



Revision de conjunto

Utilidad de la biopsia preoperatoria en la selección de pacientes con hepatocarcinoma para el trasplante hepático

Emilio Ramos Rubio* y Laura Llado Garriga

Unidad de Trasplante Hepático, Servicio de Cirugía General y Digestiva, Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 22 de marzo de 2009

Aceptado el 17 de noviembre de 2009

On-line el 13 de enero de 2010

Palabras clave:

Hepatocarcinoma
Trasplante hepático
Biopsia hepática

Keywords:

Hepatocellular carcinoma
Liver transplantation
Liver biopsy

R E S U M E N

La selección de pacientes con hepatocarcinoma para el trasplante hepático es susceptible de mejorarse. Uno de los métodos propuestos para lograr este objetivo consiste en la incorporación al algoritmo decisorio de factores pronóstico de agresividad tumoral. Los procedimientos que permitirían valorar esta característica pueden agruparse en 3 categorías: a) biomarcadores séricos; b) respuesta a la quimioembolización, y c) datos de la histología tumoral. En este estudio de revisión se analizan los datos disponibles acerca de la utilidad de cada uno de estos tipos de marcadores, y se presta una especial atención a las evidencias relacionadas con la posible utilidad de una biopsia preoperatoria. Puede concluirse que la biopsia preoperatoria podría ser útil para indicar el trasplante hepático en pacientes con criterios expandidos, pero no en pacientes que cumplan los criterios de Milán. Este escenario podría cambiar en un futuro no muy lejano si se confirman los primeros datos del valor pronóstico de algunos parámetros de biología molecular.

© 2009 AEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Usefulness of pre-surgical biopsy in selecting patients with hepatocellular carcinoma for liver transplant

A B S T R A C T

The selection of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) for liver transplantation must be improved. One of the methods proposed to achieve this objective consists of including predictors of tumour aggressiveness to the decision making algorithm. The procedures that would enable this characteristic to be assessed, are: 1. Serum biomarkers, 2. Response to transarterial chemoembolisation and 3. Data on the tumour histology. In this review, the available data on the usefulness of each of these procedures are analysed. Special attention is given to the evidence associated with the possible usefulness of a preoperative biopsy. It can be concluded that a preoperative biopsy could be useful to indicate liver transplantation in patients with extended criteria, but not in patients that fulfil the Milan criteria. This scenario could soon change if the initial data on the prognostic value of some molecular markers of tumour progression are confirmed.

© 2009 AEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: eramos@bellvitgehospital.cat, emilioramos@buhardillabis.jazztel.es (E. Ramos Rubio).

La selección de los pacientes con hepatocarcinoma (HCC) para el trasplante hepático (TH) está basada en unos criterios morfológicos establecidos por Mazzaferro en 1996¹. Los resultados obtenidos con la aplicación de estos criterios son, sin duda, excelentes. Sin embargo, las limitaciones de las técnicas de imagen provocan que entre el 20 y el 30% de los casos la estadificación final del tumor supere los criterios aceptados. Son precisamente estas limitaciones de la estadificación preoperatoria las que han permitido poner de manifiesto la existencia de un grupo de pacientes en los que, a pesar de superarse criterios de Milán, el TH logra una excelente supervivencia.

Estas observaciones ponen en evidencia que la selección de pacientes con HCC para el TH puede mejorarse, y no solo a través de la mejoría en la precisión de las técnicas de imagen, sino fundamentalmente mediante la detección de factores pronóstico de la agresividad tumoral.

El objetivo de este estudio de revisión ha sido el análisis de las evidencias disponibles acerca de los diferentes procedimientos aplicados para la valoración de la agresividad tumoral. Estos procedimientos se pueden agrupar en las 3 categorías: a) biomarcadores séricos; b) respuesta a la quimioembolización (QE), asociada a un período de observación, y c) histología tumoral.

Biomarcadores séricos

El HCC se caracteriza por ser un tumor muy vascular con una gran propensión a la invasión venosa. Por lo tanto, es plausible la existencia de alguna relación entre el nivel del *vascular endothelial growth factor* (VEGF) y la agresividad del HCC. En un estudio prospectivo de Poon et al², se determinaron preoperatoriamente los niveles de VEGF y se correlacionaron con los datos clinicopatológicos de 100 pacientes consecutivos tratados mediante una hepatectomía curativa.

En el análisis estadístico se observa que al tomar como punto de corte el percentil 75 (500 pg/ml), un nivel elevado del esta molécula se asoció a un mayor riesgo de recidiva (el 48 frente al 27%) tras un seguimiento medio de 12 meses ($p=0,048$). La supervivencia libre de enfermedad fue inferior en el grupo con niveles elevados, pero las diferencias no fueron significativas. En cuanto a la invasión vascular microscópica, los pacientes con niveles de VEGF >500 pg/ml tuvieron una incidencia del 48 frente al 27%.

Posteriormente a la publicación de este trabajo es posible encontrar otros 300 artículos que estudian la relación entre los niveles de VEGF y el HCC. Sin embargo, no hay trabajos que estudien su utilidad como factor pronóstico en pacientes trasplantados.

La des-gamma-carboxy prothrombin es una forma anormal de protrombina, conocida desde hace años como marcador sérico del HCC. En un estudio de Shirabe et al³ del año 2007, unos niveles de más de 500 mAU/ml se asociaron a invasión vascular en el 54% de los casos, lo que no parece suficiente para tomar decisiones en función de este dato considerado de manera aislada.

La detección de células con expresión del ARNm de la alfafetoproteína en sangre periférica se ha estudiado como factor predictivo de recidiva. Intuitivamente, este dato parece

indicar un alto riesgo de diseminación hemática. En el análisis multivariante de un estudio de Marubashi et al⁴, con 32 pacientes trasplantados por HCC, resultaron factores pronósticos de recidiva la invasión vascular y la presencia de células con expresión del ARNm de la alfafetoproteína, mientras que el tamaño o el cumplimiento de los criterios de Milán no resultaron significativos. Además, entre los pacientes que superaban los criterios de Milán, el estudio del ARNm permitió distinguir 2 grupos de pacientes con pronósticos muy diferentes. Sin embargo, el número de pacientes con expresión del ARNm en sangre en el estudio preoperatorio fue de solo 3 casos y todos ellos con HCC que excedían los criterios de Milán. Por lo tanto, tampoco este parámetro parece ofrecer mucha utilidad en la práctica.

En resumen, no parece existir ninguna evidencia sólida que permita recomendar la inclusión habitual de un biomarcador sérico en el algoritmo de selección de pacientes con HCC para el TH.

Respuesta al tratamiento neoadyuvante y evolución en lista de espera

Algunos autores, como Otto et al⁵, han utilizado la respuesta al tratamiento neoadyuvante como método de selección. En esta experiencia, 96 pacientes con HCC, 62 de ellos con una estadificación que superaba los criterios de Milán, se trataron con QE repetidas. De estos, se pusieron en lista de trasplante solamente aquellos en los que se lograba un *downstaging*. Finalmente, se trasplantaron 50 pacientes (34 con criterios expandidos). Los pacientes en los que el tumor no progresó durante el tiempo en lista tuvieron una supervivencia del 94,5% a los 5 años del TH, mientras que aquellos casos que mostraron progresión después de una respuesta inicial presentaron una SLE del 35% a los 5 años.

En el estudio multivariante, el riesgo de recidiva resultó dependiente de la progresión tumoral en lista y del número de nódulos, mientras que el cumplimiento de los criterios de Milán no tuvo impacto en la recidiva.

Según estos datos, HCC grandes o multifocales podrían tratarse mediante TH si muestran buena respuesta a la QE y se mantienen estables con un tratamiento secuencial.

Datos de la histología tumoral

El tercer procedimiento utilizado para identificar factores pronóstico, y al que nos vamos a referir de manera más amplia, se basa en el estudio histológico preoperatorio mediante biopsia hepática. De la revisión de los estudios publicados puede concluirse que la invasión vascular es el factor pronóstico más relevante. Cuando la invasión vascular es macroscópica puede, en muchos casos, detectarse en las técnicas de imagen y se considera un criterio que contraindica el TH de manera absoluta. En cuanto a la invasión vascular microscópica, no puede detectarse preoperatoriamente.

El único dato de la histología convencional detectable en la biopsia y potencialmente relacionado con la agresividad tumoral es el grado de diferenciación. Por lo tanto, se ha tratado de confirmar si aisladamente o en combinación con

otras variables el grado de diferenciación permitiría predecir de manera precisa la existencia de invasión vascular microscópica. Si esto fuera posible, ¿se podría contraindicar el TH ante una posibilidad elevada de invasión vascular microscópica? Naturalmente, también cabe preguntarse si por sí mismo el grado de diferenciación puede ser útil en la selección de pacientes.

¿Es posible predecir la presencia de invasión vascular microscópica?

En el año 2001, Jonas et al⁶ publicaron un estudio retrospectivo realizado en 120 pacientes trasplantados por HCC sobre cirrosis. La invasión vascular microscópica se observó en 48 de los 120 pacientes y se asoció a una supervivencia significativamente inferior al resto de los enfermos y cercana al 50% a los 5 años. En el análisis multivariante resultaron significativos como factores predictivos de invasión vascular el grado histológico y el tamaño. Según los resultados de este trabajo, la invasión vascular microscópica podría considerarse una contraindicación para el TH, y la combinación de tamaño y grado de diferenciación podría ser útil para predecir su presencia. Los resultados de un estudio de Esnaola et al⁷ publicado al año siguiente son similares y confirman que el tamaño y la diferenciación son los factores pronóstico más relevantes de invasión vascular; por lo tanto, propone la realización de una biopsia para detectar preoperatoriamente el grado de diferenciación. Aisladamente, un tamaño superior a 4 cm o la presencia de un tumor mal diferenciado implicarían un riesgo del 50% de presentar invasión vascular microscópica. Al asociar el tamaño y el grado de diferenciación (tumores de más de 4 cm y mal diferenciados) es posible identificar un grupo de pacientes con un riesgo de invasión vascular del 61%.

Con éstas y otras muchas experiencias previas que confirman estos resultados, Shirabe et al⁸ elaboraron un score recientemente publicado. En una parte retrospectiva del estudio realizada en piezas de resección encuentran que el grado histológico, el tamaño y los niveles de des-gamma-carboxy prothrombin son factores predictivos más relevantes de invasión vascular microscópica. Con estos 3 datos elaboran un score y lo ponen a prueba de manera prospectiva en otro grupo de 32 pacientes trasplantados por HCC. Un score de 3 o más se asoció a la presencia de invasión vascular en el 89% de los casos, y uno menor de 3 se asoció solo en un 21%.

¿Contraindicaría el trasplante hepático un riesgo elevado de invasión vascular microscópica?

En una reciente publicación (2007) de Lohe et al⁹, en la que presentan los resultados de una serie de 97 TH, encuentran invasión vascular microscópica en 23 casos (24%). Su presencia se asoció a una supervivencia a los 5 años significativamente inferior al resto de los pacientes (el 7 versus el 52%). Sin embargo, en otras publicaciones los resultados en este grupo de enfermos, aunque son peores, justifican mantener la indicación de TH. En una serie de 155 casos publicada el mismo año por Shah et al¹⁰ y con una incidencia de invasión

vascular microscópica similar, la supervivencia a los 5 años en presencia de este dato histológico fue mayor del 60%.

Probablemente, una de las claves para interpretar esta diferencia en los resultados la encontramos en un trabajo recientemente publicado por el Metroticket Investigator Study Group¹¹. En este estudio se muestra claramente cómo la agresividad biológica del tumor, reflejada por la presencia de invasión vascular, influye en los resultados de supervivencia. Cuando esta no está presente podrían ampliarse los criterios de selección macromorfológicos al emplearse la regla del *up to seven*, que es la suma del tamaño mayor en centímetros y el número de nódulos. Por el contrario, cuando la invasión vascular está presente se debería ser más restrictivo en cuanto al número y tamaño de los nódulos. La presencia de invasión vascular se asocia a resultados de supervivencia inaceptables cuando el tumor de mayor tamaño supera los 5 cm de diámetro. Por debajo de este tamaño, los resultados siguen siendo razonablemente buenos. Por lo tanto, es plausible que en aquellas series en las que la media del tamaño tumoral sea baja, la influencia de la invasión vascular en la supervivencia sea menos clara.

¿Cuál fue el tamaño tumoral en las series de Lohe y Shah antes comentadas? En la primera, 54 tumores (56%) tenían más de 3 cm y 30 tumores (31%) tenían más de 5 cm. En la de Shah sólo 15 tumores (10%) tenían más de 5 cm y el tamaño medio fue de 2,6 cm. Por lo tanto, puede deducirse que los tumores de la serie de Lohe fueron de mayor tamaño, lo que implicaría peor pronóstico, por lo comentado anteriormente.

De alguna manera, son estos 3 factores (tamaño, invasión vascular y grado de diferenciación) los que utilizan Parfitt et al¹² en un estudio publicado en 2007, en el que se trata de predecir la recidiva post-TH a partir de los datos de la histología de la pieza de hepatectomía. En el análisis multivariante resultan factores pronóstico independientes de recidiva después del TH: la invasión vascular microscópica, el tamaño, la presencia de microsatélites y un aspecto directamente relacionado con la diferenciación celular, que es la presencia de células gigantes. Con estos datos crea un score y 3 grados de riesgo. Utilizando este score se confirma que aun en presencia de invasión vascular microscópica un tamaño tumoral <3 cm implica un bajo riesgo de recidiva (<5%).

Podría concluirse que la presencia de invasión vascular no representaría una contraindicación para el TH, siempre que el paciente se encuentre dentro de los criterios de Milán. Sin embargo, sí lo sería en caso de que se superen los criterios de Milán. Una biopsia preoperatoria podría contribuir a valorar con bastante precisión el riesgo de invasión vascular microscópica.

¿Qué datos hay acerca del valor del grado de diferenciación como factor pronóstico independiente?

Klintmalm¹³, en 1998, publicó un análisis de los datos del International Registry of Hepatic Tumors in Liver Transplantation que incluía a 422 pacientes.

En los resultados se aprecia que los pacientes con tumores con un grado de diferenciación 3 y especialmente 4 presentaban una supervivencia claramente inferior a la de pacientes

con un grado 1 o 2. En el estudio univariante, los factores que influyeron en la supervivencia fueron el tamaño tumoral >5 cm, la invasión vascular, la presencia de ganglios + y el grado histológico. En el análisis multivariante, los autores demuestran que solo el grado histológico tiene un impacto negativo en la supervivencia. Resulta especialmente llamativo que en el grupo de pacientes con tumores bien diferenciados, el tamaño y la invasión vascular no demostraron tener influencia en la supervivencia. Los autores concluyen que el TH puede estar contraindicado en pacientes con tumores mal diferenciados y una biopsia sería necesaria para tomar una decisión en este sentido.

La experiencia de Tamura et al¹⁴, publicada en 2001, incluye solamente 53 casos, pero todos ellos del mismo centro y valorados por un único patólogo. En el análisis multivariante para el riesgo de recidiva solo resultaron significativas las variables grado de diferenciación y el tamaño tumoral, mientras que la invasión vascular perdió la significación estadística. La supervivencia a 3 años en el grupo de pacientes con tumores bien diferenciados mayores de 5 cm fue del 62,5%, mientras que la supervivencia de los pacientes con tumores poco diferenciados fue del 0%. Por el contrario, en pacientes con tumores menores de 5 cm no se apreciaron diferencias significativas en función del grado histológico. De nuevo, de estos resultados podría deducirse que el tamaño tumoral modula el efecto de variables histológicas. En caso de tumores de menos de 5 cm la biopsia no parece necesaria, mientras que en el caso de tumores grandes sí podría estar indicada la realización de una biopsia preoperatoria para determinar la diferenciación histológica.

En 2004, Cillo et al¹⁵ publicaron la experiencia de la Universidad de Padua con el TH de pacientes con HCC. En el estudio preoperatorio se realizaba sistemáticamente una PAAF que permitía establecer el grado de diferenciación en una escala de 1 a 3. Entre los criterios de exclusión del TH se incluía un grado 3 de diferenciación. Finalmente, se transplantó a 33 pacientes. El 38% de los casos no cumplía los criterios de Milán en la pieza quirúrgica. En este estudio se aprecia que con grados 1 y 2 la invasión vascular fue del 4%. En el seguimiento (media de 44 meses) solo recidivaron 2 casos, todos ellos durante el primer año, y los 2 cumplían los criterios de Milán antes del TH. Se concluye que el grado de diferenciación es un marcador de agresividad biológica independiente de la invasión vascular.

Existen, pues, numerosas evidencias de la posible utilidad del grado histológico como factor predictivo de la evolución. Sin embargo, a pesar de éstos y otros datos no hay trabajos que estudien el tema de forma prospectiva. Esto está, en parte, relacionado con las posibles complicaciones de la biopsia que, además del riesgo de hemorragia, incluyen la posibilidad de diseminación tumoral y la falta de representatividad.

La posibilidad de que la biopsia o una PAAF de un nódulo tumoral produzcan una implantación de células tumorales en trayecto de punción, se ha estudiado ampliamente en la literatura médica. De la revisión de los artículos publicados sobre el tema puede concluirse que esta implantación se produce en el 0-2% de los casos, dependiendo del calibre de la aguja y de la técnica¹⁶. Cuando se asocia un tratamiento percutáneo como la radiofrecuencia es menos frecuente

(0,6%), y es prácticamente nula cuando se emplea la denominada técnica coaxial¹⁷. También hay evidencias aisladas de una mayor frecuencia de recidiva tumoral después del TH cuando se ha realizado biopsia del tumor¹⁸.

En segundo lugar, no está clara la representatividad de la biopsia con respecto al informe anatomopatológico definitivo. En una publicación de Pawlik en 2007¹⁹ se realiza un estudio retrospectivo en 93 pacientes de los que se disponía de biopsia preoperatoria y espécimen de resección. De los 93 casos, hubo una concordancia completa del grado de diferenciación (G1, G2 y G3) entre los informes preoperatorios y postoperatorios en solo 42 casos (45%) ($K=0,18$; $p<0,0001$). Se repitió el estudio agrupando G1 y G2; tras esto, la concordancia mejoró al 76%, aunque el estadístico K continuó siendo significativo. La conclusión fue que el grado de diferenciación obtenido preoperatoriamente no tiene significación frente a los parámetros macromorfológicos habituales y, por lo tanto, estos deben seguir siendo los determinantes mayores para la selección de pacientes.

Uno de los motivos para explicar esta aparente baja capacidad predictiva de la biopsia preoperatoria es la heterogeneidad de los HCC, que aumenta a medida que aumenta su tamaño.

Teniendo en cuenta las limitaciones de los parámetros histológicos en los últimos años, se ha investigado el valor pronóstico de diversos marcadores de la biología molecular del HCC.

¿Qué pueden ofrecer los nuevos conocimientos sobre la biología molecular del hepatocarcinoma?

La metodología de estudio del valor pronóstico de la expresión génica en relación con el HCC es similar a la utilizada para los datos histológicos. Se trata de estudios retrospectivos en los que empleando generalmente muestras incluidas en parafina, se trata de establecer el valor pronóstico de diversos marcadores moleculares del HCC.

Este es el caso del artículo publicado en 2007 por Chua et al²⁰ en relación con el gen *NDRG1*. La proteína de este gen participa en procesos de regulación del crecimiento celular y la diferenciación. En los resultados se demuestra que la sobreexpresión de este gen se asocia a peor pronóstico de supervivencia (<20% a los 5 años), y en el análisis multivariante resultó una variable pronóstica significativa independiente. Desgraciadamente, en este estudio no se proporciona información de los tratamientos aplicados ni de la causa de muerte, y además, incluye 28 casos con tumores de más de 8 cm de diámetro. Por lo tanto, como en otros muchos casos, no tiene una aplicabilidad clínica en el contexto de la selección de pacientes para el TH.

Dada la gran heterogeneidad existente en los procesos de hepatocarcinogénesis, parecen ofrecer más posibilidades de facilitar la obtención de un pronóstico fiable el establecimiento de una clasificación molecular o el estudio conjunto de la expresión de varios genes. Además, sería deseable que los estudios se llevaran a cabo en cohortes bien seleccionadas de pacientes susceptibles de tratamientos radicales y se estableciera claramente la muerte de causa tumoral como *end-point* del estudio.

En el artículo de Iizuka et al²¹ se desarrolla un score basado en la expresión de un grupo de 12 genes sobre una muestra de 33 pacientes en los que se había realizado una resección curativa de un HCC. Posteriormente, comprueban su capacidad para predecir una recidiva durante el primer año en otro grupo de 27 pacientes. La predicción fue correcta en 25 de los 27 casos. El VPP fue del 88% y el VPN fue del 95%, mientras que la presencia de invasión venosa solo tuvo un VPP del 64%. Sin embargo, sabemos que el TH permite un mejor VPP control de la enfermedad tumoral que la resección para el mismo estadio tumoral y, por lo tanto, es necesario disponer de variables pronósticas confirmadas en pacientes trasplantados. En un estudio de nuestro grupo²², empleando una técnica de inmunohistoquímica de uso común para detectar el grado de expresión del gen *pRb*, encontramos que en los pacientes trasplantados por HCC la positividad elevada del *pRb*, se asoció a una recidiva del 100% después de 6 años.

Muy recientemente se ha publicado un estudio de la Universidad de Pisttsburg y el Hospital del Mount Sinai²³ en el que se propone el estudio de la fracción de imbalance alélico (FIA) como parámetro pronóstico en pacientes con HCC y posible factor de selección para el TH. La FIA es un índice definido como la ratio entre el número de marcadores mutados de entre los marcadores informativos posibles. La FIA representaría una valoración grosera del daño mutacional acumulado. En este trabajo de Dvorchik et al se emplean 9 posibles marcadores seleccionados entre un panel de 18 genes supresores.

En el análisis multivariante de supervivencia libre de enfermedad, la FIA fue el factor pronóstico más significativo, de manera que una FIA >40% implicó un aumento del riesgo de recidiva de 19,5 veces comparado con una FIA <20%, mientras que la presencia de invasión macrovascular sólo la aumentó en 5,9 veces con respecto a la ausencia. Además, en los pacientes con FIA <20%, la invasión vascular perdió su valor pronóstico.

Conclusiones

El posible papel de la biopsia en la selección de pacientes con HCC para el TH no está aún definido. De momento, no puede recomendarse la biopsia preoperatoria de rutina para determinar el grado de diferenciación o valorar el riesgo de invasión vascular en pacientes con HCC que cumplan los criterios de Milán. Algunas evidencias indican que los pacientes con criterios expandidos pero con tumores bien diferenciados podrían beneficiarse del TH. Una biopsia permitiría teóricamente identificar a estos pacientes, si bien no está clara la fiabilidad de ésta. Es probable que en un futuro cada vez más próximo, los estudios de la biología molecular del HCC ofrezcan nuevos marcadores más precisos, cuya determinación hará necesaria la biopsia preoperatoria. Será necesario esperar los resultados de los estudios, probablemente ya iniciados, de los centros con capacidad para realizar la necesariamente compleja investigación traslacional.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996;334:693-9.
- Poon RT, Ng IO, Lau C, Zhu LX, Yu W, CmLo CM, et al. Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Ann Surg.* 2001;233:227-35.
- Shirabe K, Itoh S, Yoshizumi T, Soejima Y, Taketomi A, Aishima S, et al. The predictors of microvascular invasion in candidates for liver transplantation with hepatocellular carcinoma-with special reference to the serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin. *J Surg Oncol.* 2007;95:235-40.
- Marubashi S, Dono K, Nagano H, Sugita Y, Asaoka T, Hama N, et al. Detection of AFP mRNA-expressing cells in the peripheral blood for prediction of HCC recurrence after living donor liver transplantation. *Transpl Int.* 2007;20:576-82.
- Otto G, Herber S, Heise M, Lohse AW, Monch C, Bittinger F, et al. Response to transarterial chemoembolization as a biological selection criterion for liver transplantation in hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2006;12:1260-7.
- Jonas S, Bechstein WO, Steinmüller T, Herrmann M, Radke C, Berg T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology.* 2001;33:1080-6.
- Esnaola NF, Lauwers GY, Mirza NQ, Nagorney DM, Doherty D, Ikai I, et al. Predictors of microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma who are candidates for orthotopic liver transplantation. *J Gastrointest Surg.* 2002;6:224-32.
- Lohe F, Angele MK, Rentsch M, Graeb C, Gerbes A, Lohrs U, et al. Multifocal manifestation does not affect vascular invasion of hepatocellular carcinoma: Implications for patient selection in liver transplantation. *Clin Transplant.* 2007;21:696-701.
- Shah SA, Tan JC, McGilvray ID, Cattral MS, Levy GA, Greig PD, et al. Does microvascular invasion affect outcomes after liver transplantation for HCC? A histopathological analysis of 155 consecutive explants. *J Gastrointest Surg.* 2007;11:464-71.
- Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: A retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol.* 2009;10:35-43.
- Parfitt JR, Marotta P, Alghamdi 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 Transpl.* 2007;13:543-51.
- Klintmalm GB. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: A registry report of the impact of tumor characteristics on outcome. *Ann Surg.* 1998;228:479-90.
- Tamura S, Kato T, Berho M, Misiakos EP, O'Brien C, Reddy KR, et al. Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation. *Arch Surg.* 2001;136:25-30.
- Cillo U, Vitale A, Bassanello M, Boccagni P, Brolese A, Zanusi G, et al. Liver transplantation for the treatment of moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2004;239:150-9.
- Stigliano R, Marelli L, Yu D, Davies N, Patch D, Burroughs AK. Seeding following percutaneous diagnostic and therapeutic approaches for hepatocellular carcinoma. What is the risk and the outcome? Seeding risk for percutaneous approach of HCC. *Cancer Treat Rev.* 2007;33:437-47.
- Maturen KE, Nghiem HV, Marrero JA, Hunsain HK, Higgins EG, Fox GA, et al. Lack of tumor seeding of hepatocellular carcinoma after percutaneous needle biopsy using coaxial cutting needle technique. *Am J Roentgenol.* 2006;187:1184-7.

17. Saborido BP, Díaz JC, de Los Galanes SJ, Seguro CL, de Usera MA, Garrido MD, et al. Does preoperative fine needle aspiration-biopsy produce tumor recurrence in patients following liver transplantation for hepatocellular carcinoma? *Transplant Proc.* 2005;37:3874-7.
18. Pawlik TM, Gleisner AL, Anders RA, Assumpção L, Maley W, Choti MA, et al. Preoperative assessment of hepatocellular carcinoma tumor grade using needle biopsy: Implications for transplant eligibility. *An Surg.* 2007;245:435-42.
19. Chua MS, Sun H, Cheung ST, Mason V, Higgins J, Ross DT, et al. Overexpression of NDRG1 is an indicator of poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol.* 2007;20:76-83.
20. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Nishida M, Maeda Y, Mori N, et al. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet.* 2003;361:923-9.
21. Ramos E, Llado L, Serrano T, Figueras A, Lastra R, Torras J, et al. Utility of cell-cycle modulators to predict vascular invasion and recurrence after surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Transplantation.* 2006;82:753-8.
22. Dvorchik I, Schwartz M, Fiel MI, Finkelstein SD, Marsh JW. Fractional allelic imbalance could allow for the development of an equitable transplant selection policy for patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2008;14:443-5.