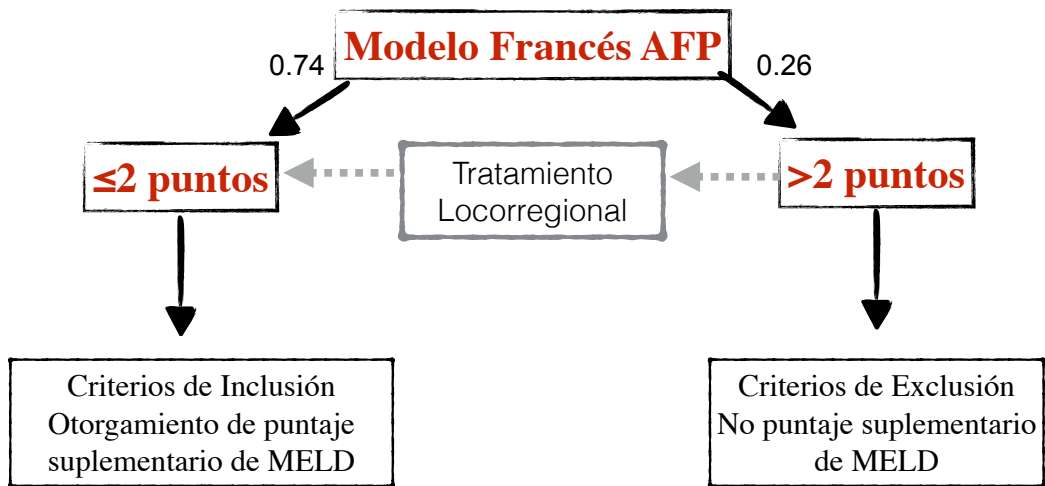
Figura 1. Probabilidades poblacionales en función de cada política de priorización.

A.

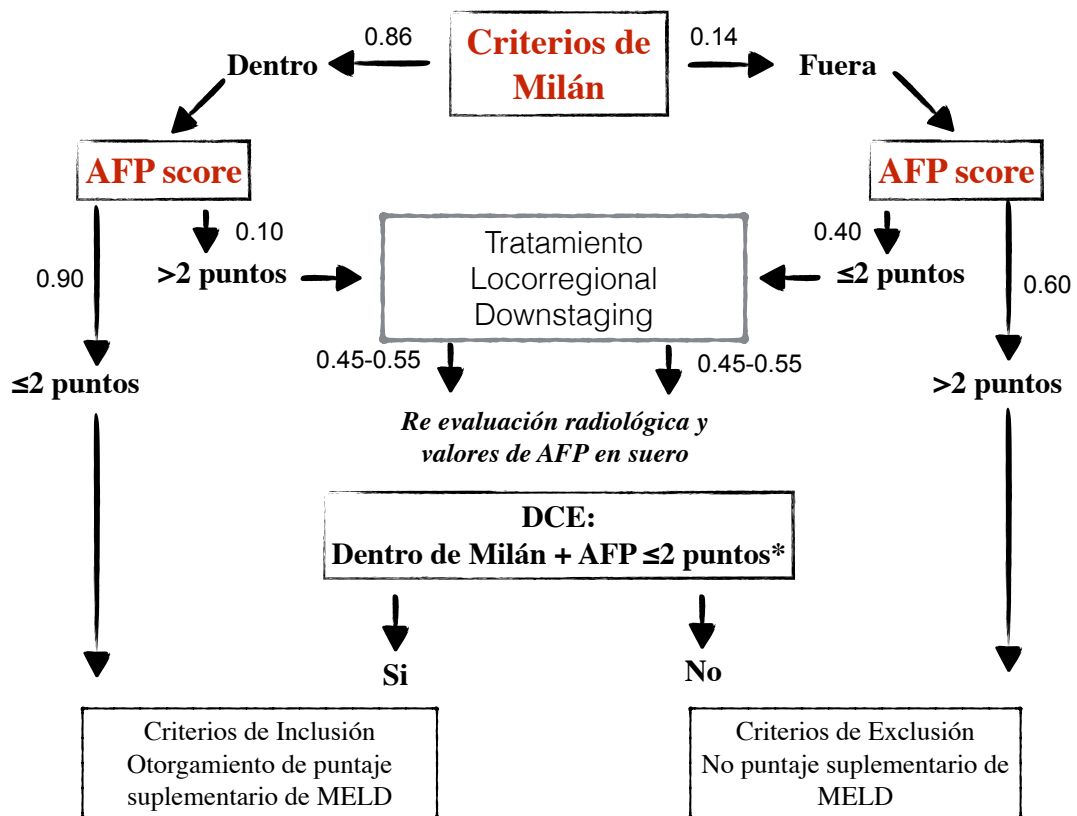


\*Población total = Milan + (Milan x 114 /100)

B.



C.

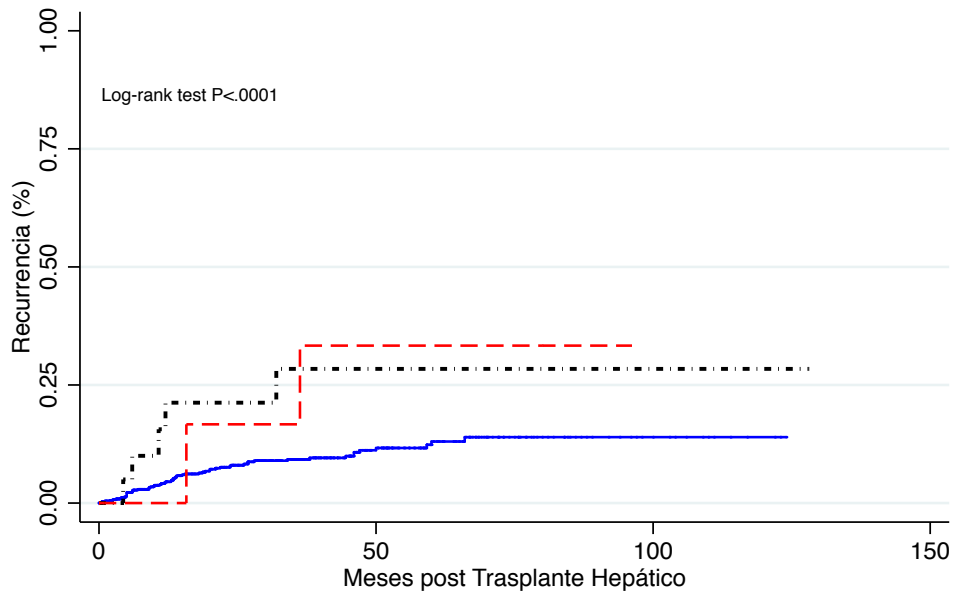


\*Luego del tratamiento locorregional puente al trasplante y habiéndose mantenido los límites tumorales estables durante un período mínimo de observación de 3 meses.

Figura 2. Incidencia acumulada de recurrencia en cada política de priorización.

A.



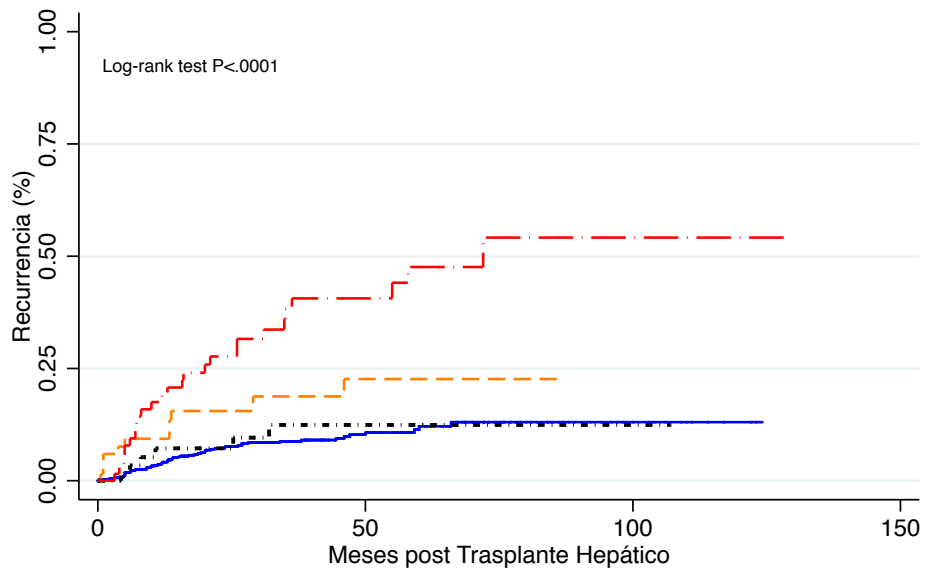


Número en riesgo				
Dentro de Milán/Milán	794	186	14	0
UCSF-DS/Dentro de Milán	25	3	1	0
Sin límites/Dentro de Milán	8	3	0	0

—	Dentro de Milán/Milán	·····	UCSF-DS/Dentro de Milán
- - -	Sin límites/Dentro de Milán		

B.



Número en riesgo				
Dentro de Milán + AFP <= 2 pts	867	188	15	0
Dentro de Milán + AFP > 2 pts	70	19	0	0
Fuera de Milán + AFP <= 2 pts	69	14	1	0
Fuera de Milán + AFP > 2 pts	77	17	1	0

—	Dentro de Milán + AFP <= 2 pts	- - -	Dentro de Milán + AFP > 2 pts
·····	Fuera de Milán + AFP <= 2 pts	- · - ·	Fuera de Milán + AFP > 2 pts

C.

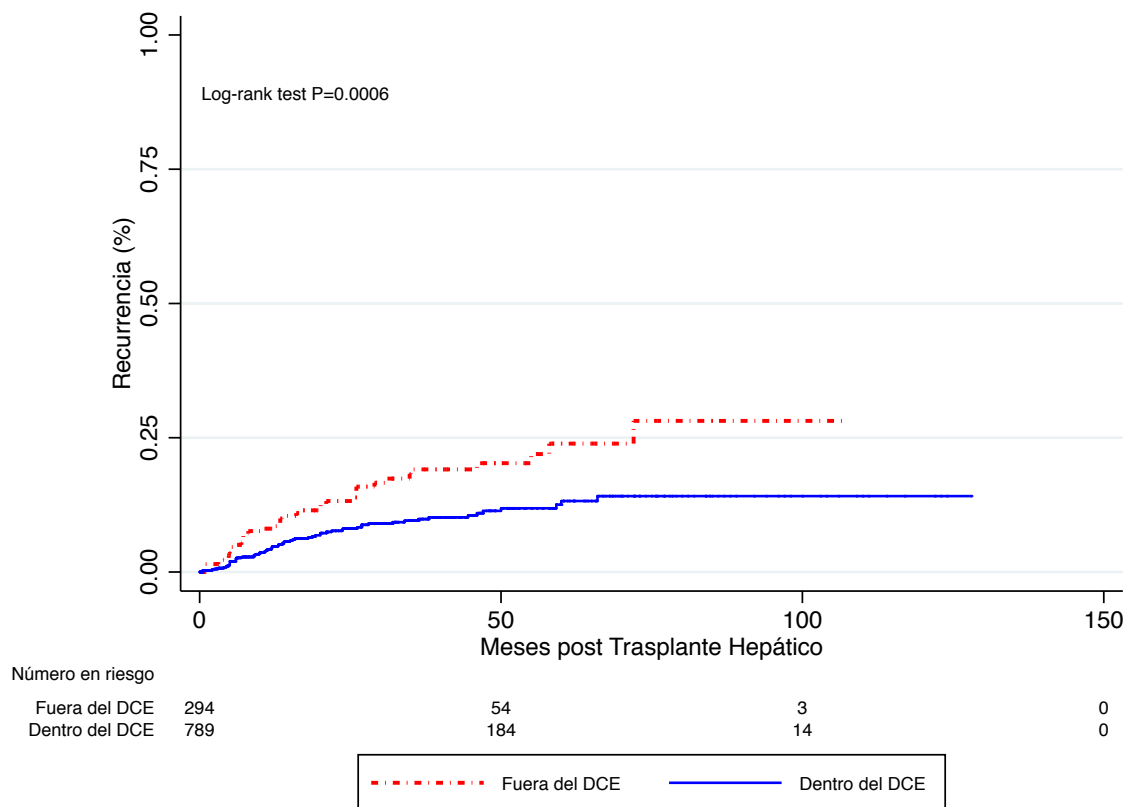
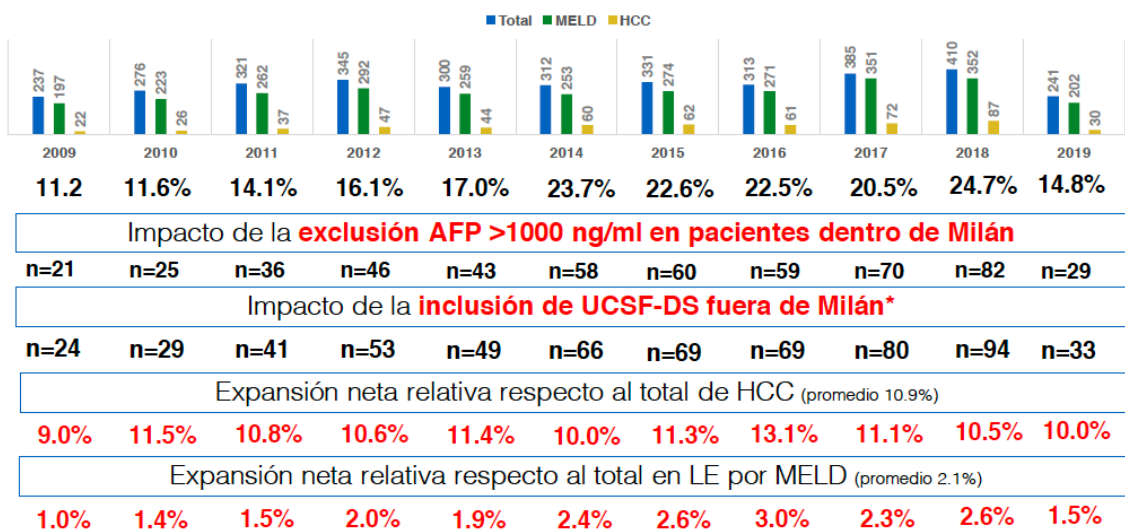


Figura 3. Análisis de decisiones y expansión del número de pacientes con HCC en cada política de priorización.

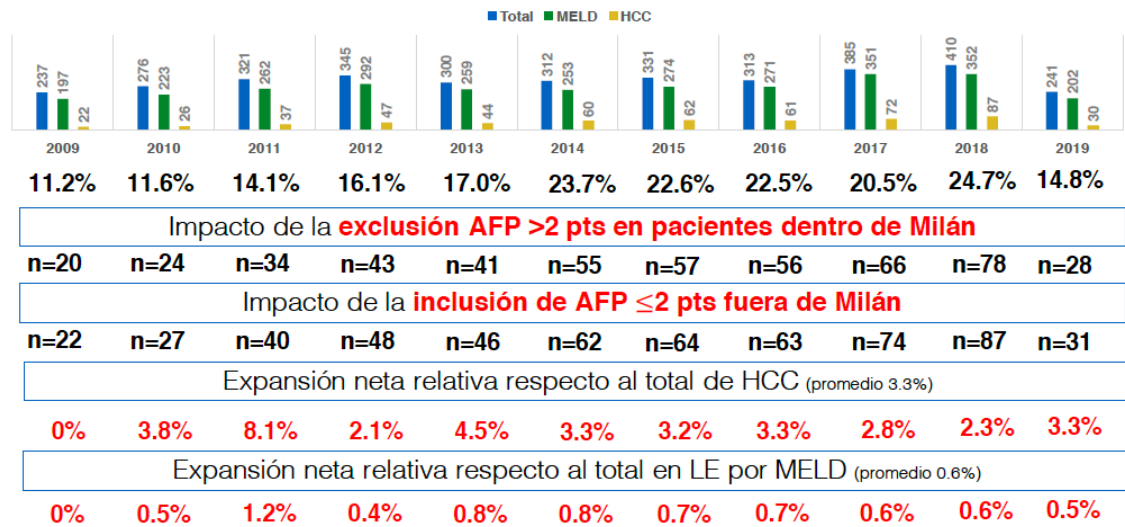
A.

**1-¿Cómo impactarán estos cambios con el Modelo 1 (UNOS-Milan-UCSF DS)?**  
**Proporción de Trasplantes hepáticos por HCC 1/2009-7/2019**



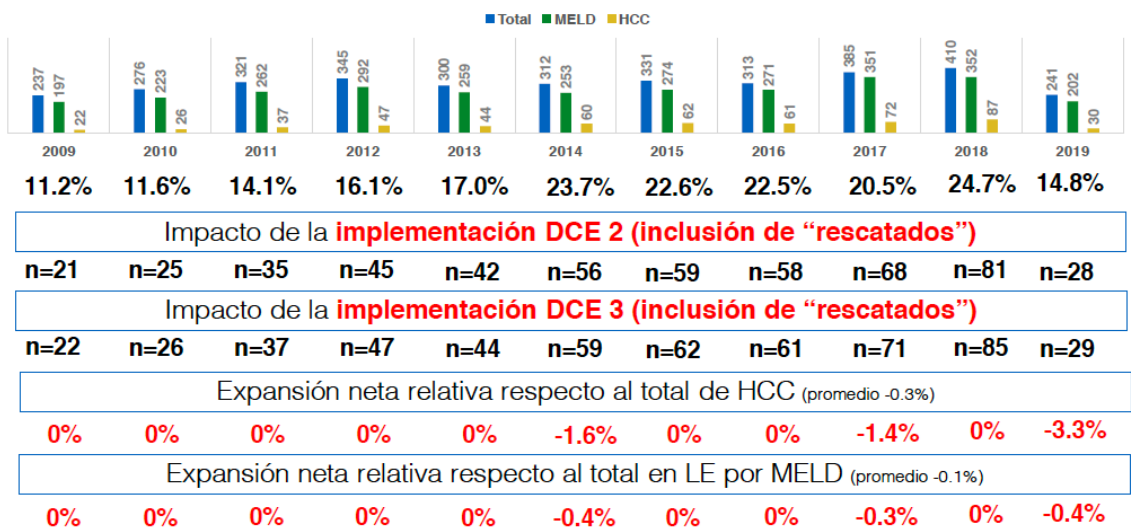
B.

**2- ¿Cómo impactarán estos cambios con el modelo AFP Francés?**  
**Proporción de Trasplantes hepáticos por HCC 1/2009-7/2019**



C.

**3- ¿Cómo impactarán estos cambios con el modelo DCE?**  
**Proporción de Trasplantes hepáticos por HCC 1/2009-7/2019**



**11.5. Discusión.**

Usando datos de dos cohortes Latino Americanas, una región con elevada mortalidad en lista, comparamos los resultados pre y post trasplante y la potencial expansión del número de pacientes con HCC que podrían trasplantarse aplicando tres políticas de priorización. Observamos que la recurrencia del HCC post trasplante fue superior en los pacientes con

*downstaging* aplicando tanto los criterios de UCSF-DS como aquellos "sin límites", comparado con pacientes dentro de Milán. Aplicando la segunda política de priorización, los pacientes con un score de AFP mayor a 2 puntos también presentaron un mayor riesgo de recurrencia y delistamiento por progresión tumoral. En relación al llamado al uso de modelos compuestos de parte de las distintas guías de práctica clínica (3,4,28), evaluamos un análisis de decisiones clínicas mediante un DCE incluyendo los criterios de Milán optimizados con el score de AFP. Comparamos este DCE con aquellas políticas de priorización de Francia (22,89) y de Estados Unidos (37). La potencial expansión en el número de pacientes con HCC que se priorizan para trasplante hepático podría desbalancear la oportunidad de trasplante si no se aplican criterios de elegibilidad y de priorización estrictos en pacientes con HCC. Contrariamente, no se observó una expansión significativa utilizando el DCE y por otro lado, se observó una optimización en el proceso de selección, con menor riesgo de delistamiento por progresión tumoral, recurrencia post trasplante y mejor sobrevida global.

En la mayoría de los países Latino Americanos, se utilizan los criterios de Milán para la selección y priorización con puntaje suplementario de MELD para pacientes con HCC. De acuerdo al registro prospectivo Argentino del INCUCAI, la mortalidad anual en lista de espera en el 2019 fue de 17% (<https://le.incucai.gov.ar/public/Modulo2.do>)(103). La mortalidad en lista en los pacientes sin HCC ha sido reportada de ser significativamente más elevada que aquellos pacientes con priorización con HCC en Argentina (28% vs 7%)(46). Por otro lado, el grupo HCC con priorización presenta menor delistamiento (3.8% vs 6.7%), y una mayor trasplantabilidad (83% vs 57%)(46). Resultados similares se han observado en Brasil (49,104). Evaluamos los potenciales efectos de la adopción

de cualquiera de las políticas de priorización en la asignación de órganos en el registro nacional Argentino y observamos que la priorización Milán-UCSF-DS podría incrementar significativamente el pool de pacientes con HCC en un 10.9%, mientras que el score de AFP implicaría un incremento menor (3.3%). El incremento en el número total de pacientes trasplantados de hígado sería del 2.1% y del 0.6%, respectivamente. El DCE resultaría en una expansión neutra con una marcada optimización de resultados pre y post trasplante hepático.

Existe otro grupo de pacientes que se encuentran inicialmente fuera de criterios de Milán pero podrían reducir su carga tumoral luego de la aplicación de tratamientos locorregionales (*downstaging*), para quienes el protocolo de UCSF-DS ha sido propuesto y adoptado en Estados Unidos (36-38,65). Sin embargo, como ya hemos detallado en etapas anteriores en esta tesis, su aplicación nacional Americana ha presentado resultados inferiores a los esperados, con un mayor riesgo de recurrencia y menor supervivencia post trasplante (37). Como hemos visto, la utilización de la AFP como herramienta adicional de elegibilidad a protocolos de *downstaging* es de sumo interés (37). Nuestros resultados regionales y aquellos ya presentados en la etapa 4. Recientemente, Quirino Lai y colaboradores Italianos desarrollaron el modelo WE-DS con el objetivo de seleccionar los mejores candidatos a *downstaging* de acuerdo a carga tumoral y valores de AFP (88). El Metroticket 2.0 (25), el modelo Francés (22) y el recientemente propuesto, el HALTHCC (105) también han presentado excelente performance y han sido externamente validados. Es claro que para obtener la mejor selección y mejores resultados con estrategias de reducción de estadio, los límites tumorales en cuanto a número y diámetro son insuficientes, siendo necesario la adquisición de la AFP como herramienta adicional.

### **11.6. Limitaciones.**

Sin embargo, distintos dilemas éticos son necesarios resaltar. En primer lugar, ¿el muy restrictivo el DCE? Puede que haya pacientes fuera del DCE que presentan resultados pre y post trasplante adecuados (ej: fuera de Milán y con valores de AFP score menor o igual a 2 puntos). Por lo tanto, ¿es ético excluir estos pacientes de priorización? Por otro lado, debemos diferenciar dos cuestiones que impresionan similares pero claramente son distintas. Primero, debemos elegir el mejor modelo de selección, de acuerdo a su performance, calibración y discriminación, idealmente con la mejor sobrevida post trasplante hepático. Segundo, el grado de priorización que se implemente en lista de espera puede generar inequidad en el acceso al trasplante si se prioriza excesivamente en pro de los pacientes con HCC. Ambos puntos corren en paralelo pero son independientes. Para una política de alocación de órganos, primero debiera evaluarse e incorporarse el mejor modelo de selección, luego evaluar el impacto y el grado de priorización tal que, no impacte negativamente en el resto de los pacientes no priorizados. Sin embargo, esto aún es tema de debate (44,45). Si se prioriza utilizando un modelo inadecuado o se sobre-expande y se sobre prioriza se estaría generando inequidad y mayor exclusión en pacientes sin HCC, particularmente en regiones con alta mortalidad en lista de espera (47).

### **11.7. Conclusiones de este capítulo.**

Creemos que nuestro análisis subraya por un lado que la expansión únicamente a través de número y diámetro tumoral es ineficiente y genera sobre expansión significativa. Por otro lado, la incorporación del modelo de selección Francés no conlleva una gran sobre expansión y permite optimizar la elegibilidad de candidatos a trasplante hepático. El análisis de decisiones clínicas mediante el

DCE, permite optimizar pero restringe una población que potencialmente tendría resultados aceptables post trasplante hepático. Nuestros resultados son relevantes desde el punto de vista de políticas de salud pública, incluyendo una perspectiva de optimización y área de mejora de la actual normativa nacional en Argentina, un país con elevada inequidad y mortalidad en lista en pacientes sin HCC en el escenario de escasez de donantes cadavéricos. De no mediar la aplicación del modelo de selección Francés, concluimos que un paso intermedio sería la aplicación del DCE, que en última instancia no sobre expande y por otro lado, optimiza el proceso de selección actual.

## 12. SÍNTESIS DE OBSERVACIONES Y CONCLUSIONES FINALES.

La recurrencia post trasplante hepático es un evento temible, con pobre sobrevida desde el diagnóstico y escasas posibilidades terapéuticas curativas, dada la naturaleza metastásica es considerada un estadio sistémico avanzado. Inicialmente, en la década del '80 el trasplante hepático para pacientes con hepatocarcinoma (HCC) tenía resultados muy pobres en cuanto a sobrevida a 5 años dado la elevada recurrencia tumoral post trasplante cercana al 65%. Estos resultados eran consecuencia de la ausencia de claros criterios de selección de candidatos a trasplante y al diagnóstico en estadios avanzados debido a la ausencia de tamizaje rutinario en la población de riesgo.

El auge del trasplante hepático por HCC a nivel mundial ha sido como consecuencia de las mejoras técnico-quirúrgicas y de inmunosupresión por un lado, y por otro, al desarrollo de criterios de selección de candidatos a trasplante (1 nódulo único  $\leq 5$  cm ó hasta 3 nódulos cuyo diámetro del nódulo mayor no sea  $>3$  cm) con excelente sobrevida ( $>70\%$ ) y baja recurrencia a 5 años ( $<15\%$ ) (7). Los criterios de Milan han revolucionado la trasplantología mundial y son hoy criterios estándar de selección.

Sin embargo, la selección de candidatos a trasplante pura y exclusivamente según número y diámetro tumoral se encuentra en la actualidad en foco de re-evaluación. Esta ola de "criterios de hiperselección" ha sucedido con la intención de equilibrar o dar mayor justicia en la alocaión de órganos (44).

*Modelos de predicción pre trasplante: Selección de candidatos.*

El primer paso entonces es determinar e identificar adecuadamente los factores de riesgo para la recurrencia post trasplante hepático. En definitiva, realizar un criterio de "hiper-selección" de candidatos a trasplante hepático e individualizar el riesgo. Sería ideal poder confeccionar un modelo de predicción



pre-trasplante mediante un análisis de datos longitudinales, por sobre una foto estática de un único momento pre trasplante, con el fin de anticipar e individualizar “in vivo” el riesgo de recurrencia.

Considerando únicamente las variables en cuanto a número de tumores y diámetro tumoral de manera “estática”, tanto los criterios de Milan como los de la Universidad de California San Francisco (UCSF) han sido desarrollados desde análisis del explante, y luego validados en imágenes. Los criterios de San Francisco y el modelo francés de AFP son los únicos que han sido validado en cohortes externas (1,14,22).

El uso de biomarcadores ha ganado camino en el proceso de mejora en la selección de candidatos a trasplante hepático, incluyendo la AFP pre trasplante (19,22) y la biopsia tumoral con valoración del grado de diferenciación tumoral pre trasplante (30). La AFP tanto en variable continua como variable dummy categórica o dicotómica es una variable relacionada con la recurrencia de manera independiente del tamaño y número de nódulos pre trasplante. Lo que es importante resaltar es que la AFP se correlaciona de manera independiente con factores de riesgo hallados en el explante como desdiferenciación nuclear o invasión microvascular y en modelos predictivos se realciona con un mayor riesgo de recurrencia de manera independiente (1,22). Es por esto que existe un auge en la inclusión de la AFP como variable de hiperselección. El problema radica en los cortes o cut-offs, que surgen de cohortes distintas y para nada aún consensuados, como por ejemplo <100 ng/ml, entre 101-1000 ng/ml ó >1000 ng/ml

(1,22,23); o incluso cortes por encima o por debajo de 400 ng/ml ó 500 ng/ml (39), e incluso de 66 ng/ml (58). Finalmente, un cambio longitudinal en el tiempo ha sido una propuesta interesante (59).

Sin embargo, estas variables algo estáticas no contemplan los cambios o dinamismo que surge del tiempo en lista de espera. De hecho, algunos autores han propuesto al tiempo en lista como el de una oportunidad única de selección "natural" para trasplante entre progresadores vs no progresadores (78). Esta propuesta es algo controvertida, ya que el tiempo en lista debe considerar la disponibilidad de órganos regional-local, las variables de riesgo individual y la necesidad o no de tratamiento locorregional puente al trasplante hepático (106).

En consecuencia, dado el dinamismo y cambios tumorales y de enfermedad hepática en la estadía en lista de espera, es necesario valorar estas variables de manera longitudinal o "dinámica" más que una mera foto al ingreso en lista o a la última valoración pre trasplante "estática" (22,36).

Estos modelos de predicción pre trasplante se acercan pero no son perfectos, dado una discordancia de imágenes pre trasplante y los hallazgos en el explante que en algunas series supera el 30%, como la publicada por Costentin C et al (1,23,24,30,106). Es decir que a pesar de la adecuada selección de candidatos en el pre trasplante la re evaluación es prioritaria con los datos del explante prioritariamente la evaluación de la presencia de invasión microvascular y el grado de desdiferenciación nuclear. Si bien estas dos últimas variables pueden ser evaluadas mediante una biopsia tumoral antes del trasplante (26,30), el riesgo de siembra tumoral y de complicaciones generan una limitante de seguridad. Asimismo, la realización de una biopsia tumoral muchas veces no es factible técnicamente y la ausencia de invasión microvascular en una biopsia tumoral no la excluye completamente. Por otro lado, a pesar de una adecuada concordancia o kappa agreement (intra-observador) en la evaluación del grado de diferenciación nuclear entre la

evaluación pre y post trasplante hepático (26), el grado de concordancia entre distintos observadores (inter-observador) ha sido reportado como bajo (55) o no fue evaluado (30). Es necesario entonces la valoración de los hallazgos del explante.

*Modelando el riesgo con variables pre y post trasplante hepático: Categorización.*

El artículo recientemente publicado por Costentin C y colaboradores (24) es de interés en cuanto a resaltar lo siguiente a) El causal de discordancia por imágenes debida como consecuencia al tiempo en lista de espera y la consecuente progresión tumoral ("verdadera" discordancia o simplemente "progresión en lista"), b) Cuál fue el punto basal de comparación, según se considere la valoración por imágenes al ingreso en lista o a la última valoración pre trasplante; c) Los efectos del tratamiento locorregional en lista de espera, y d) en definitiva, la necesidad de re categorización del riesgo luego del análisis del explante.

Pero entonces, ¿cuál es la utilidad de categorizar el riesgo de recurrencia? En primera instancia, la categorización o predicción del riesgo a punto de partida de la construcción de modelos de predicción mediante el uso de modelos multivariados tiene en cuenta promedios poblacionales y no individuales. Para el calculo de riesgo individual o inter-individual, debieramos considerar la variabilidad individual, que estos modelos de regresión logística o de regresión Cox no toman en cuenta (107). Es por esto que existe la necesidad trasplantológica de crear modelos de predicción que contemplen variables pre y post trasplante hepático, integrando el riesgo en conjunto con variables o marcadores biológicos.

La comparación de los 4 modelos de predicción basados en variables del explante realizada por Costentin C et al (20) demostró que los criterios de Mazzaferro (Up-to 7 o Metroticket)(18) y el modelo de Decaens et al (26) presentaron el mejor poder de discriminación o AUROC de 0.79 y de 0.74, respectivamente. Incluso en ausencia de la variable invasión microvascular en los criterios de Mazzaferro V et al, como originalmente han sido propuestos.

Sin embargo, estos modelos discriminan únicamente dos poblaciones de riesgo bajo (<10%) y de alto riesgo (>40%) de recurrencia post trasplante. La agrupación única en dos poblaciones de riesgo no es útil o por lo menos, poco aplicable. El riesgo dividido en bajo (<10%) y alto (>40%) genera un amplio gris entre 10-40% de sujetos que estarán en riesgo intermedio, sin tener en claro que se puede hacer con estos y poco transmitible al paciente individual. Recientemente, se ha confeccionado un score predictor incluyendo variables pre y post trasplante, el RETREAT score (23). A pesar de un adecuado poder de discriminación (AUROC 0.82 CI 0.77;0.86), en este score como en otros se amplía el marco de categorización de riesgo sin una clara diferencia en subgrupos intermedios. En el marco de la elección de un corte dicotómico sobre una curva ROC, la elección del mismo dependerá de que perfil de selección uno quiere, sea más sensible o más específico.

En resumen, siempre habrá tiempo de mejora de estos modelos, que deben ser validados de manera interna y luego en cohortes externas. Existe una necesidad de mejora en estos modelos de predicción tanto a nivel poblacional e individual con el fin de categorizar en al menos 3 grupos de riesgo de recurrencia sea bajo <10%, intermedio 11-20% y elevado >20%. Esto implicaría una mejora en los procesos de selección de candidatos, una distribución más equitativa respecto a la oferta de donantes y por otro lado, la posibilidad de estratificación del

riesgo para el desarrollo de futuros estudios de adyuvancia o inmunosupresión (108). A fin de cuentas, es importante tener presente que estos modelos de regresión informan un riesgo promedio poblacional y no individual. De allí la necesidad de mejora en la generación de estos modelos y la dificultad de la aplicación o su traslado real al paciente individual.

### 13. Referencias bibliográficas.

1. Piñero F, Tisi Baña M, de Ataide EC, Hoyos Duque S, Marciano S, Varón A, et al. Liver Transplantation for Hepatocellular carcinoma: Evaluation of the AFP model in a multicenter cohort from Latin America. *Liver Int.* 2016;36:1657–1667.
2. Toso C, Andres A, Kneteman N, Hernandez-Alejandro R, Majno P. Alpha-fetoprotein: further evidence to add a biological marker to refine Milan criteria. *Liver International.* 2016;36:1580–1581.
3. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J-L, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology.* 2018;69:182–236.
4. Piñero F, Tanno M, Soteras GA, Baña MT, Dirchwolf M, Fassio E, et al. *Annals of Hepatology.* Ann Hepatol. 2020;19:546–569.
5. Toso C, Cader S, Mentha-Dugerdil A, Meeberg G, Majno P, Morard I, et al. Factors predicting survival after post-transplant hepatocellular carcinoma recurrence. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2012;20:342–347.
6. Mazzaferro VV, Regalia EE, Doci RR, Andreola SS, Pulvirenti AA, Bozzetti FF, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996;334:693–699.
7. Mazzaferro V, Bhoori S, Sposito C, Bongini M, Langer M, Miceli R, et al. Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: An evidence-based analysis of 15 years of experience. *Liver Transplantation.* 2011;17:S44–S57.
8. Sharma P, Balan V, Hernandez JL, Harper AM, Edwards EB, Rodriguez-Luna H, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: The MELD impact. *Liver Transplantation.* 2004;10:36–41.
9. Thuluvath PJ, Guidinger MK, Fung JJ, Johnson LB, Rayhill SC, Pelletier SJ. Liver Transplantation in the United States, 1999-2008. *American Journal of Transplantation.* 2010;10:1003–1019.
10. Davis E, Wiesner R, Valdecasas J, Kita Y, Rossi M, Schwartz M. Treatment of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Liver Transplantation.* 2011;17:S162–S166.
11. Toso C, Mentha G, Majno P. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Five Steps to Prevent Recurrence. *American Journal of Transplantation.* 2011;11:2031–2035.
12. Shin WY, Suh K-S, Lee HW, Kim J, Kim T, Yi N-J, et al. Prognostic factors affecting survival after recurrence in adult living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Liver Transplantation.* 2010;16:678–684.
13. Yao F. A follow-up analysis of the pattern and predictors of dropout from

the waiting list for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: Implications for the current organ allocation policy. *Liver Transplantation*. 2003;9:684–692.

14. Yao FY. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Beyond the Milan Criteria. *American Journal of Transplantation*. 2008;8:1982–1989.
15. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology*. 2001;33:1394–1403.
16. Ito T, Takada Y, Ueda M, Haga H, Maetani Y, Oike F, et al. Expansion of selection criteria for patients with hepatocellular carcinoma in living donor liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2007;13:1637–1644.
17. Herrero JI, Sangro B, Pardo F, Quiroga J, Iñarrairaegui M, Rotellar F, et al. Liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma across Milan criteria. *Liver Transplantation*. 2008;14:272–278.
18. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncology*. 2009;10:35–43.
19. Toso C, Trotter J, Wei A, Bigam DL, Shah S, Lancaster J, et al. Total tumor volume predicts risk of recurrence following liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transplantation*. 2008;14:1107–1115.
20. Vibert E, Azoulay D, Hoti E, Iacopinelli S, Samuel D, Salloum C, et al. Progression of Alpha-fetoprotein Before Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Patients: A Critical Factor. *American Journal of Transplantation*. 2009;10:129–137.
21. Hameed B, Mehta N, Sapisochin G, Roberts JP, Yao FY. Alpha-fetoprotein level > 1000 ng/mL as an exclusion criterion for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma meeting the Milan criteria. *Liver Transplantation*. 2014;20:945–951.
22. Duvoux C, Thoraval FR, Decaens T, Pessione F, Badran H, Piardi T, et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: A Model Including -Fetoprotein Improves the Performance of Milan Criteria. *Gastroenterology*. 2012;143:986–994.e3.
23. Mehta N, Heimbach J, Harnois DM, Sapisochin G, Dodge JL, Lee D, et al. Validation of a Risk Estimation of Tumor Recurrence After Transplant (RETREAT) Score for Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Liver Transplant. *JAMA Oncol*. 2017;3:493–500.
24. Costentin CE, Amaddeo G, Decaens T, Boudjema K, Bachellier P, Muscari F, et al. Prediction of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation: comparison of 4 explant-based prognostic models. *Liver*

International. 2017;37:717–726.

25. Mazzaferro V, Sposito C, Zhou J, Pinna AD, De Carlis L, Fan J, et al. Metroticket 2.0 Model for Analysis of Competing Risks of Death After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2018;154:128–139.
26. Decaens T, Roudot-Thoraval F, Badran H, Wolf P, Durand F, Adam R, et al. Impact of tumour differentiation to select patients before liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Liver International*. 2011;31:792–801.
27. Montal R, Andreu-Oller C, Bassaganyas L, Esteban-Fabré R, Moran S, Montironi C, et al. Molecular portrait of high alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: implications for biomarker-driven clinical trials. *British Journal of Cancer*. 2019;121:340–343.
28. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018;67:358–380.
29. Otto G, Herber S, Heise M, Lohse AW, Mönch C, Bittinger F, et al. Response to transarterial chemoembolization as a biological selection criterion for liver transplantation in hepatocellular carcinoma. *Liver Transplantation*. 2006;12:1260–1267.
30. Sapisochin G, Goldaracena N, Laurence JM, Dib M, Barbas A, Ghanekar A, et al. The extended Toronto criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: A prospective validation study. *Hepatology*. 2016;64:2077–2088.
31. Notarpaolo A, Layese R, Magistri P, Gambato M, Colledan M, Magini G, et al. Validation of the AFP model as a predictor of HCC recurrence in patients with viral hepatitis-related cirrhosis who had received a liver transplant for HCC. *Journal of hepatology*. 2017;66:552–559.
32. Schuster NA, Hoogendijk EO, Kok AAL, Twisk JWR, Heymans MW. Ignoring competing events in the analysis of survival data may lead to biased results: a non-mathematical illustration of competing risk analysis. *J Clin Epidemiol*. 2020;122:42–48.
33. Yao FY, Kerlan RK Jr., Hirose R, Davern TJ III, Bass NM, Feng S, et al. Excellent outcome following down-staging of hepatocellular carcinoma prior to liver transplantation: An intention-to-treat analysis. *Hepatology*. 2008;48:819–827.
34. Yao FY, Mehta N, Flemming J, Dodge J, Hameed B, Fix O, et al. Downstaging of hepatocellular cancer before liver transplant: long-term outcome compared to tumors within Milan criteria. *Hepatology*. 2015;61:1968–1977.
35. Gordon-Weeks AN, Snaith A, Petrinic T, Friend PJ, Burls A, Silva MA. Systematic review of outcome of downstaging hepatocellular cancer



- before liver transplantation in patients outside the Milan criteria. *Br J Surg*. 2011;98:1201–1208.
36. Parikh ND, Waljee AK, Singal AG. Downstaging hepatocellular carcinoma: A systematic review and pooled analysis. *Liver Transplantation*. 2015;21:1142–1152.
  37. Mehta N, Dodge JL, Grab JD, Yao FY. National Experience on Downstaging of Hepatocellular Carcinoma before Liver Transplant: Influence of Tumor Burden, AFP, and Wait Time. *Hepatology*. 2020;71:943–954.
  38. Sinha J, Mehta N, Dodge JL, Poltavskiy E, Roberts J, Yao F. Are There Upper Limits in Tumor Burden for Down-Staging of Hepatocellular Carcinoma to Liver Transplant? Analysis of the All-Comers Protocol. *Hepatology*. 2019;70:1185–1196.
  39. Toso C, Asthana S, Bigam DL, Shapiro AMJ, Kneteman NM. Reassessing selection criteria prior to liver transplantation for hepatocellular carcinoma utilizing the scientific registry of transplant recipients database. *Hepatology*. 2008;49:832–838.
  40. Bruix J, Cheng A-L, Meinhardt G, Nakajima K, De Sanctis Y, Llovet J. Prognostic factors and predictors of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma: Analysis of two phase III studies. *Journal of hepatology*. 2017;67:999–1008.
  41. Llovet JM, Montal R, Sia D, Finn RS. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018;:1–18.
  42. Nault J-C, Martin Y, Caruso S, Hirsch TZ, Bayard Q, Calderaro J, et al. Clinical Impact of Genomic Diversity From Early to Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2020;:hep.30811.
  43. Kamath P. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001;33:464–470.
  44. Goldberg D, French B, Abt P, Feng S, Cameron AM. Increasing disparity in waitlist mortality rates with increased model for end-stage liver disease scores for candidates with hepatocellular carcinoma versus candidates without hepatocellular carcinoma. *Liver Transplantation*. 2012;18:434–443.
  45. David Goldberg, Benjamin French P, Craig Newcomb MS, Qing Liu BS, Gurvaneet Sahota M, Anna E Wallace M, et al. Patients with Hepatocellular Carcinoma Have Highest Rates of Wait-listing for Liver Transplantation Among Patients With End-stage Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2016;14:1638–1646.
  46. Cejas NG, Villamil FG, Lendoire JC, Tagliafichi V, Lopez A, Krogh DH, et al. Improved Waiting-List Outcomes in Argentina After the Adoption of a Model for End-Stage Liver Disease-Based Liver Allocation Policy. *Liver Transplantation*. 2013;19:711–720.

47. Salvalaggio PR, Caicedo JC, de Albuquerque LC, Contreras A, Garcia VD, Felga GE, et al. Liver Transplantation in Latin America. *Transplantation*. 2014;98:241–246.
48. Massie AB, Caffo B, Gentry SE, Hall EC, Axelrod DA, Lentine KL, et al. MELD Exceptions and Rates of Waiting List Outcomes. *Am. J. Transplant*. 2011;11:2362–2371.
49. Rodriguez S, FLECK JR A de M, MUCENIC M, MARRONI C, BRANDÃO A. Hepatocellular carcinoma patients are advantaged in the current Brazilian liver transplant allocation system. A competing risk analysis. *Arq. Gastroenterol*. 2020;57:19–23.
50. Ayuso C, Rimola J, Vilana R, Burrel M, Darnell A, García-Criado Á, et al. Accepted Manuscript. *European Journal of Radiology*. 2018;:1–46.
51. Villanueva A, Hoshida Y, Battiston C, Tovar V, Sia D, Alsinet C, et al. Combining Clinical, Pathology, and Gene Expression Data to Predict Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2011;140:1501–1512.e2.
52. Elm von E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Lancet*. 2007;370:1453–1457.
53. Sapisochin G, Goldaracena N, Laurence JM, Dib M, Barbas A, Ghanekar A, et al. The extended Toronto criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: A prospective validation study. *Hepatology*. 2016;67:381–400.
54. Chan EY, Larson AM, Fix OK, Yeh MM, Levy AE, Bakthavatsalam R, et al. Identifying risk for recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: Implications for surveillance studies and new adjuvant therapies. *Liver Transplantation*. 2008;14:956–965.
55. Parfitt JR, Marotta P, AIGhamdi M, Wall W, Khakhar A, Suskin NG, et al. Recurrent hepatocellular carcinoma after transplantation: Use of a pathological score on explanted livers to predict recurrence. *Liver Transplantation*. 2007;13:543–551.
56. Iwatsuki S, Dvorchik I, Marsh JW, Madariaga JR, Carr B, Fung JJ, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a proposal of a prognostic scoring system. *ACS*. 2000;191:389–394.
57. Wong LL, Naugler WE, Schwartz J, Scott DL, Bhattacharya R, Reyes J, et al. Impact of locoregional therapy and alpha-fetoprotein on outcomes in transplantation for liver cancer: a UNOS Region 6 pooled analysis. *Clin Transplant*. 2012;27:E72–E79.
58. Berry K, Ioannou GN. Serum alpha-fetoprotein level independently predicts posttransplant survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transplantation*. 2013;19:634–645.

59. Dumitra TC, Dumitra S, Metrakos PP, Barkun JS, Chaudhury P, Deschênes M, et al. Pretransplantation  $\alpha$ -Fetoprotein Slope and Milan Criteria. *Transplantation*. 2013;95:228–233.
60. Sharma P, Schaubel DE, Sima CS, Merion RM, Lok ASF. Re-weighting the Model for End-Stage Liver Disease Score Components. *Gastroenterology*. 2008;135:1575–1581.
61. Majno P, Lencioni R, Mornex F, Girard N, Poon RT, Cherqui D. Is the treatment of hepatocellular carcinoma on the waiting list necessary? *Liver Transplantation*. 2011;17:S98–S108.
62. Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, Steyerberg EW. Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. *Statist. Med.* 2010;30:11–21.
63. Dignam JJ, Zhang Q, Kocherginsky M. The Use and Interpretation of Competing Risks Regression Models. *Clinical Cancer Research*. 2012;18:2301–2308.
64. Ravaioli M, Grazi GL, Piscaglia F, Trevisani F, Cescon M, Ercolani G, et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Results of Down-Staging in Patients Initially Outside the Milan Selection Criteria. *American Journal of Transplantation*. 2008;8:2547–2557.
65. Yao FY, Hirose R, LaBerge JM, Davern TJ, Bass NM, Kerlan RK, et al. A prospective study on downstaging of hepatocellular carcinoma prior to liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2005;11:1505–1514.
66. Carrilho FJ, Paranaguá-Vezozzo DC, Chagas AL, Alencar RS de SM, da Fonseca LG. Epidemiology of Liver Cancer in Latin America: Current and Future Trends. *Semin Liver Dis.* 2020;40:101–110.
67. Paranaguá-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Mora MV, Farias AQ, Cunha-Silva M, França JID, et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol.* 2014;13:386–393.
68. Piñero F, Costa P, Boteon YL, Duque SH, Marciano S, Anders M, et al. A changing etiologic scenario in liver transplantation for hepatocellular carcinoma in a multicenter cohort study from Latin America. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2018;42:443–452.
69. Lencioni R, Llovet J. Modified RECIST (mRECIST) Assessment for Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2010;30:052–060.
70. Mehta N, Dodge JL, Goel A, Roberts JP, Hirose R, Yao FY. Identification of liver transplant candidates with hepatocellular carcinoma and a very low dropout risk: Implications for the current organ allocation policy. *Liver Transplantation*. 2013;19:1343–1353.
71. Mehta N, Sarkar M, Dodge JL, Fidelman N, Roberts JP, Yao FY. Intention to treat outcome of T1 hepatocellular carcinoma with the “wait and not ablate” approach until meeting T2 criteria for liver transplant listing. *Liver*

Transplantation. 2016;22:178–187.

72. Faitot F, Allard M-A, Pittau G, Ciaccio O, Adam R, Castaing D, et al. Impact of clinically evident portal hypertension on the course of hepatocellular carcinoma in patients listed for liver transplantation. *Hepatology*. 2015;62:179–187.
73. Cucchetti A, Cescon M, Bigonzi E, Piscaglia F, Golfieri R, Ercolani G, et al. Priority of candidates with hepatocellular carcinoma awaiting liver transplantation can be reduced after successful bridge therapy. *Liver Transplantation*. 2011;17:1344–1354.
74. Samoylova ML, Dodge JL, Mehta N, Yao FY, Roberts JP. Evaluating the validity of model for end-stage liver disease exception points for hepatocellular carcinoma patients with multiple nodules. *Clin Transplant*. 2014;29:52–59.
75. Vitale A, D'Amico F, Frigo AC, Grigoletto F, Brolese A, Zanusi G, et al. Response to Therapy as a Criterion for Awarding Priority to Patients With Hepatocellular Carcinoma Awaiting Liver Transplantation. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:2290–2302.
76. Mehta N, Dodge JL, Goel A, Roberts JP, Hirose R, Yao FY. Identification of liver transplant candidates with hepatocellular carcinoma and a very low dropout risk: Implications for the current organ allocation policy. *Liver Transplantation*. 2013;19:1343–1353.
77. Halazun KJ, Patzer RE, Rana AA, Verna EC, Griesemer AD, Parsons RF, et al. Standing the test of time: Outcomes of a decade of prioritizing patients with hepatocellular carcinoma, results of the UNOS natural geographic experiment. *Hepatology*. 2014;60:1957–1962.
78. Samoylova ML, Dodge JL, Yao FY, Roberts JP. Time to transplantation as a predictor of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2014;20:937–944.
79. Bittermann T, Hoteit MA, Abt PL, Forde KA, Goldberg D. Waiting Time and Explant Pathology in Transplant Recipients With Hepatocellular Carcinoma: A Novel Study Using National Data. *American Journal of Transplantation*. 2014;14:1657–1663.
80. Toso C, Majno P, Berney T, Morel P, Mentha G, Combescure C. Validation of a dropout assessment model of candidates with/without hepatocellular carcinoma on a common liver transplant waiting list. *Transplant Int*. 2014;27:686–695.
81. Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *Journal of hepatology*. 2016;:1–7.
82. Reig MA, Mariño Z, Perelló C, Iñarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, et al. Unexpected early tumor recurrence in patients with hepatitis C virus -

related hepatocellular carcinoma undergoing interferon-free therapy: a note of caution. *Journal of hepatology*. 2016;65:719–726.

83. Zanetto A, Shalaby S, Vitale A, Mescoli C, Ferrarese A, Gambato M, et al. Dropout rate from the liver transplant waiting list because of hepatocellular carcinoma progression in hepatitis C virus-infected patients treated with direct-acting antivirals. *Liver Transplantation*. 2017;23:1103–1112.
84. Huang AC, Mehta N, Dodge JL, Yao FY, Terrault NA. Direct-acting antivirals do not increase the risk of hepatocellular carcinoma recurrence after local-regional therapy or liver transplant waitlist dropout. *Hepatology*. 2018;68:449–461.
85. Terrault NA, McCaughan GW, Curry MP, Gane E, Fagioli S, Fung JYY, et al. International Liver Transplantation Society Consensus Statement on Hepatitis C Management in Liver Transplant Candidates. *Transplantation*. 2017;101:945–955.
86. Reig M, Rimola J, Ferran T, Darnell A, Rodríguez-Lope C, Forner A, et al. Postprogression survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma: Rationale for second-line trial design. *Hepatology*. 2013;58:2023–2031.
87. Belli LS, Berenguer M, Cortesi PA, Strazzabosco M, Rockenschaub S-R, Martini S, et al. Delisting of liver transplant candidates with chronic hepatitis C after viral eradication: A European study. *Journal of hepatology*. 2016;65:524–531.
88. Lai Q, Vitale A, Halazun K, Iesari S, Viveiros A, Bhangui P, et al. Identification of an Upper Limit of Tumor Burden for Downstaging in Candidates with Hepatocellular Cancer Waiting for Liver Transplantation: A West–East Collaborative Effort. *Cancers*. 2020;12:452.
89. Durand F, Antoine C, Soubrane O. Liver Transplantation in France. *Liver Transplantation*. 2019;25:763–770.
90. Merani S, Pietro Majno, Kneteman NM, Berney T, Morel P, Mentha G, et al. The impact of waiting list alpha-fetoprotein changes on the outcome of liver transplant for hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*. 2011;55:814–819.
91. Hakeem AR, Young RS, Marangoni G, Lodge JPA, Prasad KR. Systematic review: the prognostic role of alpha-fetoprotein following liver transplant for hepatocellular carcinoma. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2012;35:987–999.
92. Kneteman N, Livraghi T, Madoff D, de Santibañez E, Kew M. Tools for monitoring patients with hepatocellular carcinoma on the waiting list and after liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2011;17:S117–S127.
93. Newson RB. Comparing the predictive powers of survival models using Harrell's C or Somers' D. *The Stata Journal*. 2010;10:339–358.

94. Wolbers M, Blanche P, Koller MT, Wittelman JCM, Gerds TA. Concordance for prognostic models with competing risks. *Biostatistics*. 2014;15:526–539.
95. Pencina MJ, D' Agostino RB, D' Agostino RB, Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: From area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Statist. Med.* 2007;27:157–172.
96. Leening MJG, Vedder MM, Wittelman JCM, Pencina MJ, Steyerberg EW. Net reclassification improvement: computation, interpretation, and controversies: a literature review and clinician's guide. *Ann. Intern. Med.* 2014;160:122–131.
97. Kerr KF, Wang Z, Janes H, McClelland RL, Psaty BM, Pepe MS. Net Reclassification Indices for Evaluating Risk Prediction Instruments. *Epidemiology*. 2014;25:114–121.
98. Zhu AX, Kang Y-K, Yen C-J, Finn RS, Shin DB, Galle PR, et al. Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased  $\alpha$ -fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncology*. 2019;20:282–296.
99. Piñero F, Chagas A, Boin I. Looking for the Best Model to Predict Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Liver Transplantation in Latin America. *Clinical Liver Disease*. 2019;13:46–50.
100. Piñero F, Carrihlo FJ, Silva MO. Predictive models for recurrence risk of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: Still an unmet need. *Liver International*. 2017;37:648–650.
101. Piñero F, Dirchwolf M, Pessoa MG. Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Assessment. *Cells*. 2020;9:1370.
102. Firl DJ, Kimura S, McVey J, Hashimoto K, Yeh H, Miller CM, et al. Reframing the approach to patients with hepatocellular carcinoma: Longitudinal assessment with hazard associated with liver transplantation for HCC (HALTHCC) improves ablate and wait strategy. *Hepatology*. 2018;68:1448–1458.
103. McCormack L, Gadano A, Lendoire J, Inventarza O, Andriani O, Gil O, et al. Model for end-stage liver disease-based allocation system for liver transplantation in Argentina: does it work outside the United States? *HPB*. 2010;12:456–464.
104. Salvalaggio PR, Felga G, Axelrod DA, Guardia Della B, Almeida MD, Rezende MB. List and Liver Transplant Survival According to Waiting Time in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *American Journal of Transplantation*. 2015;15:668–677.
105. Firl DJ, Sasaki K, Agopian VG, Gorgen A, Kimura S, Dumronggittigule W, et al. Charting the Path Forward for Risk Prediction in Liver Transplant for Hepatocellular Carcinoma: International Validation of HALTHCC Among

- 4,089 Patients. *Hepatology*. 2019;71:569–582.
106. Pomfret EA, Washburn K, Wald C, Nalesnik MA, Douglas D, Russo M, et al. Delayed hepatocellular carcinoma model for end-stage liver disease exception score improves disparity in access to liver transplant in the United States. *Journal of hepatology* [Internet]. 2015;59:1643–1650. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.12773>
107. Singh SK, Kaplan B, Joseph Kim S. Multivariable Regression Models in Clinical Transplant Research. *Transplantation*. 2015;99:2451–2457.
108. Geissler EK, Schnitzbauer AA, Zülke C, Lamby PE, Proneth A, Duvoux C, et al. Sirolimus Use in Liver Transplant Recipients With Hepatocellular Carcinoma: A Randomized, Multicenter, Open-Label Phase 3 Trial. *Transplantation*. 2017;100:116–125.