



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO  
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA  
DIMIS

*DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA DELLE  
MALATTIE DEL FEGATO-XXII CICLO  
MED 09*

PROGETTO DI RICERCA

***“Fattori di rischio influenzanti la sopravvivenza  
dei pazienti con epatocarcinoma su cirrosi  
sottoposti a diversi tipi di trattamento”***

***Il Coordinatore  
Prof. Giuseppe Montalto***

***Dottorando:  
Dott Salvatore Messina***

***Tutor  
Dott. M. Soresi***

## INDICE

Introduzione pag	3
Epatocarcinogenesi pag	4
Patogenesi molecolare pag	5
Aspetti istologici pag	14
Modifiche vascolari pag	19
Aspetti molecolari della neoangiogenesi pag	21
Aspetti diagnostici pag	23
Criteri diagnostici e linee guida internazionali pag	27
Parte sperimentale pag	73
Bibliografia pag	95

## INTRODUZIONE

Il carcinoma epatocellulare (hepatocellular carcinoma HCC), è la neoplasia di gran lunga più frequente tra i tumori primitivi del fegato, rappresenta a livello mondiale, una delle principali cause di morte per tumore.

Più del 70% degli oltre 350.000 nuovi casi per anno nel mondo sono diagnosticati nei Paesi in via di sviluppo, nei Paesi del Sud-Est Asiatico, del Pacifico Occidentale, del Sahara e dell’Africa meridionale (Parkin et al., GUT 2003).

Per quanto riguarda i Paesi Occidentali, in Europa, i tumori maligni del fegato sono più rari (Levi et al., Cancer 2004) mentre negli ultimi anni si è assistito ad un incremento della loro incidenza negli Stati Uniti (El-Serag HB., Hepatol Res 2007). L’Italia occupa una posizione intermedia per tassi di incidenza e mortalità e l’HCC rappresenta la settima causa di morte per tumore, con circa 5.000 decessi, ossia circa il 3% delle morti per tumore.

L'HCC è una neoplasia a prognosi assai severa, infatti molto spesso ha uno sviluppo multifocale, si presenta con caratteristiche di elevata farmacoresistenza, insorge su pazienti con severe turbe emocoagulative, condizioni che spesso limitano la possibilità di un intervento chirurgico risolutivo.

Negli ultimi anni però, l'introduzione di tecniche ablativistiche quali: l'alcolizzazione percutanea (PEI), la termoablazione con radiofrequenze (RFTA), la chemioembolizzazione (TACE), criteri più selettivi per il trapianto di fegato, hanno permesso una migliore aspettativa di vita per questi pazienti.

E' chiaro che però per ottimizzare l'applicabilità di queste tecniche e quindi sperare in una maggiore risposta alla terapia l'unica arma ad oggi disponibile è la diagnosi precoce. Per questo motivo le linee guida delle principali associazioni per lo studio delle malattie del fegato sia nazionali che internazionali (AISF, EASL) hanno consigliato l'attivazione di programmi di screening semestrale consistenti nell'esecuzione di ecografia epatica in associazione col dosaggio ematico dell'alfafetoproteina (AFP).

L'HCC è infatti una neoplasia che sembra rispondere ai principali criteri di tipo costo/beneficio per essere sottoposto ad un programma di screening: esiste infatti una popolazione a rischio (soggetti cirrotici); le metodiche diagnostiche da impiegare (ecografia ed alfa-fetoproteina) sono non invasive e a basso costo; i trattamenti curativi già menzionati possono permettere un'eccellente sopravvivenza ed una buona qualità di vita (Bolondi, J Hepatol 2003).

Malgrado ciò studi effettuati negli ultimi anni sui programmi di screening e sul loro rapporto costo/beneficio non hanno dato risultati univoci, tuttavia, dopo i primi scetticismi, gli ultimi lavori sembrano dimostrare un'utilità dello screening. (Solmi L, Am J Gastroenterol 1996; Trevisani F. Am J Gastroenterol 2002; Gebo, Hepatol 2002).

Ciò probabilmente è dovuto ad un miglioramento delle tecniche terapeutiche. E' anche vero che, probabilmente, la causa di questi dubbi risiede nel fatto che non si sia mai potuto fare uno studio rigidamente controllato tra pazienti sottoposti o non sottoposti a screening ed al fatto che non esista ad oggi un marker sierologico ideale, vista la scarsa sensibilità dell'alfa-fetoproteina.

Il quesito allora per migliorare il rapporto costo/beneficio non è se fare o no lo screening, ma piuttosto l'obiettivo principale della ricerca biomolecolare, clinica, di imaging, in campo epatologico attualmente è quello di individuare dei criteri che possano fare selezionare i soggetti a maggior rischio di trasformazione neoplastica all'interno della popolazione dei cirrotici.

### *PATOGENESI MOLECOLARE*

L'osservazione che solo una minoranza dei soggetti affetti da cirrosi vada incontro a trasformazione maligna suggerisce che ci sia un intervento di fattori co-oncogeni nel processo multistep della trasformazione *in vivo*.

Lo sviluppo e la progressione di un tumore sono infatti considerati degli eventi in cui i sistemi di controllo della crescita cellulare e/o della morte

programmata (apoptosi) vengono progressivamente perturbati. Mutazioni a carico di geni, alterazioni della loro trascrizione e traduzione e di conseguenza dei loro prodotti proteici, potrebbero potenzialmente servire come bio-marker della patologia (Wulfschlegel J.D., Cancer 2003).

Pertanto una migliore conoscenza dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi dell'HCC, ed in special modo le modifiche genetico-molecolari comuni ai diversi pathway implicati nella carcinogenesi epatica, avranno un ruolo fondamentale nella comprensione di come si sviluppa un HCC e probabilmente di come lo si potrà curare (Edamoto, Y., et al. Cancer 2003).

L'assenza di una predisposizione ereditaria evidente per lo sviluppo di HCC, quale quella che è stata evidenziata per alcuni tumori (ad esempio carcinomi del colon-retto, della mammella e dell'ovaio), ha reso difficoltosa l'identificazione di geni chiave per lo sviluppo dell'HCC. Il notevole progresso delle conoscenze e degli strumenti tecnologici nel campo della genetica molecolare ha portato negli ultimi anni ad un notevole aumento delle informazioni disponibili circa le alterazioni genetiche presenti nell'HCC.

#### *Loss of Heterozygosity (LOH)*

Gli studi di biologia molecolare, di analisi dei "microsatelliti" (ripetizioni di piccole sequenze polimorfiche – cioè possibilmente variabili da individuo ad individuo – di 2-6 nucleotidi sparse in tutto il genoma) mediante MSA (*PCR-based Microsatellite Marker Analysis*) e di citogenetica molecolare (CGH, *Comparative Genomic Hybridization*),

hanno messo in evidenza un'ampia varietà di alterazioni cromosomiche, che vanno dai riarrangiamenti genomici legati all'integrazione dell'HBV-DNA, alla perdita di eterozigosi (perdita di un allele – LOH) in numerosi loci su un ampio numero di cromosomi, ad amplificazioni geniche (aumento del numero di alleli) (Buendia MA, Med Pediatr Oncol 2002; Feitelson et al., Oncogene 2002). Le alterazioni cromosomiche nell'HCC comprendono perdite alleliche (LOH) a carico dei cromosomi 1p, 4q, 8p, 13q, 16q, 17p ed amplificazioni o aumenti del contenuto di DNA nelle regioni 1q, 8q e 17q. Una LOH in 1p è più frequente negli HCC di piccole dimensioni e ben differenziati mentre le LOH in 16p e 17q sono più frequenti in tumori avanzati e metastatici.

L'amplificazione della regione distale a 8q24 è in relazione alla sovraespressione del proto-oncogene c-myc.

Numerosi geni oncosoppressori risultano inattivati da mutazioni o delezioni (p53, pRb, p16/INK4A, M6P/IGF2R, axina, E-caderina, BRCA2, PTEN/MAC) mentre è descritta l'attivazione oncogenica di  $\beta$ -catenina, ciclina D e ciclina A.

### p53, p73, p63

Le mutazioni a carico di p53, evento tardivo nel processo a tappe multiple dello sviluppo dell'HCC, sono più frequenti in tumori di dimensioni più grandi, ad alto "grading" o poco differenziati, con prognosi peggiore e con un intervallo libero da tumore minore. Recentemente sono state identificate una serie di proteine p53 correlate, denominate p73 e p63 (Levrero et al., J

Cell Sci 2000). Nell'HCC non vi sono mutazioni di p73 e diverse osservazioni indicano vi sia una prevalenza dell'espressione di isoforme p73 dominanti negative (DN-p73 e DTA-p73) (anti-apoptotiche e pro-proliferative) capaci di bloccare le funzioni della p53 *wt* (Stiewe et al., Clin Cancer Res. 2004).

### pRB

L'oncosoppressore pRb (proteina del retinoblastoma, p105) e le molecole che ne regolano la funzione (in particolare p16/INKA) sono inattivati in almeno il 50% degli HCC (Feitelson et al., Oncogene 2002). Le funzioni di pRb vengono inattivate nell'HCC con meccanismi molteplici, legati sia ad alterazioni genetiche che ad alterazioni epigenetiche dell'espressione dei suoi diversi modulatori.

### $\beta$ -Catenina

Un evento frequente nell'HCC è la riattivazione inappropriata del *pathway* di segnalazione Wnt in seguito ad alterazioni a carico dell'oncogene  $\beta$ -catenina o degli oncosoppressori axina ed E-caderina, il cui risultato finale è l'accumulo nucleare di  $\beta$ -catenina con proliferazione non controllata (Buendia MA, Med Pediatr Oncol 2002). La  $\beta$ -catenina è una proteina multifunzionale che interviene sia nell'adesione cellula-cellula, stabilizzando il legame delle caderine e dell' $\alpha$ -catenina all'actina del citoscheletro, che nella trasduzione del segnale della via Wingless/Wnt durante lo sviluppo embrionale. In assenza di segnalazione da parte di Wnt,  $\beta$ -catenina è fosforilata in specifici residui di serina e treonina N-terminali



dal complesso multiproteico contenente l'axina, la chinasi (GSK)-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) e la proteina APC (*adenomatous polyposis coli*) con conseguente degradazione. L'attivazione della segnalazione attraverso i recettori Wnt inibisce l'attività della GSK-3 $\beta$  ed induce la stabilizzazione della  $\beta$ -catenina che trasloca nel nucleo dove si associa con i fattori trascrizionali Tcf/LEF, attivando l'espressione di specifici geni bersaglio, tra i quali c-myc, ciclina D1, fibronectina ed alcune metalloproteinasi.  $\beta$ -catenina presenta nel 18-41% degli HCC mutazioni o microdelezioni nella cosiddetta "*destruction box*" (regione bersaglio di GSK3- $\beta$ ) che la rendono non fosforilabile o ubiquitinabile e quindi insensibile alla *down-regulation*. Il mancato riscontro di accumulo nucleare di  $\beta$ -catenina o di sue mutazioni nel tessuto peritumorale, nelle lesioni pre-neoplastiche, negli epatociti displastici e nei noduli cirrotici tendono a indicare che la riattivazione della  $\beta$ -catenina è direttamente legata all'acquisizione del fenotipo trasformato.

Mutazioni a carico dell'axina sono state riscontrate negli HCC con accumulo nucleare di  $\beta$ -catenina in assenza di mutazioni nella  $\beta$ -catenina stessa.

L'E-caderina è un recettore transmembrana Ca-dipendente coinvolto nell'adesione cellula-cellula a livello delle giunzioni-aderenti. La perdita di espressione di E-caderina, dovuta principalmente alla ipermetilazione del promotore, è anch'essa frequente negli HCC soprattutto se HBV-correlati e ha come conseguenza la liberazione della  $\beta$ -catenina dalla sua

localizzazione sotto-membranaria ed il suo accumulo citoplasmatico e nucleare.

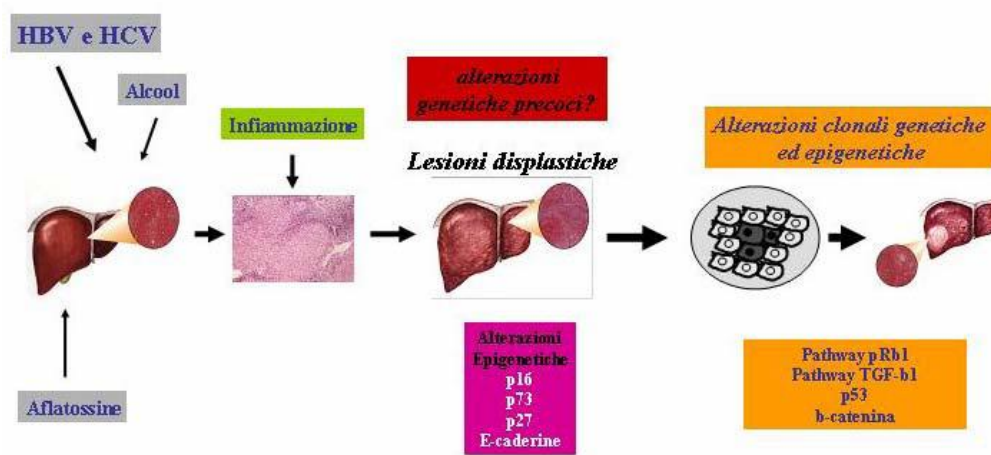


Figura 1: da *“Basi scientifiche per la definizione di linee-guida in ambito clinico per l’epatocarcinoma, commissione AISF, 2005*  
L’analisi globale delle alterazioni genetiche descritte nell’HCC ha dimostrato che almeno quattro diverse vie (p53/p73 e arresto di crescita/apoptosi in risposta al danno del DNA; pRb e controllo del ciclo cellulare; TGF- $\beta$  e inibizione della crescita/apoptosi cellulare;  $\beta$ catenina e controllo della crescita e delle interazioni cellula-cellula) nella regolazione della crescita e della morte cellulare sono preferenzialmente alterate (figura 4). Nonostante gli sforzi effettuati, non è stato tuttavia ancora possibile identificare con certezza alterazioni genetiche specifiche dei diversi stadi evolutivi del processo di trasformazione epatocitaria e, in particolare, le lesioni associate agli stadi preneoplastici e precoci. LOH in 1p (1p36-p34) e a carico del locus M6F/IGF2R e l’accorciamento dei telomeri sembrano essere eventi precoci che si accompagnano all’espressione di alcuni geni (SP70, Glypican 3) o set di geni (Paradis et al., Am J Pathol 2003; Smith MW et al., Cancer Res 2003).

Nessuna delle alterazioni descritte è presente in una percentuale di casi che supera il 50-60%, a dimostrazione della sostanziale eterogeneità genetica degli HCC a sua volta legata, verosimilmente, alla eterogeneità di fattori eziologici implicati.

Una serie di studi suggerisce che le vie coinvolte nello sviluppo dell'HCC possano essere diverse a seconda dei fattori di rischio. I casi HBV correlati, che si presentano più spesso con un fenotipo poco differenziato e con un pattern di crescita cellulare accelerato, si associano ad una maggiore instabilità cromosomica. I casi correlati all'infezione HCV sembrano presentare più spesso alterazioni della via beta-catenina associate a lesioni genetiche ed epigenetiche pleiomorfe (Laurent-Puig et al., *Gastroenterol* 2001; Bruix et al., *Hepatol* 2003). Lo studio dei profili globali di espressione mediante *microarrays* ha portato alla identificazione di numerosi nuovi geni modulati nell'HCC ed in particolare geni la cui espressione correla con la progressione tumorale (p16, SOCS1, PEG10), la disseminazione tumorale e la formazione di metastasi (nm23-H1, osteopontina, RhoC, KAI1, MMP14), la recidiva dopo trattamento radicale (REL, A20, vimentina, PDGFRA), senza però consentire l'identificazione univoca di "marcatori" utilizzabili per il momento nella pratica clinica (Kim et al., 2003).

Le ultime tendenze della ricerca bio-molecolare in campo epatologico sono orientate quindi verso l'identificazione di marcatori molecolari precoci di degenerazione neoplastica che possano da un lato portare ad una diagnosi certa di quei tumori ("early" o "small cancer") che hanno la migliore

prognosi con i trattamenti attualmente disponibili, e dall'altro presentare una "marcatura molecolare" (o "molecular signature") identificativa di un'eventuale capacità di risposta del singolo tumore alle nuove terapie molecolari ("target therapy").

In questa direzione uno studio recentemente pubblicato su *Hepatology* ed effettuato utilizzando la tecnologia dei *microarrays* e della successiva validazione dei risultati mediante real-time PCR, ha cercato di caratterizzare gli eventi molecolari alla base del processo carcinogenetico identificando nuovi bio-marker per l'early HCC (fig5). Più in dettaglio il profilo di espressione genetica di 75 campioni tissutali è stato analizzato a partire da lesioni considerate pre-neoplastiche (cirrosi e noduli displastici) fino all'HCC (che includeva una gamma variabile di stadi, da noduli "very early" fino a tumori metastatici), tutti in soggetti con infezione cronica da HCV. Gli autori sostengono di avere identificato una "marcatura genetica" che riflette accuratamente la progressione della malattia in tutti gli stadi principali. In particolare 8 geni permetterebbero la distinzione tra il tessuto sano e la cirrosi, 24 tra la cirrosi e la displasia, 93 tra la displasia e l'early HCC, e 9 tra l'early HCC e l'HCC avanzato.

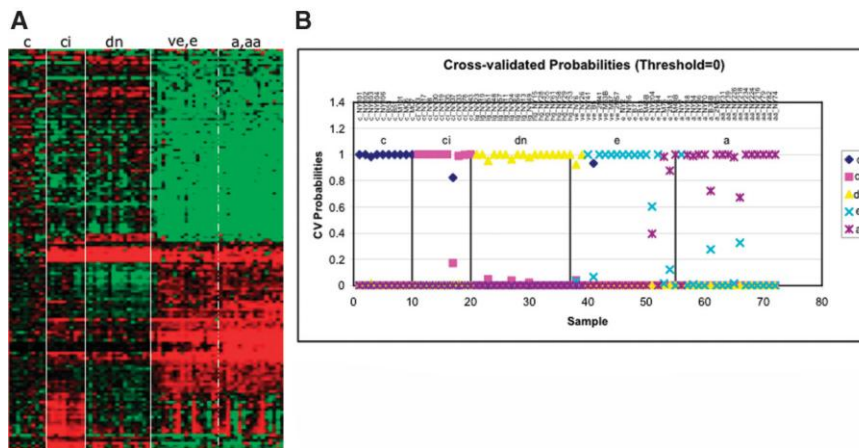


Figura 2: *Marcatori molecolari di HCC HCV correlato. (A) mappa della “gene signature”, identificata da SAM e PAM <sup>(1)</sup>. I 72 campioni sono rappresentati nelle colonne (c, controlli; ci, cirrosi; dn, displasia; ve/e, early HCC; a/aa HCC avanzato) ed il pattern di espressione (rosso, up-regolato; verde, down-regolato; nero, nessuna modifica) dei geni è espresso nelle righe. (B) Analisi PAM che utilizza i geni espressi in (A) per calcolare la probabilità che ha ciascun campione di essere assegnato ad uno dei cinque stadi di HCC-HCV correlato come previsto dalla “gene signature” di ciascun campione (c, controlli; ci, cirrosi; dn, displasia; e, early HCC; a HCC avanzato). L’asse delle ascisse rappresenta i campioni come indicato nella parte alta della figura. L’asse delle ordinate rappresenta la probabilità stimata, la somma deve essere 1 per ciascun campione.*

<sup>(1)</sup> SAM, evidenzia i geni significativamente di sregolati nei due gruppi; PAM identifica un subset di geni che meglio caratterizzano ciascun gruppo sulla base del “nearest shrunken centroids”( più sono diversi i gruppi, meno geni sono necessari per distinguerli)

Successivamente utilizzando la metodica della quantitative real-time RT-PCR, gli autori hanno validato gli svariati markers molecolari emersi dall’analisi di *microarrays* per la diagnosi precoce di early HCC ed in particolare l’espressione della proteina “spindle-like, microcephaly-associated”, il recettore “hyaluronan-mediated motility”, primase-1, erythropoietin e neuregulin 1, etc. (Wurmbach E et al., Hepatol 2007).

## EPATOCARCINOGENESI

### ASPETTI ISTOLOGICI

Diversi fattori genetici, ambientali, virali, possono contribuire all'evoluzione della cirrosi in neoplasia. Da molti anni è noto che tale evento avviene in multiple steps con il passaggio dal nodulo cirrotico all'HCC come evidenziato in Figura 1 (Hepatol 1995)

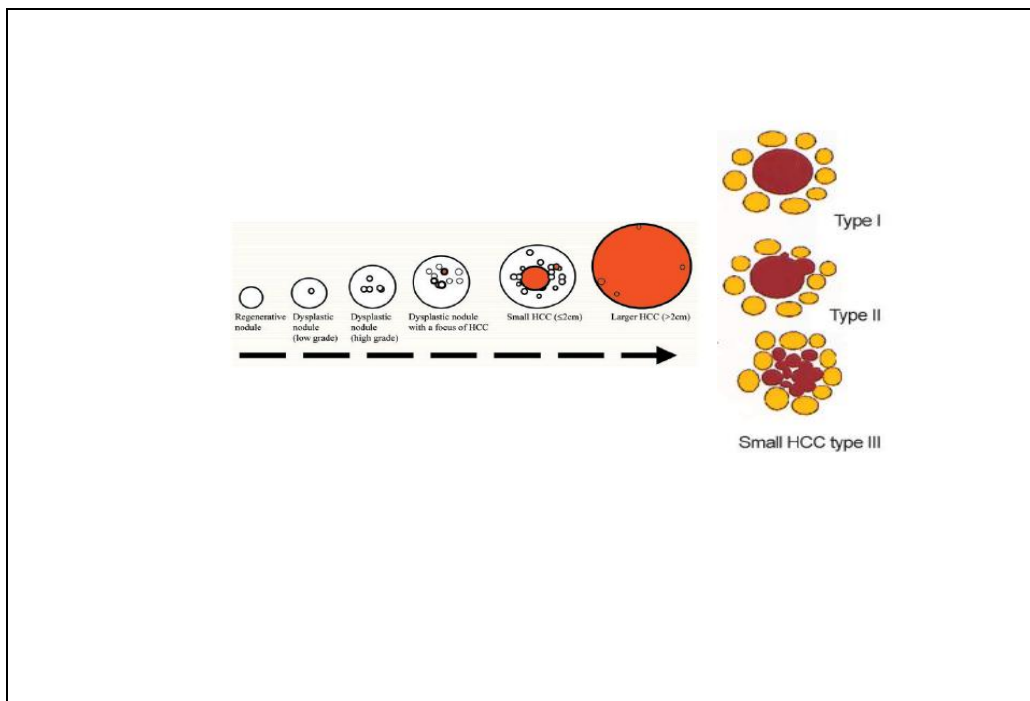


Figura 3: *Stepwise pathway della carcinogenesi. I °corrispondono a segni di atipica ed alla progressiva evoluzione del nodulo rigenerativo in displastico*

Tale evento probabilmente trova parte delle sue basi patogenetiche nel meccanismo del wound healing cioè quel processo che rappresenta il tentativo di riparazione e restituito ad integrum di un tessuto danneggiato (Figura 4A).

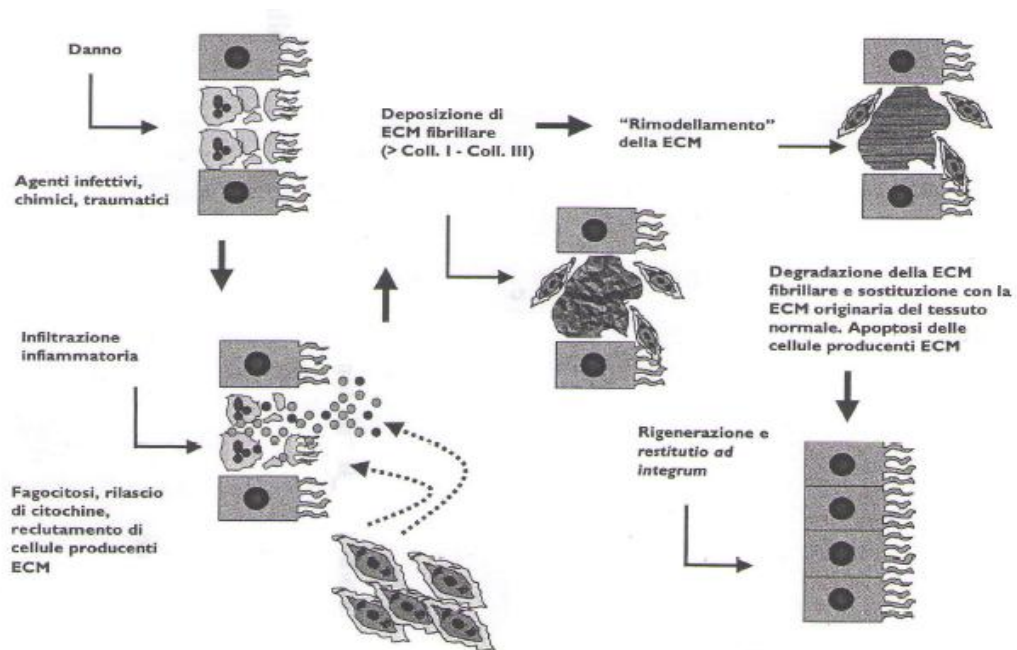


Figura 4A: *Danno tissutale, riparazione e rigenerazione*

Quando la noxa patogena non viene o non può essere rimossa, la flogosi diventa cronica e la restitutio ad integrum non è possibile, con la conseguente evoluzione in fibrosi e nel caso del fegato in pseudonoduli cirrotici. In questo microambiente la persistenza degli eventi flogistici, fibrotici e le alterazioni dei meccanismi di apoptosi portano all'iperplasia ed allo sviluppo di displasia e neoplasia (Fig 4B) .

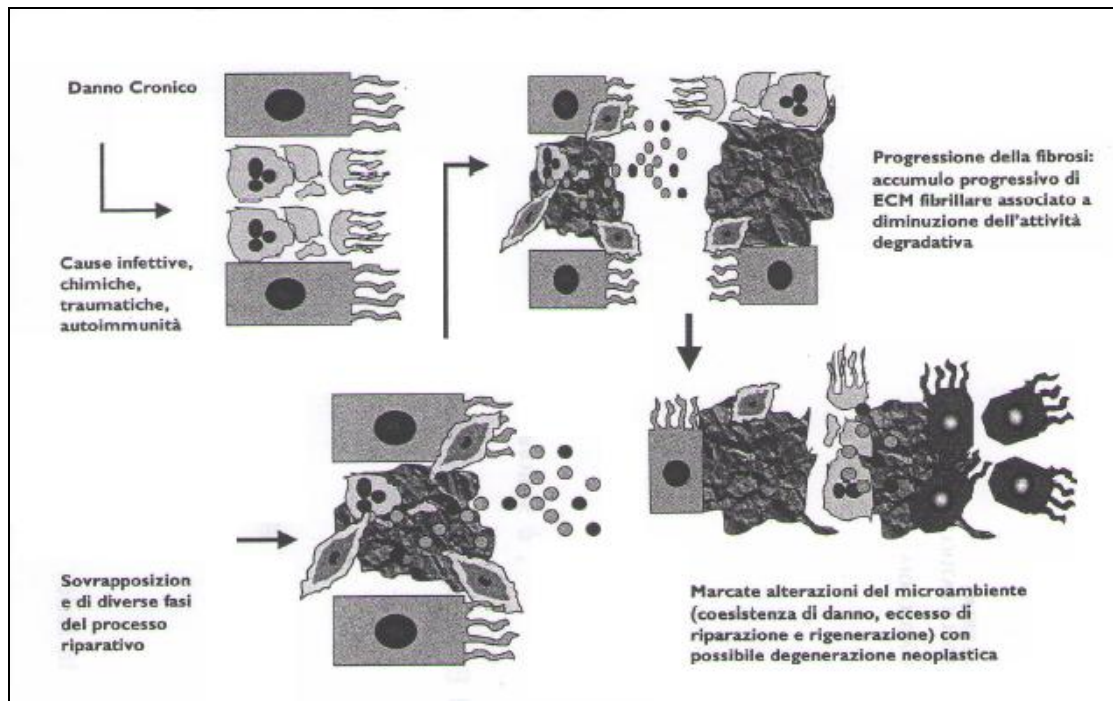


Fig 4B: *Attivazione cronica del processo di riparazione tissutale*

Come accennato lo *Stepwise pathway* riportato in figura passa attraverso le fasi di: nodulo rigenerativo, nodulo displastico e nodulo neoplastico.

Il nodulo rigenerativo è caratterizzato da una localizzata proliferazione di epatociti circondati da stroma. Nella sua definizione sono inclusi:

- a) Il nodulo rigenerativo monoacinare;
- b) Il nodulo rigenerativo multiacinare ,
- c) Il nodulo cirrotico

*I Noduli mono e multiacinare*, sono noduli che contengono uno o più acini con uno o multipli spazi portal. Rientra in questa definizione anche il nodulo large-multiacinar che può avere dimensioni fino a 15 mm.

*Il nodulo cirrotico* ha le stesse caratteristiche del nodulo rigenerativo ma è completamente circondato da setti fibrosi.



Il nodulo displastico è un nodulo in cui gli epatociti mostrano segni istologici di displasia ma non di malignità. La displasia indica la presenza di alterazioni citoplasmatiche o nucleari, con minime o severe atipie nucleari, aumento del glicogeno e del grasso citoplasmatico. Tali cellule sono aggregate a formare dei foci (cluster <1 mm). La displasia può essere a cellule piccole o larghe. Sono distinti in (Hepatol, 1995):

- basso grado: su un parenchima epatico alterato (cirrotico) possono mostrare un aumento della cellularità con un rapporto nucleo/citoplasma aumentato;
- alto grado : mostrano un aumento dello spessore delle filiere epatocitarie con nuclei di variabili dimensioni e forma.

Una volta che la cellula acquisisce il fenotipo neoplastico, si parla di HCC che è una neoplasia maligna e si possono diversi gradi di differenziazione.

Lo “*Small HCC*” è definito come un tumore di diametro  $\leq 2$  cm, la sua distinzione con la displasia ad alto grado non è sempre chiara. I criteri a favore della malignità includono:

- a) numerose atipie nucleari
- b) alto rapporto nucleo/citoplasma con densità doppia
- c) almeno tre filiere di epatociti non vascolarizzate
- d) aumentato numero di mitosi
- e) invasione dello stroma e dei tratti portalì

La maggior parte degli “small HCC” possono essere indistinguibili dai

noduli displastici, inoltre foci di HCC possono essere presenti in noduli displastici. Le recenti tecniche anatomo-patologiche hanno permesso di identificare un'ulteriore tipologia di nodulo che potrebbe rappresentare la fase di passaggio dal nodulo displastico allo “small HCC”, è il cosiddetto “*early cancer*”, un nodulo con margini mal definiti, in cui le cellule sono morfologicamente simili al normale, ma in cui vi sono alcune caratteristiche neoplastiche. Esso all'imaging può apparire come nodulo nel nodulo (Figura 5).



Figura 5: Immagine ecografia di “nodulo nel nodulo”.

Molto spesso è presente un'invasione dello spazio portale e meno spesso delle strutture vascolari da parte di hepatocyte-like cells. Gli epatociti nel nodulo possono contenere grassi, hanno un circolo portale piuttosto che arterioso e non hanno capsula, a differenza di quanto si osserva nello small (Ogata R et al, Onc Rep 20, Roncalli M et al, Hepatol 1999).

Per quanto riguarda la valutazione istologica dei diversi gradi di differenziazione dell'HCC, il sistema più diffuso è quello di Edmondson che contempla 4 gradi (Edmondson HA et al., Cancer 1987).

Grado I : tumori estremamente ben differenziati costituiti da epatociti apparentemente regolari ma con alterazioni della vascolarizzazione, incremento dell'indice mitotico e focali formazioni microacinari.

Grado II : tumori a prevalente struttura microacinare e solida.

Grado III : tumori a prevalente struttura solida e trabecolare ad alto indice mitotico. In questo grado rientrano le forme a cellule chiare.

Grado IV : carcinomi ad alto grado, indifferenziati a struttura solida e alto indice mitotico. In questo grado rientrano anche le forme sarcomatoidi e a cellule giganti.

I tumori di dimensioni maggiori possono presentare nel loro ambito aree a diverso grado di differenziazione.

#### *MODIFICHE VASCOLARI*

Nel pathway stepwise che porta dal nodulo rigenerativo all'HCC avviene una trasformazione vascolare riportata nella figura seguente (Figura 6).

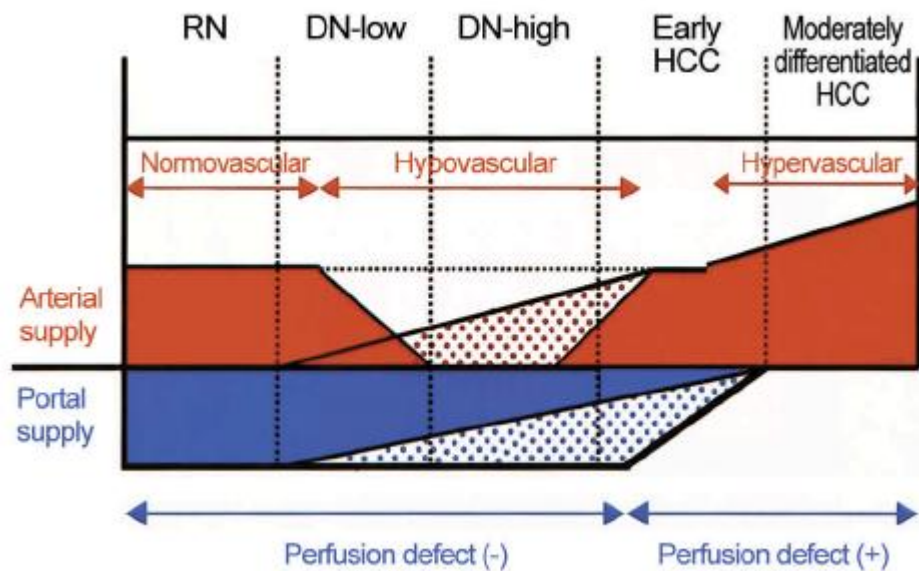


Figura 6: da Choi BI, *J Korean Med Sci* 1998

Il passaggio graduale dalle forme preneoplastiche al piccolo HCC, ed all'HCC avanzato viene tipicamente accompagnato da una progressiva modificazione del flusso vascolare endonodulare con neoangiogenesi di microstrutture vascolari arteriose, con sostituzione delle strutture portali tipiche delle forme displastiche e dell'early cancer. (Byung Ihn Choi, *Korean Med Sci* 1998).

Dal punto di vista macroscopico e radiologico l'evento angiogenetico diventa visualizzabile con le comuni metodiche di imaging solo a partire dallo step di small HCC in poi (Figura 6). In realtà la neoangiogenesi inizia molto tempo prima di tale step e svolge un ruolo importante nell'evoluzione dell'evento carcinogenetico tanto che nuovi farmaci anti-angiogenici vengono già impiegati nella pratica clinica (Llovet JM, et al. *New Engl J Med* 2008)

### Aspetti molecolari della neoangiogenesi

La neoangiogenesi contribuisce notevolmente all'estrinsecazione delle caratteristiche biologiche di malignità dell'HCC come la tendenza all'invasione vascolare, alla metastatizzazione e l'elevato tasso di recidiva anche dopo asportazione chirurgica (Yao DF, et al. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2005). I meccanismi molecolari che sono alla base del processo angiogenetico sono complessi ed ancora non del tutto chiari. L'angiogenesi tumorale è un complesso network regolato da molteplici fattori pro-angiogenici, tra questi i principali sono rappresentati dal VEGF (vascular endothelial growth factor) e dall'angiopoietina.

Il VEGF promuove la crescita, la migrazione e la morfogenesi delle cellule endoteliali ed aumenta la permeabilità vascolare. Studi di immunohistochimica hanno dimostrato che elevati livelli di espressione del VEGF nell'HCC sono associati ad alto indice di proliferazione, trombosi della vena porta etc. (Chow NH, et al. Hum Pathol 1997).

Recentemente è stato identificato un gruppo di ligandi del recettore della tirosin chinasi Tie-2, denominate Angiopoietine (Ang), che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'angiogenesi tumorale (Holash J et al. Oncogene 1999). Le angiopoietine includono sia attivatori che antagonisti del recettore. Il legame con l'angiopoietina 1 (Ang-1) determina un'autofosforilazione di Tie-2, mentre quello con l'angiopoietina 2 (Ang-2) la sopprime. Pertanto l'attivazione del segnale mediato da Tie-2 è definita dall'equilibrio tra l'attività dell'agonista Ang-1 e dell'antagonista Ang-2. E' inoltre noto che un adeguato funzionamento di

Tie-2 è di fondamentale importanza nel normale sviluppo vascolare e nella regolazione del rimodellamento e della maturazione dei vasi. Il pathway Ang-1/Tie-2 infatti sembrerebbe mediare le funzioni vitali della stabilizzazione e del rimodellamento dei vasi determinando l'integrazione di cellule peri-endoteliali nella parete vasale, in particolare in presenza di VEGF. Diversamente dall'Ang-1, l'Ang-2 induce la regressione dei vasi in assenza di VEGF ma ne determinerebbe la proliferazione in sua presenza. E' stato dimostrato che l'espressione ectopica di Ang-2 in cellule di HCC promuove la rapida crescita del tumore e ne aggrava la prognosi, suggerendo un possibile coinvolgimento del pathway Ang2/Tie-2 nell'angiogenesi dell'HCC (Mituha N et al. Hepatol 2003). Inoltre in alcuni studi clinici l'espressione dell'Ang-2 era significativamente correlata con la progressione tumorale e con la prognosi. Altri fattori pro-angiogenici sembrano essere coinvolti nei meccanismi che promuovono l'angiogenesi nell'HCC e questi includono il basic fibroblast growth factor (El-Assal ON et al. Clin Cancer Res 2001), il platelet-derived endothelial cell growth factor (PDGF) (Morinaga S, et al. Hepatogastroenterology 2003), la cicloossigenasi-2 (Cervello M. et al World J Gastroenterol. 2005) e l'angiogenina (Hisai H et al. Clin Cancer Res 2003). Una migliore comprensione del ruolo che ciascuno di questi fattori può svolgere nell'angiogenesi dell'HCC rimane ancora da chiarire soprattutto in funzione del fatto che sono oramai disponibili diversi agenti anti-angiogenici, già utilizzati nella terapia di altre neoplasie, anche per l'HCC.

### Aspetti diagnostici

Il diffondersi delle nuove metodiche di imaging (TC spirale bi e multifasica, RMN dell'ultima generazione) e dell'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) nell'ultimo scorso decennio, ha permesso di studiare in maniera dettagliata le varie fasi di vascolarizzazione epatica: la fase arteriosa (precoce), la fase portale, la fase tardiva. Nella figura successiva sono riportate le variazioni densitometriche del parenchima epatico normale e dell'HCC tipico nelle diverse fasi dell'acquisizione multipassaggio.

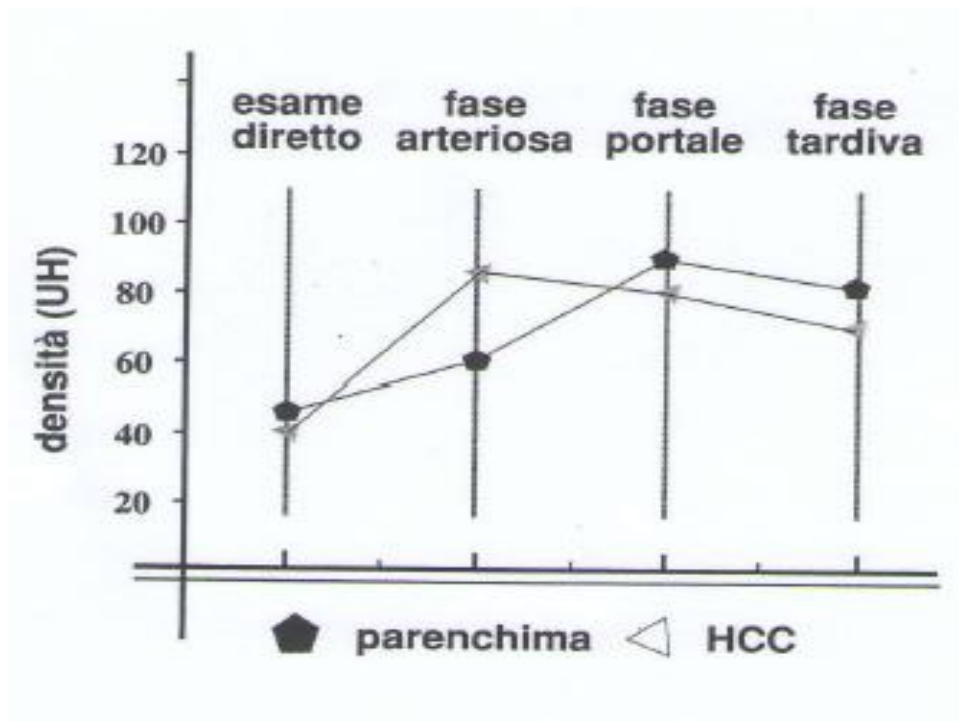


Figura 7 : Il tumore è leggermente ipodenso nelle scansioni dirette, iperdenso in fase arteriosa, modicamente ipodenso in fase portale e ancora di più in fase tardiva (wash-out)

L'imaging radiologico pertanto nelle lesioni premaligne e maligne si avvale dello studio dell'emodinamica intranodulare.

La figura successiva, schematizza il comportamento vascolare arterioso dei noduli epatici su cirrosi distinti in:

- 1) ipervascolare tipico dell'HCC
- 2) isovascolare,
- 3) ipovascolare
- 4) spot vascolare in un nodulo ipovascolare

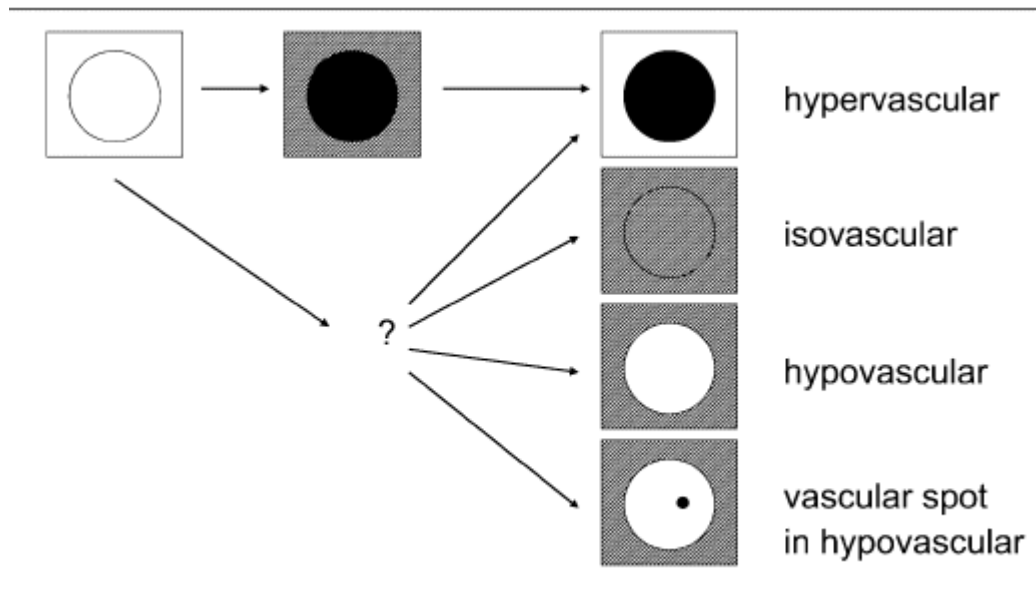


Figura 8 *Pattern vascolari arteriosi dei noduli epatici su cirrosi*

In linea teorica il comportamento ipervascolare arterioso dovrebbe permettere la diagnosi di HCC in tutti gli step istologici della neoplasia ad eccezione dell'early cancer e del nodulo displastico.

Come però dimostra la figura successiva (Figura 8) è possibile che vi siano HCC senza pattern vascolare tipico (assenza di enhancement arterioso, presenza di enhancement arterioso senza wash-out tardivo) ciò avviene soprattutto nei tumori di dimensioni <2 cm e nei noduli displastici ad alto grado che notoriamente vanno considerate dal punto di vista biologico lesioni maligne.



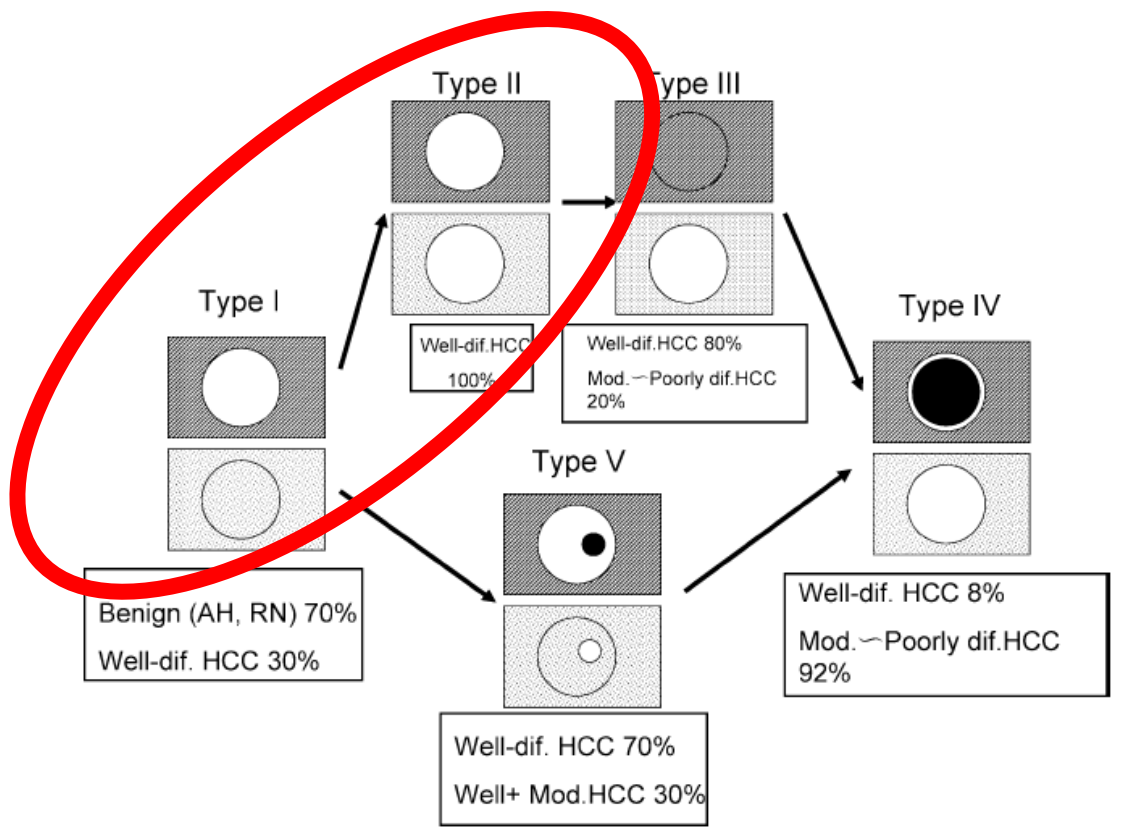
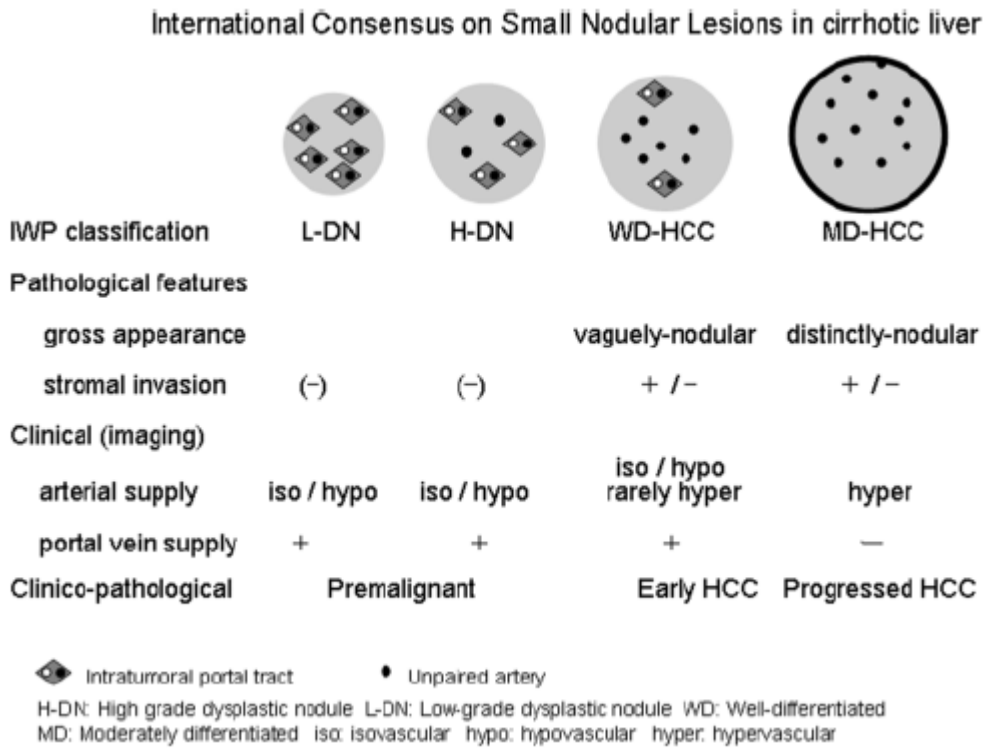


Figura 9: alterazioni del pattern vascolare intranodulare durante l'epatocarcinogenesi. da Kudo M, Intervirology 2004

La recente Consensus Conference nel definire le piccole lesioni nodulari (Hepatology 2009) ha cercato di correlare gli aspetti anatomopatologici con quelli d'imaging e sono sotto indicati (Figura 10)

Figura 10:



## CRITERI DIAGNOSTICI E LINEE GUIDA INTERNAZIONALI

Alla luce delle nuove conoscenze della biologia del tumore di fegato e del miglioramento delle tecnologie diagnostiche, le principali associazioni per lo studio delle malattie del fegato hanno prodotto diverse linee guida per la diagnosi e la stadiazione dell'HCC.

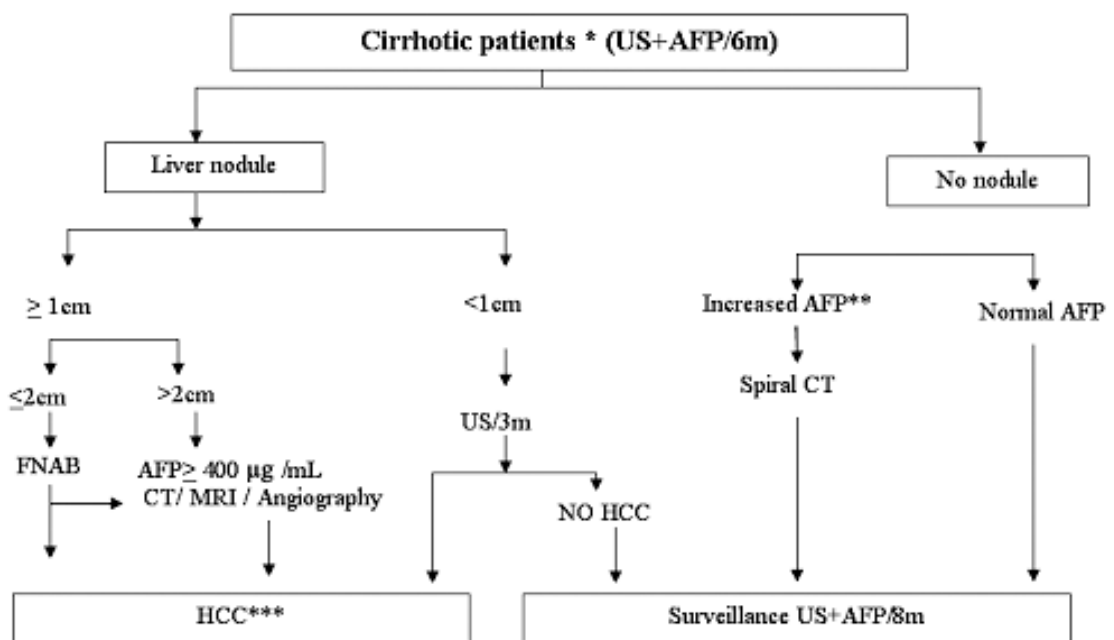


Figura 11: strategie diagnostiche secondo le linee guida della Consensus EASL di Barcellona 2000 (Bruix J, et al. J Hepatol 2001)

Nel 2000 l'EASL ha proposto che l'ipervascolarizzazione arteriosa nei noduli superiori a 2 cm valutata con una metodica dinamica di imaging è sufficiente a porre diagnosi di HCC. Proponendo invece nei noduli di dimensioni inferiori la biopsia epatica e ciò per due motivi a) falsi negativi legati alla presenza del nodulo ipovascolare, b) falsi positivi: sono riportate segnalazioni di noduli ipervascolari etichettati come HCC alla TC o RM che invece si sono rivelati essere

all'espanto dei soggetti trapiantati angiomi atipici. (Marrero JA, et al. Liver Transpl 2005).

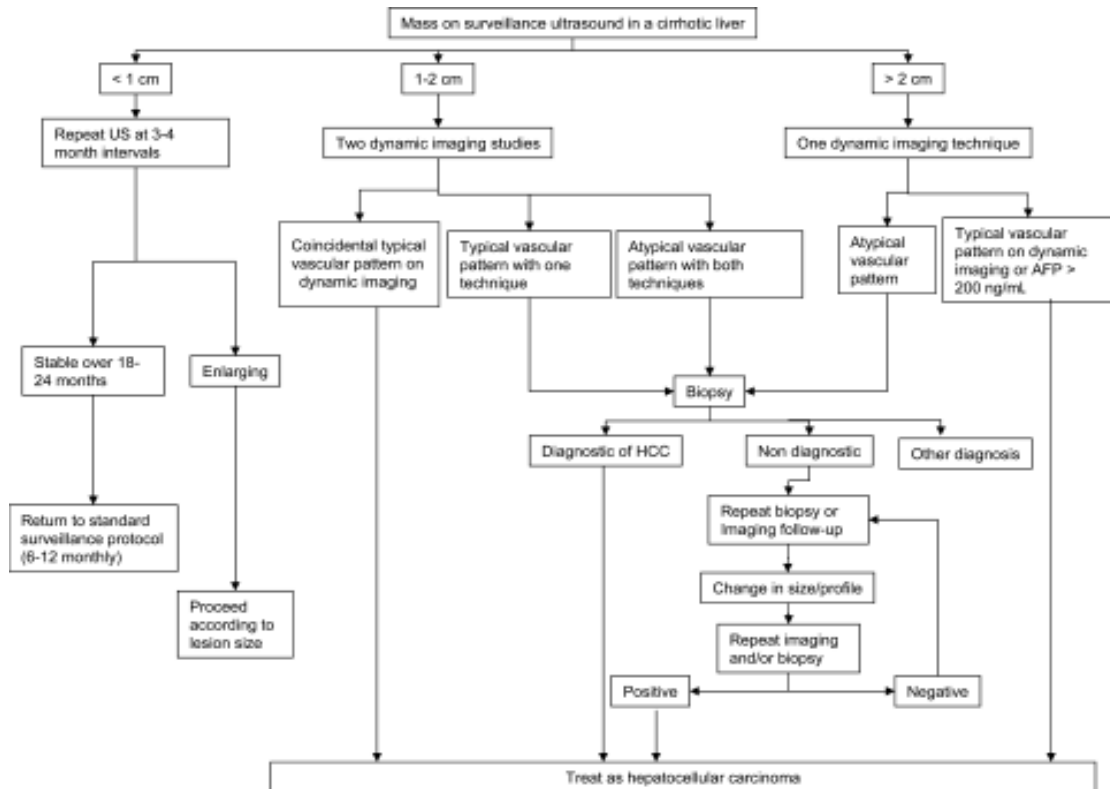


Figura 12: strategie diagnostiche secondo l'AASLD (da Bruix J et al. Hepatology 2005)

Per ridurre la possibilità di falsi positivi le linee guida AASLD nel 2005 propongono la concordanza in due metodiche contrastografiche dell'enhancement tipico ( ipervascolarizzazione arteriosa con wash out tardivo), per porre la diagnosi di HCC senza l'ausilio dell'istologia.

La percentuale di pazienti con tumori ipovascolari è variabile nelle diverse casistiche a seconda delle dimensioni del nodulo considerate (< 3 o < 2 cm) ed oscilla intorno al 30-40 % (Bolondi et al. J Hepatol 2005), (Forner A, et al. Hepatol. 2008). La figura successiva dimostra inoltre quanto la stessa biopsia ecoguidata in noduli < 2 cm abbia un numero di falsi negativi non inferiore al 30 % e va ancora sottolineato che

nello studio riportato venivano inclusi solo soggetti che potevano eseguire la biopsia epatica. Infatti in relazione alla sede ed ai valori della coagulazione, talora l'esame istologico è improponibile ed il follow-up strumentale rimane l'unica e costosa via da seguire.

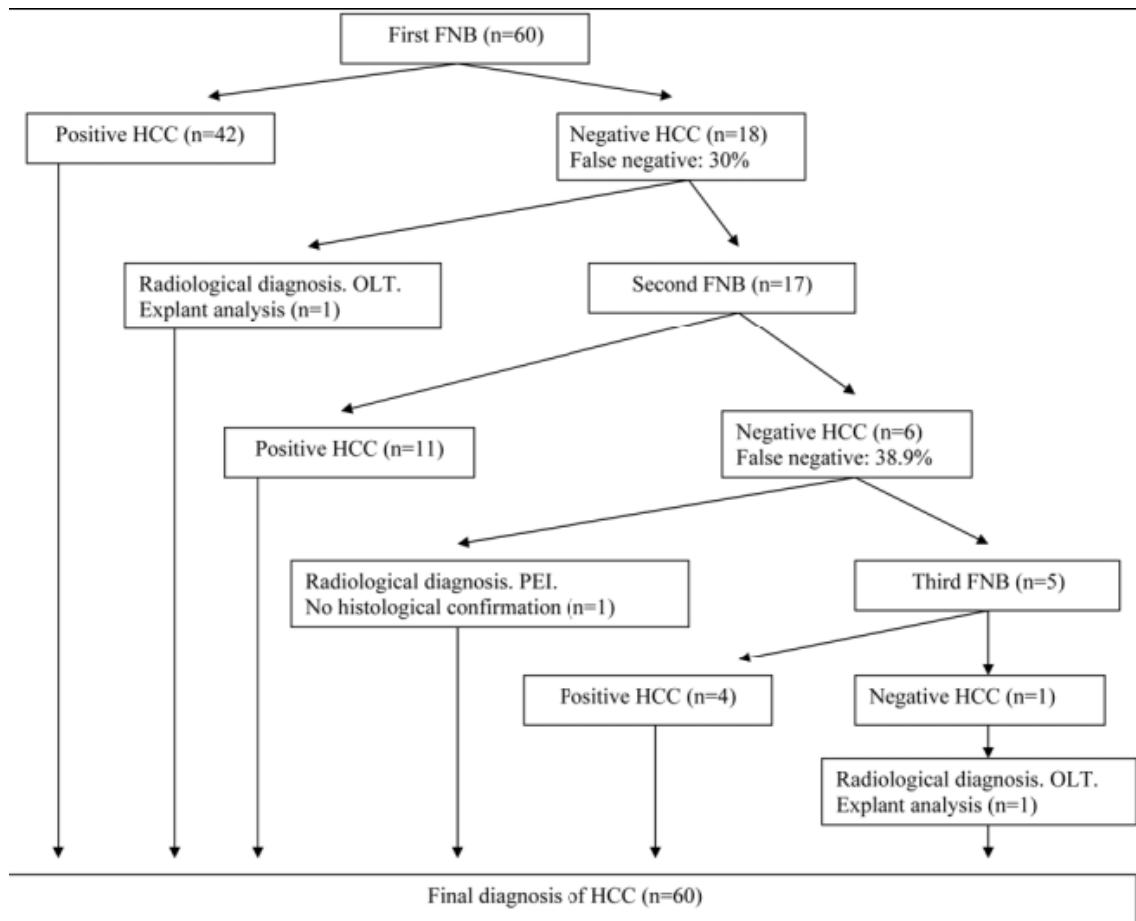


Figura 13: Da Forner et al. *Hepatology*. 2008

Un corretto inquadramento diagnostico peraltro assume oggi sempre più una notevole valenza prognostica come è stato codificato nella cosiddetta classificazione “Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)” per la prima volta apparsa su *Lancet* nel 2003 (Llovet JM et al. *Lancet*. 2003).

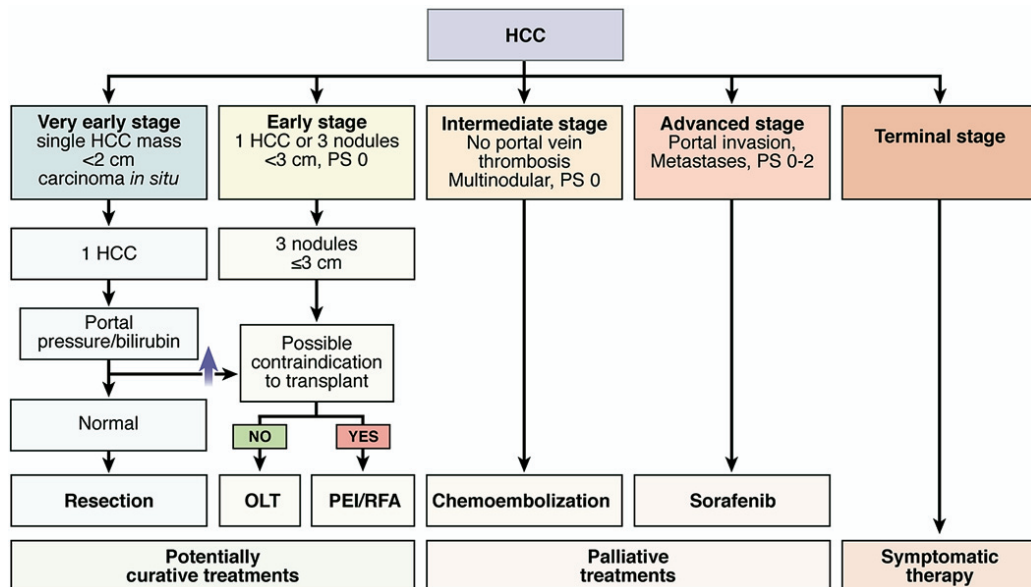


Figura 14: *Algoritmo proposto per il trattamento dell'HCC (BCLC) PS, performance status; OLT, orthotopic liver transplantation; PEI, percutaneous ethanol injection; RFA, radiofrequency ablation.*

Secondo questa classificazione ad esempio, i pazienti con “very early HCC” (stadio 0) sono ottimi candidati per la resezione. I pazienti con “early HCC” (stadio A) sono candidati per la terapia radicale (resezione, trapianto o locoregionale PEI, RFA). I pazienti con HCC intermedio (stadio B) si dovrebbero beneficiare del trattamento con chemioembolizzazione (TACE). I pazienti con HCC avanzato, definito dalla presenza di invasione vascolare macroscopica, diffusione extra-epatica, o comparsa di sintomi correlati alla neoplasia (stadio C) sono candidabili all’uso del Sorafenib. I pazienti con HCC end-stage (stadio D) riceveranno solamente terapia sintomatica.

Recentemente l’AASLD ha prodotto un update delle linee guida sulla diagnosi dell’HCC indicate nella tabella sottostante (*Bruix J et al. Hepatology 2010*)

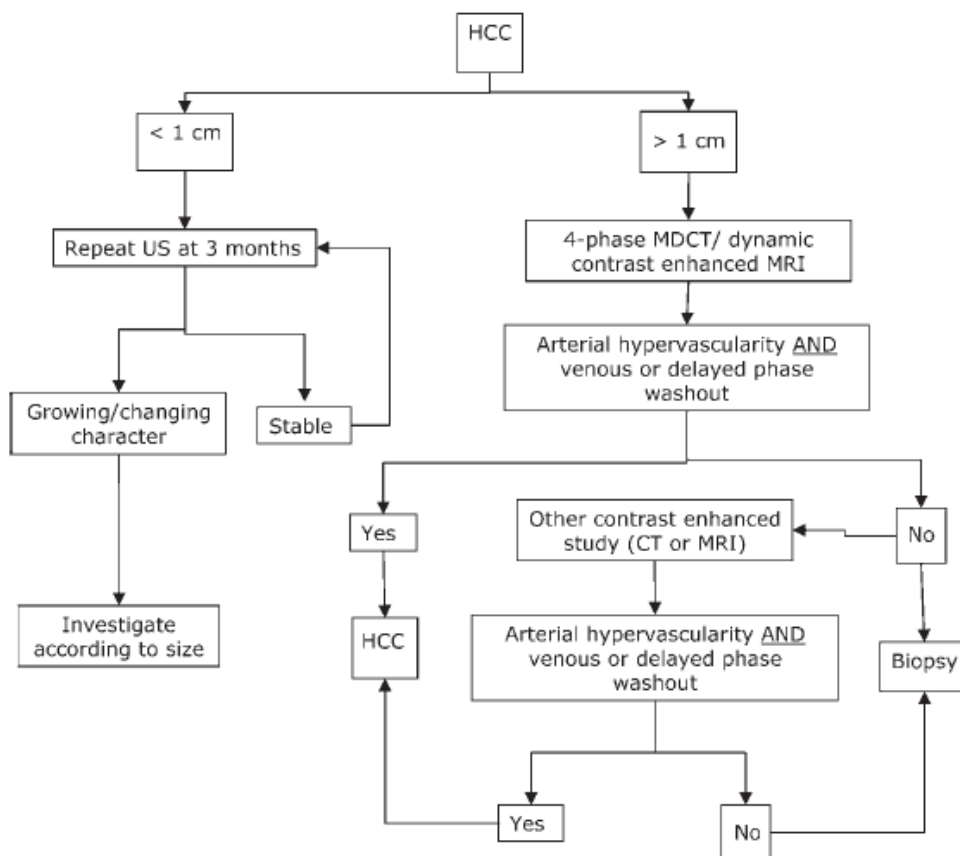


Figura 15: strategie diagnostiche secondo l'AASLD (da Bruix J et al. *Hepatology* 2010)

Rispetto alla precedente linea guida, le lesioni focali con dimensioni superiori ad 1 cm se hanno il classico aspetto d'ipervascularità arteriosa con wash-out tardivo in TC quadrifasica o RM dinamica sono indice diagnostico di neoplasia e non richiedono ulteriori indagini. E' invece necessaria la conferma con altra metodica contrastografica alternativa se il pattern vascolare non è tipico. La biopsia deve essere fatta ogni volta che entrambe le metodiche non hanno l'enhancement tipico del HCC. Inoltre in queste linee guida non viene consigliata la CEUS.

## 7.0 STADIAZIONE

Non sono ben definiti i criteri di stadiazione.

Lo scopo della stadiazione è di offrire uno strumento al medico per scegliere le più opportune modalità di cura.

Poiché la scelta delle modalità di cura è influenzata dallo stadio evolutivo del tumore, è ovvio che i sistemi di stadiazione sono anche in grado, in parte, di predire la prognosi del paziente.

A differenza delle altre neoplasie, nell'EC i sistemi di stadiazione non sono condivisi da tutti.

Una delle ragioni che rende difficile la stadiazione dell'HCC è legata al fatto che nella quasi totalità dei casi, l'epatocarcinoma insorge in pazienti affetti da cirrosi epatica.

Pertanto, la stadiazione del tumore non può non tener conto della severità della sottostante malattia epatica che il più delle volte è l'elemento condizionante la prognosi del paziente.

Un sistema integrato di stadiazione per l'HCC, dovrebbe includere multidimensionalmente le caratteristiche del tumore, la funzionalità epatica, le condizioni generali di salute e la potenzialità terapeutica.

Lo *score* più utilizzato per la valutazione della gravità e della prognosi di malattia epatica è lo score di Child-Pugh (tab.1).

Il principale difetto della classificazione Child-Pugh è la scarsa capacità predittiva legata al fatto che non tiene conto della variabilità clinica e biochimica della malattia, spontanea o indotta dall'intervento del medico.



Tab. 1 Classificazione di Child-Pugh

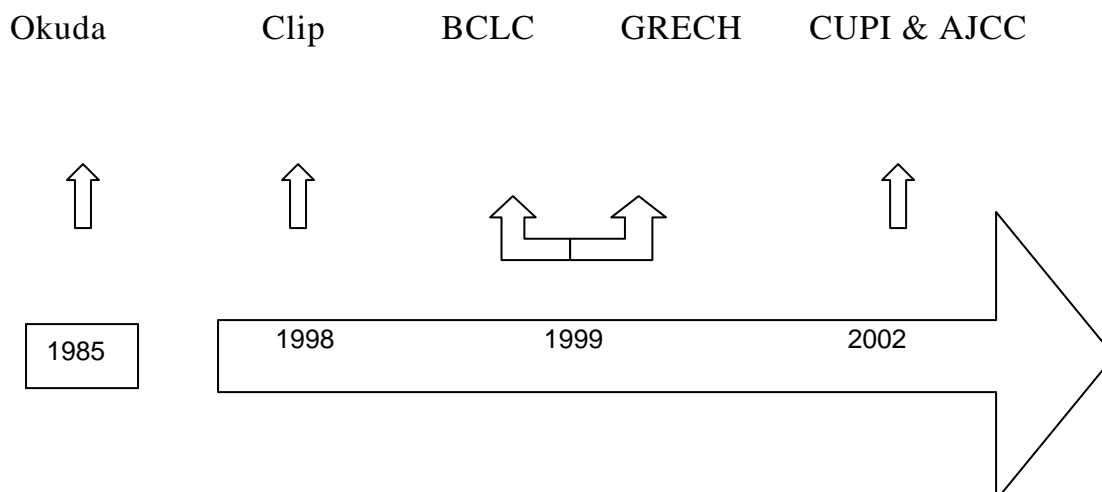
Punteggio	Bilirubina (mg%)	Attività protrombinica	Albumina (g%)	Ascite	Encefalopatia (grado)
1	<1.5	>70%	>3.5	Assente	0
2	1.5-2.3	40-70%	2.8-3.5	Trattabile	1-2
3	>2.3	<40%	<2.8	Non trattabile	3-4

Stadio	Punteggio
A	5-6
B	7-9
C	>=10

Sono state proposte diverse classificazioni che presentano vantaggi e svantaggi in relazione agli obiettivi che il clinico si pone di valutare.

Di seguito è una breve descrizione dei principali sistemi di stadiazione dell'HCC, in ordine strettamente cronologico, scelta che consente anche la ricostruzione dell'evoluitività del pensiero sull'argomento (fig.16).

Fig. 15 Sistemi di classificazione dell'epatocarcinoma.



Il primo sistema fu proposto da Okuda et al.(1985) ed include variabili che valutano la funzione epatica (ascite, albumina, bilirubina) in associazione alle dimensioni del tumore, grossolanamente valutata.

Tre stadi identificano 3 differenti livelli di prognosi della malattia.

Questa classificazione ha il limite di essere stata disegnata con un approccio retrospettivo, su pazienti con malattia avanzata al momento della diagnosi, situazione che oggi si presenta solo nel 50% dei casi.

In questo sistema, importanti parametri prognostici come uni- o multifocalità, invasione vascolare e presenza di localizzazioni extraepatiche non sono inclusi (tab.3).

Tab.3

<b>Il sistema di stadiazione del tumore epatico secondo Okuda</b>	
Estensione del tumore > 50% del fegato	
Ascite +/-	
Albumina < 3 gr/dl	
Bilirubina > 3 mg/dl	
<b>Grado</b>	<b>Caratteristiche</b>
I	Assenza di fattori
II	Presenza di 1-2 fattori
III	Presenza di 3-4 fattori

La stadiazione CLIP (Cancer of the Liver Italian Program) è stata disegnata da un gruppo italiano, include la funzione epatica secondo Child-Pugh, la morfologia macroscopica del tumore (uninodulare, multinodulare, massivo), l'estensione nel fegato, i valori diagnostici di AFP e la presenza di trombosi portale. La combinazione delle diverse variabili segrega i pazienti in 6 categorie: il CLIP è stato validato prospetticamente. Rispetto

a Okuda e Child-Pugh, il CLIP ha dimostrato maggiore accuratezza prognostica e maggiore capacità di discriminare gruppi omogenei (tab.4).

Tab 4 Il sistema di stadiazione del tumore epatico secondo CLIP

	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>VARIABILI</b>			
Classe di Child-Pugh	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Morfologia del tumore	Uninodulare ed estensione </=50%	Multinodulare ed estensione </=50%	massiva o estensione >50%
Alfa-fetoproteina (ng/dl)	<400	>/=400	
Trombosi della vena porta	no	si	

La stadiazione BCLC (Barcellona Clinic Liver Cancer) fu proposta nel 1999 come strumento per suddividere in categorie i pazienti suscettibili di trattamento curativo (resezione, trapianto) rispetto a quelli proponibili solo per il trattamento palliativo.

Tale classificazione è l'unica sinora proposta che rispetta pienamente le caratteristiche individuate dalla Conferenza EASL di Barcellona, cioè tiene conto di tutte le quattro principali variabili dell'HCC e considera diversi stadi evolutivi ciascuno con i principali fattori predittivi.

Lo score, basato sui valori di performance status, numero dei noduli, invasione vascolare, grado Child-Pugh, stratifica i pazienti in 4 gruppi a rischio crescente di mortalità. Per ciascun gruppo corrisponde un diverso approccio terapeutico.

Gruppo A (stadio iniziale) candidato a terapia radicale (resezione, trapianto, PEI RFTA);

gruppo B e C (stadio intermedio ed avanzato), per i quali non è possibile

applicare una terapia curativa ma suscettibile di terapia palliativa;

gruppo D (stadio terminale) per il quale è proponibile solo terapia sintomatica.

La classificazione BCLC sembra particolarmente efficace nello stratificare i pazienti con HCC trattati con terapie potenzialmente radicali come dimostrato in un recente studio retrospettivo (Cillo et al.2004).

Manca tuttavia una sua validazione prospettica (tab.5).

Tab.5 Il sistema di stadiazione del tumore secondo BCLC

Stadio	Caratteristiche del tumore	Parametri epatici
Stadio A (EC iniziale)		
A1 PST 0	Nodulo unico	Assenza di ipertensione portale, livelli ematici di bilirubina nella norma
A2 PST 0	Nodulo unico	Ipertensione portale, livelli ematici di bilirubina nella norma
A3 PST 0	Nodulo unico	Ipertensione portale, livelli ematici di bilirubina alterati
A4 PST 0	3 noduli < 3 cm	Child-Pugh A-B
B (EC intermedio) PST 0	Multinodulare (estesi)	Child-Pugh A-B
C (EC avanzato) PST 1-2	Invasione vascolare ed estensione extraepatica	Child-Pugh A-B
D (EC terminale) PST 3-4	Altro	Child-Pugh C

Il sistema TNM (Tumour Node Metastasis), è giunto nel 2002 ormai alla sesta revisione da parte dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC). I criteri di classificazione prendono in considerazione le caratteristiche del tumore primario, la presenza di metastasi linfonodali e quella delle metastasi a distanza stratificano i pazienti in 4 gruppi.

Il principale limite di questa stadiazione è di non includere parametri di funzione epatica e di richiedere indagini invasive.

Attualmente è utilizzato in combinazione con altri criteri, come Child-

Pugh per la valutazione della funzione epatica (tab.6).

Tab.6 II sistema di stadiazione del tumore del fegato secondo TNM

<b>Stadio</b>	<b>Tumore (T)</b>	<b>Linfonodi (N)</b>	<b>Metastasi (M)</b>
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3	N0	M0
IIIB	T4	N0	M0
IIIC	Qualsiasi T	N1	M0
IV	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1

### Calcolo del fattore TNM

T1	Singola lesione senza invasione vascolare
T2	Singola lesione con invasione vascolare, o noduli multipli, tutti <5cm
T3	Noduli multipli > 5cm o interessamento tumorale della maggior parte della vena porta o delle vene epatiche
T4	Lesione singola o multipla con invasione diretta degli organi adiacenti oltre che della cistifellea, o con perforazione del peritoneo viscerale
N0	Assenza di metastasi regionali ai linfonodi
N1	Metastasi regionali ai linfonodi
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Metastasi a distanza

L'orientamento della comunità degli epatologi è di utilizzare sistemi di stadiazione diversificati in relazione a prognosi, trattamento e stadio della malattia.

Allo stato attuale, lo score CLIP è l'unica classificazione valida in maniera prospettica in differenti pazienti ed aree geografiche.

La sua capacità prognostica discriminante sembra superiore ad altre classificazioni Essendo, però, limitata da una bassa sensibilità per i tumori piccoli, non è accurata per guidare la scelta del trattamento.

La stadiazione BCLC, validata prospetticamente in USA e Italia, facilita la categorizzazione dei pazienti in relazione al trattamento ed in particolare è dotata di una buona sensibilità nell'identificare pazienti candidati alle terapie curative (tab.7).

L'obiettivo di una stadiazione universalmente accettata è per migliorare l'accuratezza della prognosi nel singolo paziente, favorire la selezione dei pazienti alle diverse terapie ed infine per identificare gruppi omogenei dei pazienti nei confronti dell'efficacia terapeutica.

Tab.7 Sintesi dei vantaggi e svantaggi delle diverse classificazioni

<b>Score</b>	<b>Semplicità</b>	<b>Accuratezza prognostica</b>	<b>Validazione prospettica</b>	<b>Confronto prospettico con altri score</b>	<b>Valutazione funzione epatica</b>
Okuda	+++	Bassa	Si	Si	Si
TNM	+	Bassa	Si	Si	No
CLIP	+++	Alta	Si	Si	Si
BCLC	++	Alta	No	No	Si
French	++	Buona	No	No	Si
CUPI	+	Alta	No	Si	Si

# TERAPIA

## Algoritmo terapeutico

Negli ultimi 20 anni si è assistito ad un aumento della sopravvivenza dei pazienti affetti da HCC, grazie sia ai programmi di sorveglianza, che hanno permesso la diagnosi precoce, sia ad un miglioramento delle strategie terapeutiche (Bruix et al., 2001 ).

Attualmente la sopravvivenza a 5 anni di un paziente con EC in stadio precoce, trattato con intervento radicale, è di circa il 70%, mentre quando la malattia è in stadio intermedio-avanzato, senza possibilità di trattamento efficace, la sopravvivenza a 3 anni è ridotta al 10-50%.

La scelta del trattamento dell'EC deve tener conto di vari fattori che influenzano la prognosi e che sono rappresentati da:

1. numero e dimensione dei noduli tumorali,
2. invasione portale;
3. presenza o assenza di cirrosi;
4. grado di deterioramento della funzione epatica.

I pazienti con HCC diagnosticato ad uno stadio precoce sono candidati a trattamenti potenzialmente curativi, in grado di eradicare il tumore e di prolungare la sopravvivenza.

Tali trattamenti sono:

- resezione chirurgica;
- trapianto di fegato;
- tecniche ablative percutanee.

Tuttavia, solo il 30-40% dei pazienti sono candidati a tali terapie, per lo stadio avanzato della malattia al momento della diagnosi e per la presenza di co-morbilità (Bruix et al.,2002).

La rimanente quota di pazienti viene indirizzata verso approcci palliativi, con lo scopo di rallentare la progressione della malattia e quindi aumentare la sopravvivenza.

I trattamenti palliativi, la cui efficacia è stata valutata con studi randomizzati e studi non controllati, includono:

- la chemio-embolizzazione,
- la chemioterapia sistemica od intra-arteriosa,
- l'irradiazione interna di lipiodol 131 I,
- ormoni,
- immunoterapia,
- interferone.

E' stato sviluppato un algoritmo terapeutico basato sull'estensione della neoplasia e sullo stato di funzione del fegato (tab.9.1).

*Nel caso di riscontro di **nodulo singolo** <5 cm, le opzioni terapeutiche sono:*

### **Fegato non cirrotico**

*-Resezione chirurgica.* E' la principale opzione terapeutica.

Purtroppo, pochissimi pazienti con fegato sano vengono diagnosticati in fase precoce per l'assenza di sintomi e di programmi di sorveglianza.

*-Trapianto di fegato.* Può essere proposto in casi selezionati, che presentano un tumore non resecabile.



## Fegato cirrotico

Un corretto inquadramento diagnostico peraltro assume oggi sempre più una notevole valenza prognostica come è stato codificato nella cosiddetta classificazione “Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)” per la prima volta apparsa su Lancet nel 2003 (Llovet JM et al. Lancet. 2003).

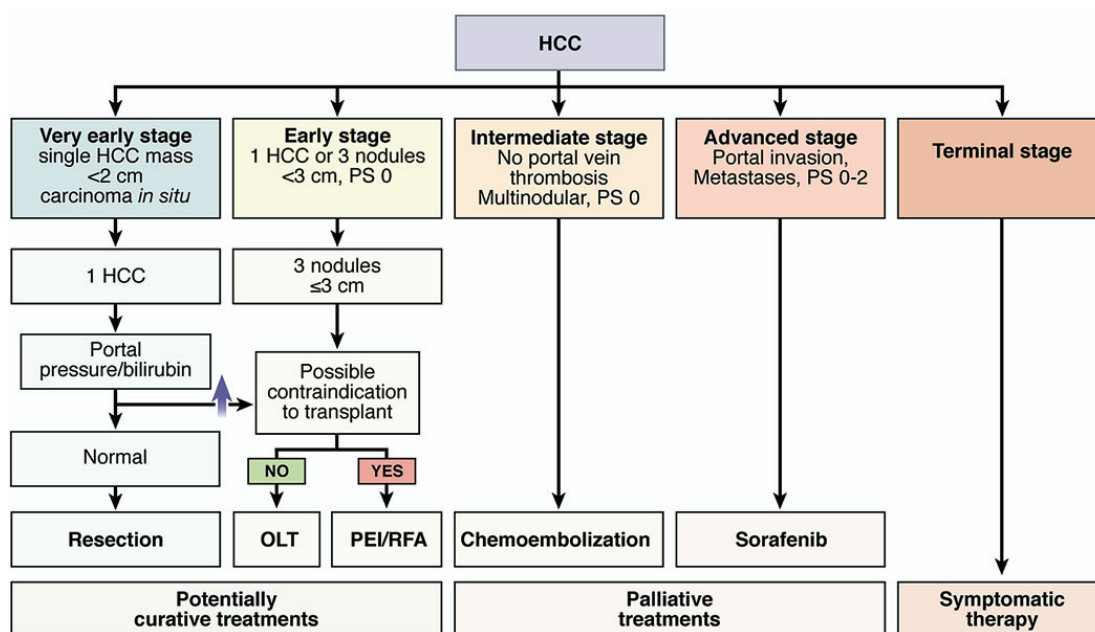


Figura 16.

Secondo questa classificazione ad esempio, i pazienti con “very early HCC” (stadio 0) sono ottimi candidati per la resezione. I pazienti con “early HCC” (stadio A) sono candidati per la terapia radicale (resezione, trapianto o locoregionale PEI, RFTA). I pazienti con HCC intermedio (stadio B) si dovrebbero beneficiare del trattamento con chemioembolizzazione (TACE). I pazienti con HCC avanzato, definito dalla presenza di invasione vascolare macroscopica, diffusione extra-epatica, o comparsa di sintomi correlati alla neoplasia (stadio C) sono candidabili all’uso del Sorafenib. I pazienti con HCC end-stage (stadio D) riceveranno solamente terapia sintomatica.

*-Resezione chirurgica.* E' la terapia di scelta (sopravvivenza a 5 anni del 70%) per i pazienti con buona funzionalità epatica (Child-Pugh A), bilirubina normale e modesta ipertensione portale, (gradiente pressorio-

venoso epatico < 10 mm Hg, assenza di varici).

Solo il 5-10% dei pazienti risponde a criteri di selezione.

- *Trapianto di fegato*. E' l'opzione terapeutica in pazienti con funzionalità epatica compromessa e/o ipertensione portale o che presentino un nodulo in posizione non resecabile, aventi età <60 anni senza malattie associate (quali cardiopatie) che costituiscono una controindicazione.

Sono riportate percentuali di sopravvivenza > 70% a 5 anni e una percentuale di recidive <15%.

Tuttavia, questi risultati sono gravati dalla carenza di donatori che comportano una lunga permanenza in lista di attesa ed una possibile progressione della malattia.

Negli Stati Uniti è stato proposto un nuovo sistema di distribuzione degli organi ai pazienti in lista di attesa denominato MELD score (*Model for End-Stage Liver Disease*) (Freeman et al., 2002).

Questo sistema, che dà priorità ai pazienti con HCC al fine di ridurre la percentuale di *drop-out*, è attualmente applicato in un grande numero di centri nel mondo, l'Italia inclusa.

Recentemente, in molti centri i pazienti in lista di attesa vengono sottoposti a terapie adiuvanti (ablazione percutanea, chemio-embolizzazione) che mirano a rallentare la progressione del tumore.

Fino ad ora, non è stata dimostrata l'efficacia di queste terapie in termini di sopravvivenza e sono necessari studi controllati.

Il trapianto da donatore vivente è un'alternativa al trapianto da cadavere nei pazienti con HCC, soprattutto quando il tempo di attesa nella lista da donatore cadavere è prolungata.

- *Ablazione percutanea*. E' la terapia d'elezione in pazienti non resecabili oppure in attesa di trapianto, per rallentare la progressione della malattia.

L'iniezione percutanea di etanolo (PEI) sotto guida ecografica è la tecnica più utilizzata ed è considerata il *gold standard* per il trattamento dell'HCC di piccole dimensioni.

Ha il vantaggio di essere di facile esecuzione, con percentuale di complicanze bassa.

E' in grado di ottenere la necrosi tumorale completa nel 70-80% degli EC solitari di dimensioni inferiori o uguali a 3 cm e sono state dimostrate percentuali di sopravvivenza a 5 anni del 50% in pazienti in classe A di Child-Pugh.

Alternativa alla PEI è l'ablazione del nodulo tumorale avvalendosi del calore, utilizzando elettrodi che vengono inseriti all'interno della lesione tumorale e attraverso i quali passa energia ad alta frequenza.

La metodica ha maggiore efficacia nei noduli maggiori di 3 cm, mentre più numerosi risultano essere gli effetti collaterali e il costo.

- *Chemio-embolizzazione endoarteriosa (TACE).*

- La TACE può' essere proposta nei pazienti:

- non resecabili;

- non trapiantabili;

- in lista di trapianto come terapia adiuvante;

- non proponibile per l'ablazione percutanea per la posizione del nodulo (superficiale, sottodiaframmatico, pericolecistico).

*Nel caso di riscontro di **nodulo singolo** >5 cm, le opzioni terapeutiche sono:*

### **Fegato non cirrotico**

- *Resezione chirurgica.* I buoni risultati ottenuti in questi pazienti con un nodulo maggiore di 5 cm dipendono probabilmente dall'assenza di cirrosi,

che permette un'estesa resezione del fegato, senza ridurre la sopravvivenza.

### **Fegato cirrotico**

- *Terapie sequenziali* TACE/ PEI/ RFA. Questi trattamenti sono applicati in maniera sequenziale allo scopo di ridurre la massa tumorale (TACE) e di aggredire successivamente il tumore residuo con PEI o RFA.

*Nel caso di HCC multinodulare, le strategie terapeutiche dipendono dal numero e dalle dimensioni dei noduli.*

**$\leq 3$  noduli  $\leq 3$ cm**

### **Fegato non cirrotico**

- *Trapianto di fegato*

- PEI/RFA

- TACE

### **Fegato cirrotico**

- *Trapianto di fegato.* Rappresenta la migliore opzione terapeutica in quanto il trapianto è in grado di curare sia la neoplasia che la malattia che la induce.

Frequentemente nel caso di tumori multipli vengono proposti trattamenti loco-regionali ai pazienti in lista di attesa, allo scopo di rallentare la progressione della neoplasia.

- PEI/RFA

- TACE.

**> 3 noduli > 3 cm**

### **Fegato non cirrotico e Fegato cirrotico**

- TACE. La TACE è l'opzione più utilizzata per l'EC non resecabile, soprattutto se multifocale. La TACE non ha dimostrato beneficio in termini di sopravvivenza, se non in due studi recenti (Pelletier et al., 1990; Bruix et al., 1998).

La TACE pertanto sembra una possibile opzione terapeutica nei pazienti cirrotici con tumore multifocale inoperabile e buon compenso epatico (Child-Pugh A-B), per evitare il rischio di insufficienza epatica.

E' possibile l'uso di RF in combinazione o sequenza alla TACE per ridurre la progressione del tumore.

### ***EC con invasione vascolare***

#### **Fegato non cirrotico e Fegato cirrotico**

- *Nuove terapie.* Questo gruppo di pazienti non può trarre giovamento da alcuna delle terapie tradizionali e può essere indirizzato a Centri che propongono studi clinici controllati con nuove proposte terapeutiche.

### ***EC in paziente cirrotico, stadio terminale***

- *Terapia sintomatica.* Questi pazienti non possono trarre giovamento da alcun trattamento e possono solamente essere sottoposti a terapie di supporto e sintomatiche.

## 9.2 Terapia loco-regionale

### **RFA ed alcolizzazione**

Le terapie percutanee loco-regionali consentono l' introduzione di un agente lesivo direttamente nel contesto (*in situ*) del tessuto neoplastico. Esse possono basarsi sull'impiego di mezzi in grado di distruggere il tessuto per via chimica, come l'alcool etilico (PEI, *Percutaneous Ethanol Infection*) o l'acido acetico oppure per via fisica (termica), come il laser o la radiofrequenza (RFA, *Radio-Frequency Ablation*).

### **PEI**

L'alcool agisce sia diffondendo all'interno delle cellule e causando un'immediata disidratazione delle proteine citoplasmatiche con conseguente necrosi coagulativa seguita da fibrosi, sia entrando nel circolo ematico e provocando la necrosi delle cellule endoteliali e l'aggregazione di piastrine con conseguente trombosi di piccoli vasi seguita dall'ischemia del tessuto neoplastico.

Due caratteristiche di questo tumore favoriscono l'azione tossica dell'etanolo: l'ipervascolarizzazione e la differente consistenza più molle del tessuto cirrotico circostante.

L'etanolo diffonde e rimane all'interno di esso più facilmente e più selettivamente mentre, nello stesso tempo, l'ipervascolarizzazione facilita la sua uniforme distribuzione all'interno della ricca rete di vasi neoplastici. La PEI è solitamente eseguita sotto guida ecografica.

Può essere eseguita con più sedute in regime ambulatoriale, quando il tumore è più voluminoso, con paziente ospedalizzato.

Generalmente si ricorre alla prima procedura negli epatocarcinomi in stadio precoce (early) secondo la classificazione di Barcellona (Llovet et al.,1999), cioè con noduli singoli di dimensioni < 5 cm o con un massimo

di 3 noduli dimensioni < 3 cm ed alla seconda procedura negli epatocarcinomi in stadio "intermedio", purché il tumore, a focolaio singolo o multiplo, non superi il 30% dell'intero volume epatico.

## **RFA**

Il trattamento di termoablazione sfrutta la conversione dell'energia di un'onda elettromagnetica in calore, che è generato all'interno del tessuto.

Il calore prodotto, quando supera 50° centigradi provoca la necrosi coagulativa del tessuto.

Il trattamento con RFA viene generalmente eseguito sotto guida ecografica, con paziente cosciente se il tumore è di piccole dimensioni o in anestesia generale quando più avanzato (fig.9.2.1).

Tre studi di autori differenti hanno dimostrato una maggiore efficacia locale della RFA nei confronti della PEI.

Infatti, nei tumori fino a 3 cm, la PEI ha ottenuto una necrosi completa in 80-81-94% dei casi, la RFA l'ha rispettivamente ottenuta in 90-92-100% dei casi (Livraghi et al.,1999; Ikeda et al.,2001; Lencioni et al.,2003).

La RFA ha presentato una maggiore efficacia anche nei tumori di maggiori dimensioni, senza presentare gli effetti collaterali che si osservano dopo PEI (Livraghi, Goldberg et. al.,2000).

Per quanto concerne la scelta della procedura, quando entrambe le metodiche sono disponibili, la RFA viene generalmente preferita alla PEI. La PEI viene utilizzata nei casi a rischio per la RFA, come nei noduli situati in sede sottoglissionana giustapposti ad anse intestinali per la possibilità di perforazione delle stesse o, se contigui ad importanti vie biliari, per evitarne la stenosi.

Ad esse può venire abbinata o preferita la chemio-embolizzazione (TACE) selettiva, in particolare quando il tumore non è riconoscibile all'ecografia,

quando persistono aree di tessuto vitale non ritrattabili con l'ablazione percutanea, o in presenza di satellitosi (Livraghi et.al.,2004).

Per la valutazione dell'efficacia terapeutica, cioè per determinare se il tumore è diventato completamente necrotico o se persistono al suo interno aree di tessuto neoplastico, viene utilizzata una combinazione di indagini (ecografia e soprattutto TC spirale con tecnica trifasica o RM ed angiografia), dosaggio dei marcatori oncologici o alla biopsia solo nei rari casi di dubbia interpretazione.

La risposta viene giudicata completa quando la TC mostra la totale scomparsa di *enhancement* che significa assenza di vascolarizzazione dovuta alle manifestazioni fibroneurotiche che hanno sostituito il tessuto neoplastico.

Se le aree di tessuto rimasto vitale sono, per le piccole dimensioni, oltre i poteri di risoluzione attuale, diventeranno facilmente identificabili nelle indagini successive per la presenza di un incremento volumetrico e di *enhancement* .

Anche i marcatori vengono utilizzati per la valutazione di efficacia, ma negli epatocarcinomi in fase precoce essi sono frequentemente normali. Vengono dosate l'alfa-fetoproteina e la des-gamma-carbossi-protrombina, in quanto spesso complementari tra loro.

Un aumento del dosaggio durante i controlli suggerisce sempre una ripresa locale di malattia o la comparsa di nuove lesioni.

Il controllo con ecografia, TC e con i marcatori viene solitamente effettuato un mese dopo il trattamento e quindi ogni 4-6 mesi.

L'HCC generalmente coesiste con una epatopatia cronica, di solito di origine virale e meno frequentemente di natura alcolica, che negli stadi più avanzati condiziona la prognosi più della patologia neoplastica.



E' sottinteso, pertanto, che se la prognosi è maggiormente condizionata dalla patologia neoplastica, la terapia non deve peggiorare la funzionalità epatica.

Le terapie di ablazione percutanea non danneggiano il tessuto epatico, al contrario degli interventi di chirurgia resettiva maggiore o della TACE convenzionale, eseguita su tutto l'ambito epatico.

Il primo nodulo, di solito evidenziato durante un programma di sorveglianza ecografica, è solo il preludio ad altri.

Secondo uno studio recente, la multicentricità è già, comunque, presente nel 50% dei casi ancora allo stadio precoce ed il 93% dei pazienti operati per tumore in situ (<2 cm) ha presentato altri noduli entro 5 anni (Nakashima et al.,2001).

Per tale ragione ogni terapia locale, chirurgica e non, può risultare solo palliativa e porsi, come scopo, soltanto il miglioramento della sopravvivenza.

L' HCC ha bisogno durante la sua evoluzione di più interventi terapeutici, possibilmente ripetibili, semplici, a basso rischio ed a basso costo.

In due studi multicentrici, su 1066 pazienti trattati con PEI (Di Stasi et al.,1997) e su 1610 pazienti trattati con RFA (Livraghi et al.,2003), la percentuale di mortalità è stata rispettivamente di 0.09% e 0.3% e delle complicanze maggiori di 3,2% e 21%.

Circa i risultati, la PEI, concepita per trattare i pazienti non operabili, ha guadagnato nel corso degli anni sempre più consensi tanto da venire oggi spesso preferita alla resezione.

Sebbene sia sottinteso che la resezione, se anatomica, assicura la completa rimozione del tumore, differenti studi di comparazione tra PEI e chirurgia hanno dimostrato una sostanziale sovrapponibilità delle sopravvivenze a

lungo termine.

Due studi retrospettivi multicentrici, uno italiano, (Livraghi, Bolondi et al.,1995) ed uno giapponese (Ryu et al., 1997), entrambi riguardanti l'HCC allo stadio precoce in pazienti in classe Child A, hanno riportato rispettivamente una sopravvivenza a 3 anni del 79% e del 71% ed a 5 anni del 47% e del 53%.

Uno studio prospettico di un singolo centro, riguardante tumori singoli o multipli fino ad un massimo di tre noduli < 3 cm, ha riportato una sopravvivenza del 59% per la PEI e del 61% per la resezione (Yamamoto et al.,2001).

Lo studio più recente e più numeroso riportato dal (*Liver Cancer Study Group of Japan 2003*).

Detta equivalenza è probabilmente attribuibile ad un bilanciamento dei vantaggi delle due metodiche.

Da una parte la chirurgia che offre un migliore controllo locale del tumore, dall'altra la PEI che presenta una minore percentuale di mortalità e morbilità, un minore danno del tessuto non neoplastico ed è ripetibile sui nuovi noduli.

Inoltre occorre tenere presente l'effetto di appiattimento su entrambe le curve di sopravvivenza da parte dei casi con storia naturale aggressiva, poco responsiva a qualsiasi trattamento.

Due recenti studi che analizzano il risultato della PEI per l'HCC precoce, tuttavia, dimostrarono risultati più scadenti a 5 anni, con sopravvivenze che si collocano intorno al 30-40% (Andriulli et al.,2004; Sala et al.,2004) (tab.9.2.1)

Tab.8 Sopravvivenza a 3 — 5 anni di pazienti Child A con HCC precoce, trattati con PEI

Autore	Anno	Diametro	N° pz	3 anni (%)	3 anni (%)
Livraghi	1995	<5	293	79	47
Erbera	1995	<3	112	67	56
Ryu	1997	<3<	110	71	53
Lencioni	1997	<3	70	81	63
Yamamoto	2001	<3	39	82	59

Per ciò che concerne le indicazioni non esistono dati basati sulle prove capaci di fornire linee guida universalmente accettate per una comune strategia terapeutica, in particolare per quanto riguarda i tumori "border-line", per i quali i centri di riferimento adottano scelte dettate dalla propria esperienza.

Per quanto riguarda l'epatocarcinoma in stadio "precoce", la Conferenza di Barcellona del 2000, organizzata dalla Società Europea di Epatologia, ha riconosciuto come terapie curative il trapianto epatico, la resezione parziale ed i trattamenti di ablazione percutanea.

Basandosi sull'assunto che la resezione è in grado di fornire maggiori garanzie di efficacia locale, essa sarebbe da preferire alla PEI o alla RFA nei casi di tumore singolo, purché in assenza di ipertensione portale e di bilirubina anormale (Bruix et al.,2001).

Questi due fattori sono infatti risultati determinanti sulla prognosi, come dimostrato da uno studio in cui la sopravvivenza a 5 anni è stata del 25% in loro presenza e del 74% in loro assenza (Llovet, Funster et al., 1999).

Per quanto riguarda l'HCC in stadio "intermedio" (tumore multinodulare o > 5 cm senza invasione vascolare e con buon PST), le linee guide della Conferenza di Barcellona (Bruix et al.,2001) suggeriscono di utilizzare a scopo palliativo la TACE e due studi randomizzati pubblicati successivamente hanno avvalorato questo indirizzo (Llovet et al.,2002; Lo et al.,2002).

In questo stadio, seppure in pazienti selezionati, sia la PEI che la RFA (o la TACE selettiva) possono ottenere un controllo locale della neoplasia superiore a quella delle terapie intra-arteriose, senza aggiungere il danno del parenchima sano.

E' tuttavia fondamentale ricordare che la molteplicità di presentazioni della malattia, che dipendono da sede, dimensioni, grado di vascolarizzazione, tipo, grado di differenziazione, stato di funzionalità epatica, età, sottintendono una scelta personalizzata della strategia terapeutica (Livraghi et al.,2004), difficilmente attuabile seguendo le rigide flow-chart ufficiali.

Lo stesso paziente, o anche lo stesso tumore, può venire trattato con diverse modalità terapeutiche, sia al primo approccio sia durante il follow-up che, nei responsivi, può protrarsi per molti anni.

In conclusione, esclusi i pazienti candidati al trapianto o alla resezione anatomica, la maggioranza dei pazienti con HCC in stadio "precoce" ed una selezione dei pazienti in stadio "intermedio", sono candidati alla PEI, alla RFA o alla TACE selettiva.

Nelle linee generali, se si confronta la RFA con la PEI, la prima ha una maggiore capacità di controllo locale della malattia, mentre è dibattuta la capacità di aumentare la sopravvivenza. Nella tabella xx sono indicati gli studi che confrontano le due metodiche.

Tabella 9 Trial controllati randomizzati che confrontano il trattamento con PEI vs RFA

Author and Year (Reference)	Initial CR	Treatment Failure*	Overall Survival (%)		
			1-Year	3-Year	P
Lencioni et al., 2003 (24)					
RFA (n = 52)	91%	8%	88	81	NS
PEI (n = 50)	82%	34%	96	73	
Lin et al., 2004 (25)					
RFA (n = 52)	96%	17%	82	74	0.014
PEI (n = 52)	88%	45%	61	50	
Shiina et al., 2005 (26)					
RFA (n = 118)	100%	2%	90	80	0.02
PEI (n = 114)	100%	11%	82	63	
Lin et al., 2005 (27)					
RFA (n = 62)	97%	16%	88	74	0.031
PEI (n = 62)	89%	42%	96	51	
Brunello et al., 2008 (28)					
RFA (n = 70)	96%	34%	88	59	NS
PEI (n = 69)	66%	64%	96	57	

\*Includes initial treatment failure (incomplete response) and late treatment failure (local recurrence).

CR, complete response; HCC, hepatocellular carcinoma; NS, not significant; PEI, percutaneous ethanol injection; RFA, radiofrequency ablation.

Tabella 10 : sopravvivenze dei pazienti trattati con sola RFA in relazione alla classe Child

Author and Year (Reference)	Patients (Number)	Overall Survival (%)		
		1-Year	3-Year	5-Year
Lencioni et al., 2005 (29)				
Child-Pugh A	144	100	76	51
Child-Pugh B	43	89	46	31
Tateishi et al., 2005 (34)				
Child-Pugh A	221	96	83	63
Child-Pugh B-C*	98	90	65	31
Choi et al., 2007 (35)				
Child-Pugh A	359	NA	78	64
Child-Pugh B	160	NA	49	38
N'Kontchou et al., 2009 (36)				
BCLC resectable†	67	NA	82	76
BCLC unresectable	168	NA	49	27

\*Only 4 of 98 patients had Child-Pugh C cirrhosis.

†BCLC criteria for resection include single tumor, normal bilirubin level (<1.5 mg/dL), and absence of significant portal hypertension.

BCLC, Barcelona Clinic for Liver Cancer; HCC, hepatocellular carcinoma; NA, not available; RFA, radiofrequency ablation.

## - Chemioembolizzazione

La chemio-embolizzazione (TACE, *Transcatheter arterial chemoembolization*) è una procedura di radiologia interventistica.

Si tratta probabilmente dell'argomento maggiormente dibattuto in letteratura per forti contrasti tra studiosi del settore.

Il razionale è dato dal fatto che poiché la vascolarizzazione dell'HCC è arteriosa, mentre quella del parenchima è portale, l'occlusione dell'arteria porta a necrosi del tumore con risparmio del fegato circostante, ciò però, se il nodulo è singolo, ha dimensioni >5 cm o tra 3-5 cm, o in caso di noduli multipli come trattamento palliativo o pre-chirurgico.

Per contro non c'è indicazione se la lesione è ipovascolare, se il soggetto è in classe C di Child, se vi sono shunt artero-venosi, se c'è trombosi portale per cui è carente il flusso portale, se il volume residuo epatico funzionale è > del 40%.

In caso di HCC plurifocale si esegue una chemioterapia + lipiodol che si deposita sulla lesione e vi permane a lungo, ciò trova indicazione per il trattamento prechirurgico, cioè una terapia palliativa per ridurre la velocità di crescita.

Il meccanismo d'azione consiste nell'iniezione di un farmaco chemioterapico emulsionato con mezzo di contrasto oleoso (lipiodol ultrafluido o LUF) nei rami arteriosi afferenti all'HCC cateterizzati selettivamente mediante accesso percutaneo transfemorale.

Essi vengono successivamente embolizzati con particelle di Spongostan che provocano un'occlusione temporanea, venendo riassorbite in circa due settimane.

Il presupposto all'impiego della TACE si basa sull'accumulo selettivo e persistente del LUF nell'HCC, che è vascolarizzato prevalentemente da

rami dell'arteria epatica, contrariamente al parenchima epatico normale che riceve la maggior parte dell'apporto ematico della vena porta. L'impregnazione del tessuto neoplastico da parte dell'emulsione oleosa, consente di ottenere una concentrazione locale del farmaco notevolmente superiore a quella raggiungibile con la chemioterapia sistemica, riducendo gli effetti collaterali, mentre l'azione terapeutica viene potenziata dall'ischemia del tessuto neoplastico provocata dal LUF e dalla successiva embolizzazione.

Negli ultimi anni, numerosi studi clinici randomizzati hanno evidenziato i favorevoli risultati della TACE, senza dimostrare tuttavia un significativo aumento della sopravvivenza rispetto a quella dei pazienti trattati conservativamente.

Attualmente esiste un generale consenso sull'impiego della TACE nei pazienti con HCC e cirrosi non operabile e non trattabile con alcolizzazione e termoablazione, considerate come terapie radicali.

La selezione dei pazienti è tuttavia complicata dalla coesistenza della cirrosi epatica, la cui evoluzione influisce anche sui risultati nonché sulle possibili complicanze della procedura.

Sembra pertanto opportuno impiegare criteri di selezione che considerino, oltre alla stadiazione del tumore, anche quella dell'epatopatia, come quelli adottati dal gruppo di Barcellona.

Secondo questi Autori la TACE è indicata nei pazienti con tumori in stadio B e C, singoli > 5 cm o multinodulari con almeno 3 noduli >3 cm. Sono ritenuti controindicazioni l'età >75 anni, l'epatopatia avanzata con classe C di Child-Pugh, l'encefalopatia, l'ascite refrattaria, l'invasione vascolare, gli shunts portosistemici, il flusso portale epatofugo, le localizzazioni extraepatiche, l'insufficienza renale, la piastrinopenia <50000, l'attività protrombinica <50%.

La TACE è stata impiegata anche come trattamento adiuvante prima del trapianto e della resezione epatica, per controllare la crescita del tumore e prevenire la comparsa di foci latenti, nonché per ridurre neoplasie altrimenti non resecabili.

La sua associazione con l'alcolizzazione percutanea ha inoltre evidenziato una valida azione sinergica, consentendo il trattamento di neoplasie fino ad 8 cm con minori effetti collaterali e con un aumento della sopravvivenza comparabile a quella ottenuta con la resezione chirurgica.

Per quanto riguarda i farmaci chemioterapici ed il loro dosaggio, esiste in letteratura, una grande variabilità: sono stati impiegati la doxorubicina, la mitomicina C, il cisplatino e l'epirubicina, soli o variamente associati. La dose del farmaco e del LUF viene generalmente determinata in base alle dimensioni complessive dei noduli neoplastici, ma anche all'estensione del parenchima trattato ( TACE lobare o segmentaria), nonché ad indici di funzionalità epatica, quali la bilirubinemia.

Esiste un generale consenso sull'opportunità di ripetere la TACE a distanza di tempo variabile, fino ad ottenere la completa devascularizzazione delle lesioni neoplastiche.

L'eventuale persistenza di tessuto neoplastico, generalmente localizzato alla periferia delle lesioni, viene evidenziata dalle metodiche di *imaging* come la TC e/o la RM. Nel recente lavoro di Barcellona la TACE è stata ripetuta dopo due mesi e successivamente ogni sei, con un numero medio di 2,8 procedure /pazienti.

I controlli clinici ed ematochimici sono stati eseguiti ogni tre mesi, quelli di *imaging*, mediante ecografia e TC con mezzo di contrasto, ogni sei mesi (Llovet et al.,2002).

Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia della TACE, evidenziando la riduzione della crescita tumorale con minore incidenza di infiltrazione



vascolare, la necrosi del tessuto neoplastico e la riduzione del livello di alfa-fetoproteina.

In particolare, le tecniche di *imaging* possono evidenziare la riduzione delle dimensioni dei noduli neoplastici, la loro impregnazione da parte del LUF e la percentuale di necrosi del tessuto neoplastico, variabile dal 60% al 100%.

La valutazione comparativa dei risultati è tuttavia ostacolata dalla notevole variabilità dei criteri di selezione dei pazienti e delle modalità di esecuzione. Solo recentemente gli studi di Lo e di Llovet hanno dimostrato un significativo aumento di sopravvivenza nei pazienti trattati, rispetto a quella dei gruppi di controllo (tab.11).

Tab.11 Sopravvivenza a due anni dei pazienti con epatocarcinoma non resecabile trattati con embolizzazione transcateretere.

Autore (anno)	Rx	Pazienti	Sopravvivenza	P
		No	Trattati Controlli	
Trinchet (1995)	TACE	96	38% 26%	Ns
Bruix (1998)	TACE	80	49% 50%	Ns
Pelletier (1998)	TACE	73	24% 25%	Ns
Lo (2002)	TACE	80	31% 11%	=0.002
Llovet (2002)	TACE	75	63% 27%	=0.009

Per quanto riguarda le complicanze della TACE, che comprendono, oltre ad insufficienza epatica, shock settico, colecistiti, ascessi epatici, embolia polmonare, emorragia gastrointestinale e stenosi biliari ischemiche, è

importante sottolineare che la loro incidenza e gravità dipende anche dalla tecnica di esecuzione della procedura.

E' preferibile eseguire una TACE segmentaria o subsegmentaria, che comporta una minore compromissione del parenchima epatico normale e riduce la gravità della sindrome post-embolizzazione.

## **Terapia sistemica**

Dal momento che una elevata percentuale di pazienti affetti da HCC viene diagnosticata in uno stadio avanzato o metastatico, l'utilizzo di terapie localmente ablative risulta essere limitato.

Al paziente viene quindi proposto una terapia sistemica di seguito descritta.

### **- Chemioterapia sistemica**

Il suo ruolo è controverso in quanto l'HCC è generalmente considerato chemioresistente, con la maggior parte dei regimi mono e polichemioterapici, con tassi di risposta che risultano inferiori e le remissioni durevoli non molto frequenti.

Ciò sembra dovuto alla sovraespressione del gene della *multiple drug resistance* (MDR) e del suo prodotto, la p-glicoproteina nell'HCC.

Anche in pazienti ben selezionati, il tasso di risposta ai regimi chemioterapici con agenti singoli (5-fluorouracile, doxorubicina) o con associazioni di farmaci (doxorubicina e cisplatino), è inferiore al 20-30% e spesso uguale a zero.

Ciò nonostante, è probabile che il tasso di risposta alla maggior parte dei trattamenti con farmaci singoli o con combinazioni di farmaci, per quanto basso, possa avere ugualmente un impatto significativo sulla sopravvivenza dei pazienti responsivi.

In definitiva, dunque, la chemioterapia sistemica non dovrebbe essere raccomandata come terapia standard per HCC al di fuori di studi controllati.

#### **- Interferone ed associazioni con interferone**

Gli interferoni-alfa oltre ad avere attività antivirale e antiangiogenica agiscono come immunomodulatori e posseggono quindi una potenziale azione antineoplastica anche sull'epatocarcinoma ed è stato dimostrato che sono in grado di ridurre l'incidenza dell'HCC nei pazienti con pregressa epatite virale, specialmente in quelli con titolo sierico HBV più elevato (Ikeda et al.,1998).

L'associazione di farmaci comprendente il cisplatino HIA in infusione ed IFN-alfa sistemico può essere utilizzato come trattamento palliativo in pazienti affetti da epatocarcinoma che presentano un coinvolgimento vascolare o metastasi extraepatiche (Chung et al.,2000).

#### **- Sviluppi futuri: gli agenti angiogenetici**

L'angiogenesi è il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni necessario per la crescita tumorale.

Diverse molecole, con proprietà regolatorie in senso positivo e negativo, sono coinvolte nel processo di angiogenesi.

Il fattore di crescita endoteliale (VEGF) ed il fattore di crescita fibroblastico basale (bFGF) sono i mitogeni più specifici e potenti delle cellule endoteliali.

L'HCC è caratterizzato da un'angiogenesi patologica considerevole, potenzialmente correlabile ai livelli aumentati del siero di VEGF e bFGF che sono stati anche associati ad una prognosi peggiore in alcuni studi. Recentemente, Chow (et al.,1997) hanno mostrato che l'espressione di VEGF è correlata, in maniera significativa, con un più alto indice

proliferativo ed una evidenza ultrasonografica della trombosi della vena porta.

Tuttavia, l'espressione di VEGF non è stato correlato con il profilo biochimico del fegato, con il livello dell'AFP, col grado istologico, col sesso del paziente o con lo stadio clinico della cirrosi.

Gli studiosi hanno quindi concluso che l'espressione di VEGF può caratterizzare la progressione verso una maggiore proliferazione nell'epatocarcinogenesi.

I nuovi farmaci con meccanismo antiangiogenico sono molto promettenti ed è probabile che in associazione ai farmaci classici riescano a migliorare il trattamento di questa neoplasia.

### **SORAFENIB**

Il Sorafenib (Nexavar, Bayer HealthCare Pharmaceuticals-Onyx Pharmaceuticals) è una molecola di piccole dimensioni che inibisce la proliferazione e l'angiogenesi tumorale ed aumenta il tasso di apoptosi in una vasta gamma di modelli di neoplasia (Wilhelm SM 2004).

La sua azione si estrinseca mediante l'inibizione delle serin-treonin chinasi Raf-1 e B-Raf e dell'attività tirosin chinasi dei recettori 1, 2 e 3 del VEGF e del platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ).

Il signaling cellulare mediato dai pathway di Raf-1 e del VEGF è stato implicato nella patogenesi molecolare del carcinoma epatocellulare rappresentando la premessa scientifica per l'impiego del sorafenib nella pratica clinica (Ito Y 1998; Villanueva A 2007; Calvisi DF 2006; Semela D 2004).

Negli studi preclinici il sorafenib ha mostrato di possedere un'attività anti-proliferativa nelle linee cellulari di epatocarcinoma, di ridurre l'angiogenesi tumorale e di aumentare il tasso di apoptosi delle cellule tumorali in un modello murino con impianto di epatocarcinoma umano (Liu L 2006).

I risultati di uno studio di fase 2 non controllato in cui sono stati arruolati 137 pazienti con HCC avanzato in classe A o B di Child-Pugh hanno per la prima volta evidenziato che il sorafenib possa avere un effetto terapeutico in questa fase avanzata di malattia.

Infatti il trattamento con sorafenib ha portato ad una mediana di sopravvivenza globale (overall survival OS) di 9.2 mesi e ad una mediana di time to progression di 5.5 mesi (Abou-Alfa GK 2006).

Alla luce di questi promettenti dati preliminari è stato successivamente condotto uno studio di fase 3, randomizzato, controllato ed in doppio cieco che ha preso il nome di studio SHARP.

In questo studio multi-centrico sono stati arruolati 602 pazienti con HCC avanzato, che non erano mai stati trattati con terapie sistemiche, e quindi assegnati in maniera random a ricevere il sorafenib (alla dose di 400 mg due volte al giorno) o il placebo.

Gli obiettivi primari dello studio erano la sopravvivenza globale (OS) ed il tempo di progressione (time to progression).

Gli obiettivi secondari includevano il tempo di progressione radiologica (time to radiologic progression) ed il profilo di sicurezza del farmaco.

Un dato da sottolineare è che dopo la seconda analisi ad interim dei dati lo studio SHARP è stato interrotto.

La OS infatti era risultata essere 10.7 mesi nel gruppo trattato con sorafenib e 7.9 mesi nel gruppo con placebo. (A)

Non è stata riscontrata differenza statisticamente significativa tra i due gruppi in termini di mediana di tempo di progressione (4.1 mesi vs 4.9), mentre la mediana del tempo di progressione radiologica è risultata essere di 5.5 mesi nel gruppo sorafenib vs 2.8 mesi del gruppo placebo (Josep M. Llovet 2008). (B)

## **Terapia chirurgica**

### **- Resezione**

La chirurgia nelle forme della resezione o del trapianto rappresenta il trattamento d'elezione costituendo il cosiddetto *gold standard* rispetto a cui le altre modalità di trattamento debbono essere paragonate.

L' OLT (*Orthotopic Liver Transplantation*) , tuttavia, presenta non pochi limiti costituiti dalla scarsità di organi disponibili, dai lunghi tempi di attesa in lista, con inerente rischio di avanzamento di malattia, dalle complicanze proprie del trapianto e della terapia immunosoppressiva, nonché dalle problematiche relative alla recidiva di malattia neoplastica e virale post-trapianto.

Perfino per i pazienti che corrispondono rigorosamente ai criteri di Milano, il rischio di recidiva di malattia neoplastica a 5 anni è compreso tra il 10% ed il 15% e principalmente correlato con la presenza di satellitosi neoplastica microscopica nel fegato nativo.

Per tali ragioni, la resezione epatica continua a rivestire un ruolo fondamentale nell'approccio terapeutico all'EC.

La chirurgia resettiva a volte presenta numerosi limiti e cioè tassi di morbilità, che appaiono strettamente proporzionali all'estensione della resezione ed allo stato di compenso funzionale preoperatorio secondo la classificazione di Child-Pugh, e recidiva di malattia.

La mortalità post-operatoria precoce (entro 30 giorni) è compresa tra il 3,5% ed il 21% in una revisione delle maggiori casistiche internazionali comprendenti almeno 50 pazienti (media 10,6 = 5,9%) ed aumenta proporzionalmente all'estensione della resezione, alla presenza di cirrosi, all'eziologia della cirrosi (con un aumento per la cirrosi alcolica e quella HCV-correlata).

Le cause di morte sono principalmente rappresentate prevalentemente da ascite e da insufficienza epatica acuta, sepsi o emorragia digestiva.

La morbilità operatoria è compresa tra il 16% ed il 61% (media 38,5 = 15%) e rappresentata prevalentemente da ascite e da insufficienza epatica transitoria.

Nel medio e lungo termine la recidiva di malattia neoplastica rappresenta

la causa di decesso del 74% dei pazienti cirrotici sottoposti a resezione epatica per EC con intento curativo e la recidiva intraepatica di EC interessa dal 52% al 74% dei pazienti resecati, a seconda della lunghezza del periodo di follow-up.

Il tasso globale di sopravvivenza a 5 anni nelle maggiori casistiche europee appare in media del 32,2%, mentre il tasso di sopravvivenza a 5 anni libero da malattia è in media del 25,8%.

I fattori prognostici associati con favorevoli tassi di sopravvivenza globale sono rappresentati da assenza di cirrosi, presenza di buon compenso funzionale (Child A) nei pazienti cirrotici, bassi livelli preoperatori di alfa-fetoproteina (AFP), diametro del tumore inferiore ai 3 cm, assenza di satellitosi, grado di differenziazione buono o moderato, assenza di invasione vascolare, presenza di capsula peritumorale e margine di resezione indenne.

I fattori prognostici associati con assenza di recidiva tumorale sono lo stadio di Child, i livelli preoperatori di AST e ALT, le dimensioni ed il numero di noduli tumorali, l'assenza di satellitosi, i margini di resezione indenni, l'assenza di invasione vascolare e l'eventuale chemio-embolizzazione preoperatoria.

### **La resezione dell'EC precoce**

La prognosi precoce sottoposta a trattamento con intento curativo appare assai più favorevole di quanto non generalmente percepito (tab.12)

Tab.12. Resezione chirurgica dell'epatocarcinoma in cirrosi: correlazione tra sopravvivenza e volume del tumore (Arii et al.,2000).

Stadio	N. pazienti	Sopravvivenza ad 1 anno	Sopravvivenza a 5 anni
Stadio I, EC < 2cm	1318	96%	72%
Stadio I, EC 2-5cm	2722	95%	58%
Stadio II, EC < 2cm	502	92%	55%
Stadio II, EC 2-5 cm	1548	95%	58%

Oggi, l'introduzione di programmi di screening per l'EC nei pazienti affetti da cirrosi consente di diagnosticare molte neoplasie in fasi precoci rispetto al passato.

In tal modo, sempre maggiore è il numero di pazienti che giungono alla diagnosi in fasi asintomatiche o paucisintomatiche di malattie che possono avvantaggiarsi dell'intero spettro di opzioni chirurgiche.

L'estensione della resezione epatica eseguibile in pazienti cirrotici non è definibile a priori, in quanto correlata alla gravità della malattia cirrotica (grado di fibrosi), alla sua eziologia ed al compenso funzionale pre-operatorio.

In generale, in presenza di una funzione epatica conservata (Child-Pugh A), il paziente può essere sottoposto ad epatectomia regolata se la quantità di parenchima da asportare è ridotta.

Si consiglia di non asportare una porzione di parenchima superiore al 20%. Numerosi autori consigliano di eseguire una resezione limitata segmentaria- subsegmentaria.

La semplice tumorectomia è da sconsigliare, in quanto essa non garantisce un sufficiente margine indenne tra piano di resezione ed il parenchima epatico adiacente.

I tassi di sopravvivenza conseguibili con la resezione chirurgica sono



sovrapponibili a quelli del trapianto secondo i criteri di Milano.

### **Il trattamento delle recidive**

Il 50% circa delle recidive di EC in pazienti già sottoposti a resezione si presenta nelle forme di un nodulo solitario o di neoplasie oligonodulari (<3). I tassi di morbi-mortalità operatoria in tali pazienti sono simili a quelli osservati per i pazienti sottoposti a resezione primaria, purché siano rispettati i medesimi criteri di selezione (stadio precoce BCLC) ed i tassi di sopravvivenza appaiono del 30-40% a 5 anni.

Nel caso in cui la recidiva sia multifocale o il paziente si trovi in stadi intermedi-avanzati di malattia secondo la classificazione BCLC o la localizzazione non consente un reintervento con margini indenni e bassa morbidità, il paziente può essere avviato a trattamento loco-regionale mediante chemio-embolizzazione, alcolizzazione o radiofrequenza, sulla base di una selezione caso-per-caso.

Un approccio recentemente descritto per tale categoria di pazienti con recidiva di EC post-resezione primaria è rappresentato dal cosiddetto OLT di salvataggio (salvage OLT).

Il razionale di tale opzione terapeutica risiede nella considerazione che alcuni pazienti selezionati possono, all'atto della recidiva, presentare ancora i criteri di trapiantabilità. Recentemente, Belghiti et al. (2003) hanno riportato che la sopravvivenza a lungo termine di 18 pazienti sottoposti ad OLT dopo resezione chirurgica per recidiva di EC è sovrapponibile a quella di 70 pazienti sottoposti a OLT primario per EC.

A differenza di quanto riportato da Belghiti, uno studio analogo di Adam et al. (2003) su 17 pazienti riferisce tassi di mortalità operatoria e di sopravvivenza a lungo termine assai più sfavorevoli per i pazienti sottoposti ad OLT, i pazienti affetti da ripresa di malattia dopo resezioni

appare ancora lungi dall'essere risolta e non esiste allo stato attuale alcuna evidenza conclusiva a supporto di tale pratica.

### **La resezione dell'EC di grandi dimensioni**

Nonostante i favorevoli risultati ottenuti dalla resezione chirurgica nei pazienti della classe precoce della classificazione BCLC, i pazienti con EC di grandi (>5 cm) e molto grandi (>7 cm) dimensioni ed in compenso funzionale (Child A) si avvantaggiano della chirurgia in quanto assai scarse sono le possibilità di trattamento alternativo.

I dati di diversi studi sembrano supportare l'evidenza che in casi di buon compenso funzionale, la chirurgia rappresenti l'unica possibilità di trattamento per i pazienti con EC di grandi dimensioni.

La presenza di trombosi portale macroscopica, sia pure non costituendo una controindicazione assoluta alla procedura chirurgica e consentendo la realizzazione di una procedura radicale, è accompagnata da risultati meno favorevoli.

### **La resezione dell'EC nell'ambito di un approccio multi-modale**

I pazienti con malattia oligonodulare ( $\leq 3$ ) della classe precoce della classificazione BCLC e che secondo tale protocollo sono candidabili esclusivamente a procedure loco - regionali possono avvantaggiarsi, caso per caso, della combinazione della strategia chirurgica con le moderne opzioni loco-regionali, quali l'ablazione per radiofrequenza (Radiofrequency ablation, RFA), alcolizzazione o chemio-embolizzazione.

### **Trapianto e criteri di selezione**

Il trapianto di fegato si è dimostrato un'efficace terapia dell'epatocarcinoma (EC) i cui buoni risultati dipendano, in gran parte, da

un'adeguata selezione dei pazienti.

Dal 1998, per la selezione dei pazienti con EC al trapianto di fegato, vengono largamente utilizzati, a livello internazionale, i Criteri di Milano (Mazzaferro et al., 1996).

Tali criteri indicano che dovrebbero essere accettati come candidati per trapianto di fegato solo pazienti con EC che, allo studio per immagini, risultino avere:

- nodulo singolo  $\leq 5$  cm.
- non più di 3 noduli di dimensioni ciascuno  $\leq 3$  cm.

In accordo ai suddetti criteri, le indicazioni al trapianto di fegato sono:

- EC non resecabile in paziente con cirrosi epatica di qualunque eziologia, (ad esempio: nodulo, la cui resezione sacrificerebbe il lobo destro esponendo il paziente ad alto rischio di insufficienza epatica post- resettiva).
- EC non resecabile in assenza di malattia di fegato;
- EC in paziente con cirrosi epatica e ridotta funzione parenchimale;
- EC multifocale.

Le controindicazioni assolute al trapianto di fegato, oltre a quelle valide per le altre indicazioni (Carithers, 2000), sono costituite dalla presenza di:

- invasione macroscopica della vena porta e delle sovraepatiche;
- malattia extra-epatica.

La diagnosi iniziale di EC deve essere confermata da due studi di immagini (ecografia, angiografia, TC o RM) o da uno studio per immagini positivo per lesione ipervascolare, in presenza di alfa-fetoproteina  $>400$  mg/L (Bruix et al., 2001).

Una volta posta la diagnosi, è necessario effettuare TC del torace e

Scintigrafia ossea per escludere localizzazioni extra-epatiche.

Dopo l'inserimento in lista d'attesa per trapianto, la TC addome o RM devono essere ripetute ogni 3 mesi, la TC torace ogni 6 mesi, qualora le precedenti indagini dimostrassero progressione di malattia, la scintigrafia ossea.

I criteri di Milano sono stati recentemente incorporati nell' *America Liver tumor Study Group Modified Tumor-Node-Metastasis* (TNM) staging per il trapianto di fegato, perchè il tradizionale pTNM non aveva potere prognostico tale da consentire la stratificazione dei pazienti secondo il rischio di ripresa dell'EC nel post-trapianto.

I nuovi criteri di Milano sono:

**T1**  $\leq 1,9$  cm

**T2** un nodulo 2-5 cm, 2 o 3 noduli, almeno uno  $>$  di 3 cm;

**T3** un nodulo  $> 5$  cm, 2 o 3 noduli almeno uno  $\geq 3$  cm;

**T4a** quattro a più' noduli di qualunque diametro;

**T4b** qualsiasi T con invasione vascolare intraepatica (vena porta/sovrappatica).

Dal 1998 al 2002 la classificazione UNOS (United Network of Organ Sharing) ha stratificato i pazienti con insufficienza epatica cronica nelle tre classi: 2A, 2B e 3, stabilendo la priorità di allocazione d'organo sul CPT (Child-Pugh-Turcotte) score e sul tempo d'attesa in lista (United Network for Organ Sharing: Annual report and the OPTN waiting list).

I pazienti con EC, classificati negli stadi T1 e T2 secondo i criteri di Milano, rientravano nella categoria 2B.

Con questo sistema di allocazione, il rischio di drop out per i pazienti con EC era intorno al 40% per anno.

Nel Febbraio 2002, con l'evidenza della limitata utilità del CPT score nell'indicare la severità di malattia e nel discriminare i pazienti più gravi, L'UNOS ha stabilito la priorità d'allocazione degli organi per tutti i potenziali candidati nella lista d'attesa, utilizzando il MELD (Model for end Stage Liver Disease). Il MELD è un sistema a punteggi da 6 a 40, calcolato sui valori dell' International Normalized Ratio, INR, creatinina e bilirubina, capace di predire la mortalità a tre mesi utilizzando variabili standardizzate, facilmente riproducibili ed oggettive.

Molti dei pazienti con EC, al momento dell'inserimento in lista di attesa, hanno funzionalità epatica conservata e basso rischio di mortalità secondo il MELD calcolato sui parametri di laboratorio (Meld clinico).

In Italia, a conclusione dei lavori della Commissione sul trapianto di fegato dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF), il sistema MELD è stato indicato come criterio da utilizzare per la gestione delle liste d' attesa.

## **Risultati**

I dati attualmente disponibili evidenziano che la sopravvivenza a 5 anni di pazienti con EC, che rientrano nei criteri di Milano, è superiore al 70% con un tasso di recidiva, nello stesso periodo, inferiore al 15% (Tab.9.4.2).

Tabella 13

	N di pazienti	Sopravvivenza annuale	
		1 anno	5 anni
Mazzaferro et al. 1996	48	84	74
Llovet et al. 1996	58	84	74
Bismuth et al. 1999	45	82	74
Llovet et al 1999	79	86	75
Intentino to treat analysis	87	84	69
Jonas et al 2001	120	90	71
Yao et al 2001	64	87	73

I buoni risultati ottenuti con il trapianto, rispettando i criteri di Milano, hanno spinto alcuni Centri a valutare la possibilità di trapiantare pazienti con tumore a stadi più avanzati.

Dati disponibili in letteratura indicano l'opportunità di rivedere i criteri di trapiantabilità per EC, anche tenendo conto delle nuove e più accurate tecniche di diagnostica per immagini. L'espansione oltre i criteri di Milano nella pratica clinica dovrebbe comunque avvenire nel contesto di studi controllati.

Dall'analisi multivariata di Iwatsuki et al. (2000), i fattori che più accuratamente predicono la sopravvivenza libera da EC, dopo trapianto, sono la distribuzione lobare, la dimensione del tumore e l'invasione vascolare. Anche il grado istologico sembra influenzare negativamente la prognosi. Un discreto numero di contributi scientifici dimostrano che il *grading* e l'invasione vascolare microscopica rappresentano markers diretti dell'aggressività biologica tumorale e quindi del rischio di ricorrenza post trapianto rispetto ai criteri di Milano.

Di questi 2 parametri, solo il *grading* è potenzialmente valutabile preoperatoriamente mediante agobiopsia ecoguidata.

## **Down-staging e trattamento dell'EC in lista d'attesa**

Una volta che un paziente con EC sia stato inserito in lista d'attesa per trapianto, sorge l'esigenza di rallentare la progressione del tumore evitando così il superamento dei criteri di trapiantabilità nel periodo di attesa.

Una metanalisi del 2003 del gruppo di Barcellona ha evidenziato l'efficacia della chemio-embolizzazione intrarteriosa (TACE/TAE) nel prolungare la sopravvivenza dei pazienti con EC non resecabile (sopravvivenza a 2 anni del 41% versus il 27% in assenza di trattamento), (Llovet, Bruix 2003).

Questa evidenza rappresenta la base per la pratica clinica, che vede numerosi Centri trattare pazienti con EC in attesa di trapianto mediante trattamento intrarterioso dell'arteria epatica.

La TACE può essere utilizzata anche per trattare pazienti con EC più avanzati dei criteri di Milano, con l'obiettivo di ridurre le dimensioni del tumore (down-staging) riportandolo all'interno di tali criteri e quindi della trapiantabilità. Il gruppo di Milano ha recentemente descritto l'efficacia e la sicurezza della termoablazione nel trattamento di pazienti con EC in attesa di trapianto di fegato e questa è un'altra possibile metodica per perseguire l'obiettivo di ritardare la progressione o ottenere il down-staging del tumore.

Come affermato da Bruix (2003) tuttavia, il vero problema è quello di stabilire quali siano i criteri di esclusione minimi (droup-out) dei pazienti in lista.

## **Il trapianto da donatore vivente (LDLT)**

Nonostante recentemente si siano affermate strategie e tecniche, quali l'uso di donatori marginali e lo split liver, per aumentare la disponibilità d'organo, la carenza rimane grave (Gridelli et al., 2000).

Questo ha portato a considerare sempre più spesso la possibilità di

ricorrere al trapianto di fegato da donatore vivente.

E' ampiamente dimostrato che, i risultati migliori del trapianto da donatore vivente sono ottenibili in pazienti con funzionalità epatica ancora discretamente conservata, quali appunto i pazienti con EC.

Il trapianto da donatore vivente è un'alternativa proponibile a circa il 20% dei pazienti candidati al trapianto.



## **PARTE SPERIMENTALE**

***Obiettivo dello studio:*** valutare quali segni clinici, di laboratorio o strumentali possano permettere di predire una maggiore sopravvivenza in una popolazione di pazienti trattati.

### ***Materiali e Metodi***

Sono stati inseriti nello studio tutti pazienti con diagnosi di HCC effettuata dall' 1/1/2005 al 31/5/2010. I pazienti sono stati divisi in due gruppi: a) proveniente dal nostro ambulatorio di malattie croniche di fegato e sottoposti ad un programma di sorveglianza per la diagnosi precoce dell'epatocarcinoma su cirrosi, b) pazienti con prima diagnosi di HCC e non sottoposti a programma di screening, provenienti sia dal nostro ambulatorio che dalla nostra Divisione di Medicina Interna ed Epatologia.

### ***Valutazione dei pazienti***

Durante lo studio tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un esame obiettivo, a test di laboratorio per la valutazione della funzionalità epatica quali il dosaggio delle transaminasi, fosfatasi alcalina, bilirubinemia, elettroforesi proteica, attività di protrombina, AFP; era stata ricercata l'eziologia tramite dosaggio di: HBsAg, antiHBs, antiHBc, antiHCV, ferritina, sideremia, transferrina.

Nei pazienti risultati negativi è stato eseguito il dosaggio di autoanticorpi: ANA, AMA, ASMA, anti-LKM1, in quelli affetti da cirrosi con eziologia criptogenetica si è dosata l'insulinoresistenza con metodica HOMA (Haffner SM, Diabetes care 1996).

E' stato calcolato lo score di Chil-Pugh, dal punto di vista oncologico, i pazienti sono stati studiati secondo le classificazioni BCLC e CLIP (Pugh RN 1973).

**Diagnosi di cirrosi:** la diagnosi di cirrosi epatica veniva posta sulla scorta di un precedente esame istologico e di inconfutabili dati clinici, di laboratorio associati a segni endoscopici e/o ecografici di ipertensione portale e all'ecografia di margini epatici irregolari .

**Diagnosi di epatocarcinoma:** la diagnosi di epatocarcinoma è stata posta secondo le linee guida della AASLD (Bruix et al, Hepatol 2005).

**Criteri di inclusione:**

Pazienti affetti da HCC di recente diagnosi (meno di 2 mesi). Si utilizzeranno i dati dei pazienti già presenti presso il nostro ambulatorio e trattati nei precedenti 3 anni e che rientrino nei criteri di inclusione.

**Criteri di esclusione**

Pazienti con età superiore ad 80 anni,

Pazienti con anamnesi positiva per neoplasia.

Pazienti con classe Chil-Pugh  $\geq$  B9

Valutazione della sopravvivenza

**Sopravvivenze**

La sopravvivenza globale è stata definita come l' intervallo tra il trattamento e la morte o la data di della più recente visita di follow-up che comunque non era inferiore a

tre anni dal trattamento. Pertanto Il calcolo delle curve di sopravvivenza è stato limitato ai pazienti che sono stati sottoposti a terapia dal 2/1/2005, al 31/12/2007.

**Ecografia:** l'esame ecografico è stato eseguito con Philips HDI 5000, con sonda convex a larga banda 2-5 MHz al mattino e a digiuno.

### TC e RM

La diagnosi TC e RM dell'HCC "tipico" veniva posta quando il nodulo presentava ipervascolarizzazione precoce con wash-out venoso (Figura 18).

	CEUS	CECT	CEMRI (GD-Chelates)	CEMRI (SPIO), normally without dynamic scans
Non-enhanced				
Arterial				
Portal venous				
Equilibrium				

Figura 18: *diversi pattern di "enhancement" di HCC tipico con le diverse metodiche di imaging. da Saar B et al. Liver International 2008*

### Biopsia

La biopsia è stata eseguita con ago sottile 21 G (Surecut, Hospital Service), sotto traccia ecoguidata (Figura 20).

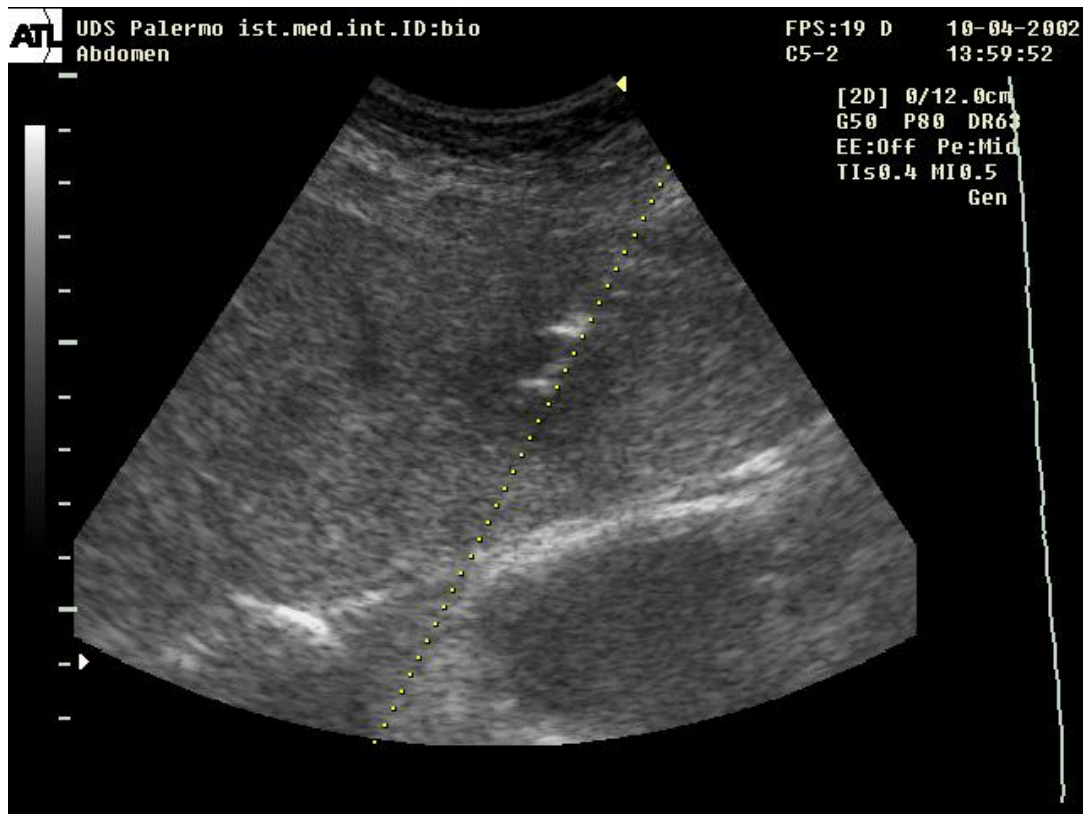


Figura 20

### **Stadiazione**

I pazienti sono stati stadiati secondo la Classificazione BCLC di Barcellona (Llovet JM et al, J Natl Cancer Inst 2008) e secondo la classificazione CLIP (The Cancer of Liver Italian Programme (CLIP) 2000). Veniva anche valutata la stadiazione clinica secondo Child Pugh (Pugh 1973).

### **Trattamento**

Per la scelta del trattamento sono state seguite le indicazioni delle linee guida AASLD 2005 (Hepatology. 2005 Nov;42(5):1208-36.). Tuttavia la loro osservanza è avvenuta nel 80 % dei casi in relazione alla profondità della lesione, alla presenza di vasi accanto alla neoplasia e alle condizioni del paziente che consigliavano scelte diverse.

## **RFA**

Tutti i trattamenti sono stati effettuati solo su pazienti ricoverati sotto sedazione. La RFA è stata eseguita sotto guida ecografica con un generatore di 150 W (modello 1500 L; RITA Medical System, Mountain View, California), collegato ad un ago di 15 - 14-gauge e con un elettrodo a punta di 2,0 cm di lunghezza (espandibile attraverso 7-9 ganci).

Questo l'elettrodo è stato posto al centro della lesione, la temperatura è stata mantenuta nella punta dell'ago a 100 °C o più per 10-12 min. Quando necessario a causa delle dimensioni del tumore, l'ago è stato inserito al massimo tre volte per seduta.

## **TACE**

Veniva eseguita un'arteriografia superselettiva, l'embolizzazione è stata effettuata con l' iniezione di una miscela di contrasto radiologico e frammenti Gelfoam fino a quando il flusso si fermava. E' stata somministrata un'emulsione di doxorubicina (Pharmacia- Upjohn,) e lipiodolad, ad una dose adeguata per le concentrazioni di bilirubina, prima dell'embolizzazione.

## **Risposta alla terapia**

Sono stati adoperati i criteri consigliati dalla Consensus Conference di Barcellona (. J Hepatol. 2001 Sep;35(3):421-30.)

## **Follow-up**

I pazienti trattati con terapie loco-regionali sono stati sottoposti routinariamente ad un esame TC o RM con mdc ad un mese dall'intervento. Qualora vi erano segni di necrosi completa veniva eseguita un'ecografia a tre mesi e un successivo controllo TC o RM a 6 mesi per 3 anni.

Nel caso di persistenza di malattia o di recidive il paziente veniva risottoposto ad intervento ablativo, RFA o TACE, in relazione alle condizioni cliniche e all'imaging del paziente.

I pazienti resecati eseguivano ecografie di controllo nei primi sei mesi e successivamente un controllo TC o RM ad 8 mesi.

I pazienti sottoposti a trapianto di fegato seguivano il follow-up secondo i protocolli internazionali già standardizzati.

### ***Analisi statistica***

Sono stati usati il t di Student, il Mann-Withney U test, il Fisher exact test, il tests del  $\chi^2$  e del  $\chi^2$ MH e il coefficiente per ranghi di Spearman quando appropriati. Alcune variabili che potevano essere associate alla sopravvivenza quali, eziologia della cirrosi, ascite, presenza di varici esofagee, Child-Pugh, invasione vascolare, recidiva locale e a distanza, Diabete mellito AST, ALT, Albumina, Bilirubinemia, valori di AFP, venivano inclusi in un modello di analisi univariata e la loro predittività di rischio era calcolata con la stima dell odds ratio (OR) e degli intervalli di confidenza al 95 % (IC 95 %). Le variabili continue venivano divisi in due gruppi i cui cut-off sono indicati nelle tabelle. Altre variabili potenzialmente associate alla sopravvivenza come CLIP, BCLC, età venivano correlate ai mesi di sopravvivenza con il calcolo del coefficiente per ranghi di Spearman. Le variabili significativamente associate all'analisi univariata alla sopravvivenza, venivano inserite in una analisi multivariata usando lo stepwise Cox proportional hazard model. L'overall survival e stata calcolata con le curve di Kaplan Meier. La differenza tra le

curve di sopravvivenza è stato valutata con il log rank test.

### ***Risultati***

Dal 2/1/2005 al 31/12 2010 sono state diagnosticate 115 neoplasie epatiche su cirrosi. In tabella 14 sono riportati i dati demografici, l'etiologia, i livelli di AFP, la stadiazione dei pazienti in studio.

Il 56 % di essi veniva diagnosticato durante il programma di sorveglianza.

In tabella 15 sono riportati i dati demografici, le eziologie e le stadiazioni dell'intera popolazione suddivisa in relazione alla sorveglianza. I pazienti in screening avevano una stadiazione significativamente migliore (CLIP:  $P < 0.001$ , BCLC:  $P < 0.005$ ) livelli di AFP statisticamente più bassi ( $P < 0.001$ ) e numero di lesioni uninodulari superiori ( $P < 0.01$ ).

Non vi erano differenze statisticamente significative per le invasioni vascolari.

Nella figura 19 sono messe a confronto le curve di sopravvivenza a tre anni dei pazienti con e senza screening. Si nota bene come la sopravvivenza dei pazienti sottoposti a screening sia significativamente migliore ( $P < 0.001$ ).

I pazienti arruolati nel triennio in studio (2005-07) per la valutazione della sopravvivenza erano 61, di questi 54 (88 %) erano eleggibili per un trattamento di resezione, OLT, o ablazione (RFA o TACE). Di essi 10/54 (18.5%) non hanno accettato la terapia e non sono stati valutati nell'analisi. Pertanto sono stati valutati solo 44 pazienti. Soltanto in

2/44 (4.5 %) la diagnosi è stat istologica.

Nella tabella 16 sono riportati la risposta completa, le recidive locali a distanza e le sopravvivenze a 1 e a tre anni dei pazienti sottoposti a diversi tecniche terapeutiche. Se si esclude il gruppo resezione/OLT si evince che non vi sono sostanziali differenze tra di esse in termini di risposta, di necrosi completa, di recidiva locale, di sopravvivenza.

Nella figura 20 vengono riportate le curve di sopravvivenza secondo Kaplan Meier a tre anni esaminate nei pazienti trattati solo con TACE e con RFTA. Non esistono differenze statisticamente significative ( $P=0.325$ ), anche se la curva dei pazienti con TACE ha un trend migliore.

Nella figura 21 è riportata la curva di sopravvivenza secondo Kaplan Meier di tutti i pazienti trattati con OLT, resezione, TACE, RFA..

La media stimata di sopravvivenza a tre anni è di mesi 31.5 (IC 95 % 28.1-34.5).

In tabella 16 e 17 sono riportate i risultati dell'analisi univariata. In particolare, stadi più severi di Classe Child, BCLC, CLIP, ipoalbuminemia, presenza di ascite o di multinodularietà alla diagnosi e comparsa di nuove lesioni neoplastiche dopo il trattamento, condizionano negativamente la prognosi di questi pazienti. Nessuna significatività si è trovata per le altre variabili esaminate: età, HCV, HBV, Alcool, coinfezione (HCV+HBV), eziologia criptogenetica, presenza di varici esofagee, attività di protrombina, dimensione delle neoplasie uninodulari, recidiva locale, AST, ALT, Gamma GT,



Bilirubinemia, AP.

All'analisi multivariata con il modello di sopravvivenza di Cox le variabili che risultavano fattori prognostici per la sopravvivenza erano la Classe Chil-Pugh ( $P < 0.0001$ ), il BCLC ( $P > 0.0001$ ) e comparsa di nuovi noduli neoplastici (0.05) (tabella 18).

Discussione

L'epatocarcinoma su cirrosi è il sesto tumore al mondo in ordine di frequenza e la terza causa di morte tra le neoplasie. La sua frequenza è destinata nel futuro ad incrementare, a causa dell'infezione da HCV avvenuta negli scorsi decenni e che nei prossimi anni determinerà un aumento delle cirrosi.

I programmi di sorveglianza sicuramente possono permettere una diagnosi più precoce rispetto al passato e quindi garantire maggiori possibilità terapeutiche (Bolondi L 2001, Soresi M, 2010). Alcuni studi pur segnalando una riduzione della mortalità rispetto a 20 anni fa, sottolineano che essa è ancora elevata (Ikai I Cancer 2004) .

Esistono come già detto varie strategie terapeutiche, le linee guida EASL e AASLD negli ultimi 10 anni hanno cercato di mettere ordine nell'ambito dei diversi trattamenti. Tuttavia per vari motivi la terapia dell'HCC non è sempre chiaramente standardizzabile, essa infatti dipende da diverse componenti: estensione della neoplasia, stato di funzionalità epatica e evoluzione verso la multinodularietà.

La resezione rimane tutt'ora nelle forme di HCC early l'opzione di prima scelta (EASL 2001, AASLD 2005 e 2010). Tuttavia questo

trattamento non sempre è il migliore, infatti bisogna tener conto della possibilità di un peggioramento della funzionalità epatica residua, che può essere responsabile della morte del paziente.

Negli HCC che rientrano nei così detti criteri di Milano (Mazzaferro V 1996) , sicuramente l'OLT è una delle altre opzioni di prima scelta, tuttavia i pochi organi a disposizione limita questa scelta.

Le terapie ablative soprattutto RFA, PEI e TACE, rimangono oggi quelle di più frequente e diffuso uso, tra di esse la TACE trova una maggiore applicazione nel controllo della neoplasia dei pazienti in lista d'attesa per OLT e nel caso di down-staging pre trapianto.

Qualsiasi terapia deve tener conto di tre fattori che condizionano la storia naturale dell'HCC: le dimensioni della neoplasia, il rischio dell'evoluzione multinodulare, lo stato di funzionalità epatica.

Sul primo come già detto i programmi di sorveglianza sono utili, sul secondo si può far poco, è infatti l'HCC una malattia d'organo nella quale la sottostante cirrosi ha un ruolo rilevante nella carcinogenesi; forse studi istologici in un futuro non prossimo ci potranno dare indicazione. Sul terzo punto molti studi sono stati compiuti senza una chiara conclusione.

I risultati sui fattori predittivi di sopravvivenza dei pazienti con HCC sono spesso molteplici ed in contrasto tra loro.

Alcuni indicano la bilirubinemia, altri l'ascite o le varici esofagee. Gli stessi staging BCLC, CLIP, CUPI , GRECH, Okuda Child-Pugh, indicati dalle linee guida o dai vari gruppi di studio che li

propongono, non sono in grado di predire in maniera accurata il rischio di sopravvivenza. La causa di questi dati contrastanti trova la sua spiegazione nel fatto che ciascuno staging valuta in maniera diversa il paziente e nessuno di essi comprende in sé tutte le componenti che condizionano la sopravvivenza dell'HCC su cirrosi: la funzionalità epatica, il grado d'ipertensione portale, l'estensione della neoplasia e soprattutto la sua potenziale multinodularietà.

Nel contesto di tale panorama contrastante, noi abbiamo voluto valutare quali possano essere i fattori di rischio che condizionino la sopravvivenza dei pazienti con HCC trattati con diverse modalità.

I nostri dati dimostrano innanzitutto che il programma di sorveglianza migliora sicuramente la sopravvivenza dei pazienti come mostrato nella figura 19.

Tale effetto è dovuto a nostro parere a due componenti tra loro correlate: il primo è legato alla diagnosi della neoplasia in uno stadio meno avanzato, come dimostrato dalla presenza di un maggior neoplasie monofocali. Il secondo è conseguenza del primo: l'epatocarcinoma viene rilevato più frequentemente in una fase in cui non ha condizionato ancora il livello di funzionalità epatica tant'è vero che i pazienti in sorveglianza sono in una classe Child-Pugh meno severa.

Va, comunque, ricordato che a volte lo screening può fallire la diagnosi precoce per diversi motivi: la presenza di un nodulo perivasale che infiltra precocemente la vena porta nei suoi rami

periferici, una neoplasia che insorge in segmenti sottodiaframmatici, mal visibili in ecografia e che sfugge alla diagnosi ultrasonografica precoce, le rare, ma aggressive, forme di HCC infiltrante, che spesso oltre che all'ecografia sfuggono anche nelle fasi precoci alla diagnosi TC (Kajate S. Am. J. Surg. Pathol. 2010).

IL limite principale del nostro studio nel valutare i fattori di sopravvivenza è costituito dal numero limitato di casi e dalla necessità di stratificarli in 5 tipologie terapeutiche diverse: resezione, OLT, RFTA, TACE, RFTA e TACE in combinazione.

Infatti la sopravvivenza dei pazienti con epatocarcinoma è condizionata oltre che dai fattori prognostici già citati, in larga parte, dal trattamento praticato, sia perché come già detto la resezione e l'OLT sono le scelte più radicali e curative, sia perché le terapie ablative vengono praticate in relazione alla stadiazione del paziente e quindi all'estensione della neoplasia e al grado di compenso epatico (Guidelines AASLD 2010).

La percentuale di trattamento completo e di recidiva locale riportati nel nostro studio sia per la TACE che per l'RFA sono sovrapponibili a quelli riportati in letteratura (Pellettier 1990, 1998, GECTH 1995, Bruix 1998, Lencioni R 2003, Lim SM 2004, Shiina SM 2005, Lin SM 2006, Lencioni R 2010 ).

Va sottolineato che per le TACE è stato considerato come necrosi completa la necrosi che si aveva dopo un massimo di tre sedute come riportato in letteratura (N'Kontchou G 2009). La RFA è sembrata avere

una maggiore capacità di determinare una necrosi completa della lesione neoplastica e permettere localmente una percentuale di recidive minori pur non raggiungendo una significatività statistica.

Le sopravvivenze ad 1 anno ed a tre anni rispecchiano i dati della letteratura, anzi nei confronti della TACE i nostri risultati sono tra i migliori.

Questo risultato probabilmente è correlato al fatto che in passato venivano sottoposti a TACE pazienti con tumori molto diffusi (Pellettier 1990). In aggiunta a ciò nel nostro studio tra i pazienti con TACE, vi erano anche soggetti in Classe A3 e A4 della BCLC che secondo le linee guida AASLD non dovevano essere trattati con questa metodica. Tale scelta, comunque, è stata dettata dal fatto che alcune lesioni perivasali o pericolecistiche o particolarmente profonde malgrado rientrassero nell'algoritmo diagnostico delle linee guida da sottoporre a RFA in realtà non erano aggredibili con sicurezza con questa metodica. Non abbiamo trovato differenze significative di sopravvivenza tra i due gruppi.

I nostri risultati indicano nella classe Child B, negli stadi più avanzati dello Staging BCLC e nella comparsa di nuove lesioni i fattori predittivi di risposta.

L'esiguità del campione da noi studiato, non può con sicurezza escludere il ruolo di altri parametri risultati significativi all'univariata ed esclusi dal modello multivariato. Ad esempio nella nostra casistica il diabete non è risultato un fattore di rischio, tuttavia è noto che nei

pazienti trattati con TACE la percentuale di insufficienza renale acuta, talora fatale, non è indifferente (La Spada E 2007). Probabilmente il piccolo numero di casi non ci ha permesso di evidenziare questo dato.

Tuttavia malgrado i suoi limiti il nostro studio conferma alcuni punti fondamentali.

La classificazione di Child- Pugh nella sua semplicità rimane sempre uno score assai utile nella scelta della terapia e affidabile nella valutazione della prognosi del paziente. Ciò avviene soprattutto nelle classi di scompenso maggiore, dove la cirrosi probabilmente ha una maggiore influenza sulla sopravvivenza rispetto all'estensione della neoplasia.

Lo staging BCLC di Barcellona si conferma nei nostri risultati affidabile nel predire la sopravvivenza dei pazienti. Esso ha il vantaggio di contemplare al suo interno estensione della neoplasia, stadio clinico, invasione vascolare. Tuttavia va detto che gran parte delle scelte terapeutiche del nostro studio (80 %) sono state effettuate adoperando questa classificazione, pertanto potrebbe esserci un bias di selezione che svolge un ruolo importante nel risultato statistico finale.

IL CLIP nel nostro studio non è significativo nel modello multivariato. Questo risultato in un primo momento ci ha stupito, visto che è lo staging prognostico più validato in diverse aree geografiche. La spiegazione di questo fallimento sta nelle caratteristiche della coorte di pazienti arruolata per il trattamento e nelle caratteristiche stesse dello score. Nessuno dei nostri pazienti era

in classe C di Child Pugh, nessuno aveva una trombosi neoplastica, nè una neoplasia superiore al 50 % del fegato. Questi sono i tre parametri che se positivi hanno il maggior peso prognostico nel valutare il rischio di morte dell'HCC (Ray Kim W 2009), la loro negatività ha contribuito a far perdere al CLIP un ruolo nell'analisi multivariata.

Infine è importante sottolineare l'influenza negativa sulla sopravvivenza che ha nel nostro studio la recidiva a distanza, cioè la comparsa di altri noduli nel tempo.

Questo dato apre un argomento assai importante e già accennato in precedenza, la tendenza dell'epatocarcinoma su cirrosi a diventare multifocale. Nella nostra casistica 11/43 pazienti (25 %) in tre anni presentavano nuovi noduli neoplastici.

La multinodularità condiziona notevolmente la prognosi e la sua imprevedibilità spiega come malgrado i programmi di prevenzione, l'accuratezza nello stadiare i pazienti, la molteplicità delle scelte terapeutiche, l'epatocarcinoma sia ancora una neoplasia ad alta mortalità (Ikai 2004).

Una speranza al riguardo viene dalle terapie antiangiogenetiche. Esse oggi hanno indicazione solo in stadi molto avanzati dell'HCC (classe C della BCLC), ma potrebbero essere utilizzate nei pazienti con HCC nei multinodulari (classe B) e si sta valutando se la loro utilizzazione in stadi più precoci può non solo aiutare il controllo focale della neoplasia ma ridurre l'evoluzione verso la multifocalità (Piscaglia F.2010).

Tabella 14: Caratteristiche demografiche, score di Child Pugh, CLIP e BCLC della casistica in studio

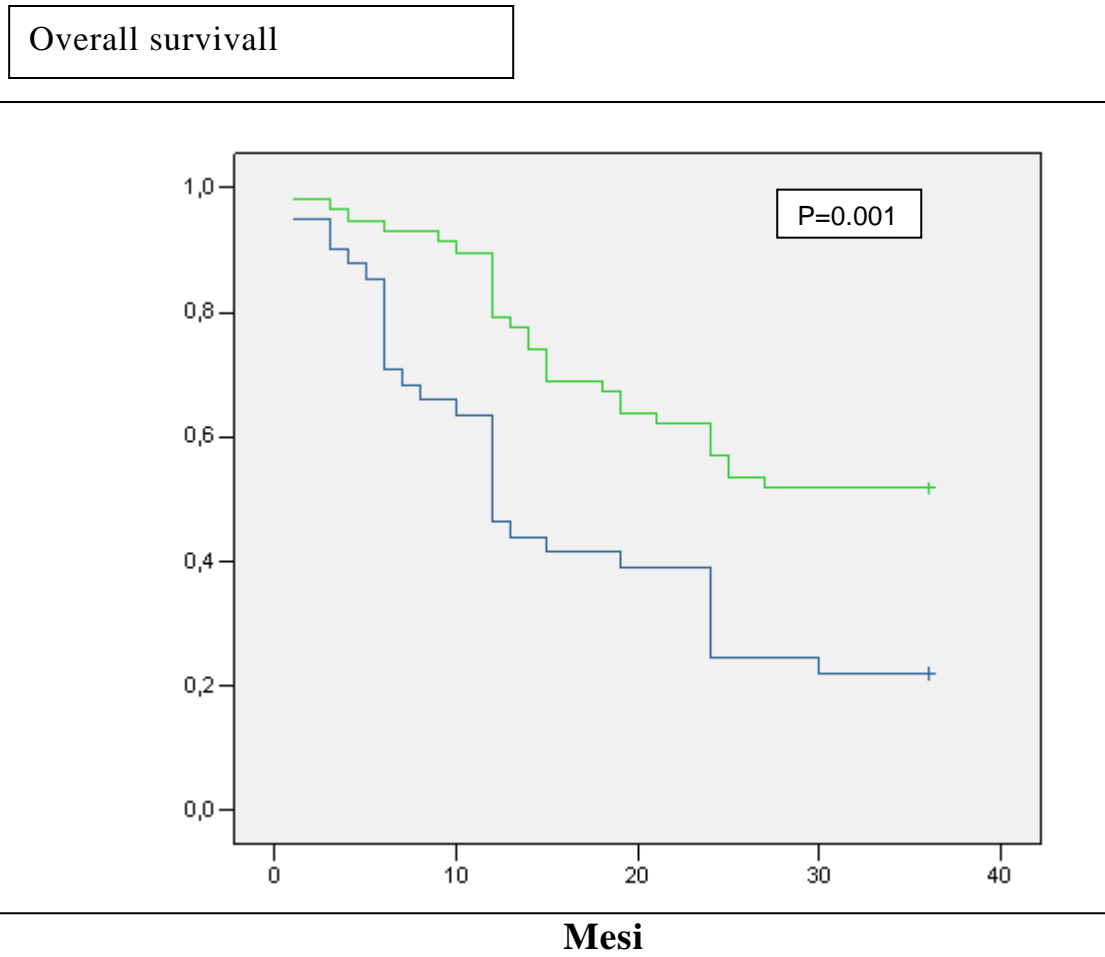
Età	68.8±10.5
Sesso (M/F)	65/50
Eziologia:	
HCV	90
HBV	8
HBV+HCV	5
Alcool	2
Alcoo + HBV/HCV	1
Criptogenetica	8
Altro	1
Classe Child-Pugh	
A	76
B	30
C	8
CLIP	
0	47
1	37
2	24
3	4
4	2
5	1
BCLC	
A0	4
A1	7
A2	8
A3	19
A4	57
B	7
C	6
D	7
Sorveglianza	65



Tabella 15: Caratteristiche demografiche, scores Child-Pugh, CLIP e BCLC, valori di AFP, presentazione all'imaging della casistica in studio suddivisa in relazione alla sorveglianza

	Senza Sorveglianza	Sorveglianza		
	N=50	N=65		P<
Età	69.1±13.4	68.5±7.6		ns
SessoM/F	24/26	41/24		ns
Eziologia:				
HCV	39	51		ns
HBV	3	5		ns
HBV+HCV	2	3		ns
Alcool	0	2		ns
Alcool+ HBV/HCV	0	1		ns
Criptogenetica	6	2		ns
Altro	0	1		ns
Classe Child-Pugh				
A	25	50		
B	18	13		
C	6	2	$\chi^2_{MH}=9.7$	0.002
CLIP				
0	13	34		
1	17	20		
2	15	9		
3	2	2		
4	2	0		
5	1	0	$\chi^2_{MH}=11$	0.001
BCLC				
A0	2	2		
A1	1	6		
A2	2	6		
A3	6	13		
A4	25	32		
B	3	4		
C	4	2		
D	7	0	$\chi^2_{MH}=7.7$	0.005
AFP				
< 200 ng/ml	37	60		
> 200 ng/ml	13	5	$\chi^2=5.9$	0.01
Uni nodulare	20	44		
Multinodulare/diffuso	30	21	$\chi^2=7.7$	0.01
Trombosi neoplastica	5	3		ns

Figura 19: Confronto tra le curve di sopravvivenza dei pazienti con e senza sorveglianza



— senza sorveglianza     
 — in sorveglianza

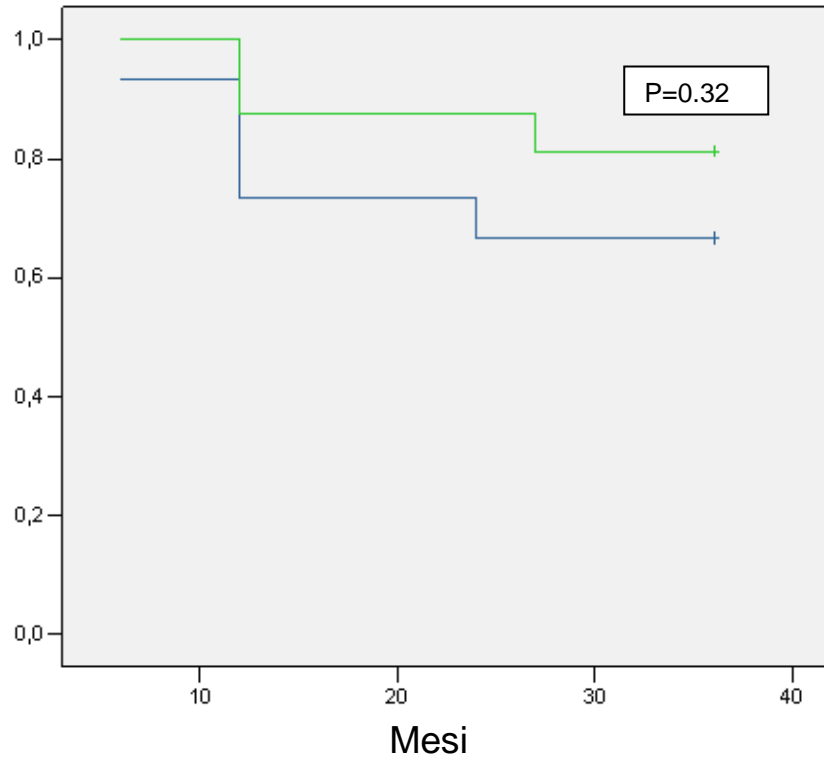
	Chi-Square	P<
Log Rank (Mantel-Cox)	11,830	,001

Tabella 16 : percentuale di necrosi completa, recidiva locale e sopravvivenze a 1 anno e 3 anni della popolazione in studio in relazione ai vari tipi di terapia

		Necrosi completa	Recidiva locale	Sopravv 1 anno	Sopravv 3 anni
RFTA	n=14	13 (90 %)	5 (35 %)	11 (79 %)	10 (71 %)
TACE	n=16	11 (73 %)	6 (40 %)	14 (87 %)	13 (81 %)
RFTA+TACE	n=8	8 (100)	3 (37.5 %)	8 (100%)	6 (75 %)
OLT/RES	n=6 (4/2)		0	6 (100%)	5 (83 %)

Figura 20: Confronto tra le curve di sopravvivenza dei pazienti trattati con RFTA e con TACE

Overall survival

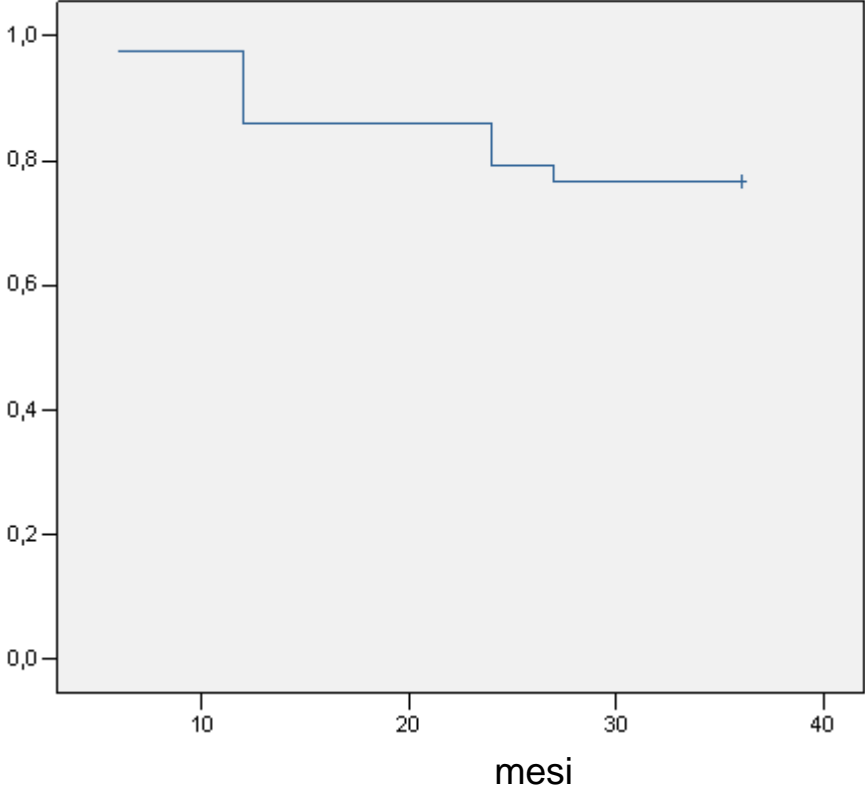


Paz a rischio		Mesi 12	Mesi 24	Mesi 36
RFTA	14:	11	11	10
TACE	16:	14	13	13

	Chi-Square	P<
Log Rank (Mantel-Cox)	,971	,325

Figura 21: curva di sopravvivenza dei pazienti trattati con diverse terapie (segnate nel testo).

Overall survival



Pazienti a rischio	12 mesi	24 mesi	36 mesi
43	39	35	34

Tabella 16: Analisi univariata dei fattori prognostici per HCC

	N° pazienti	Sopravvivenza a tre anni	OR (IC 95 %)	P<0.02
Albumina <2.8 g/dl	36	30		
>2.8 g/dl	7	3	6.6 (1.1-37.7)	
Bilirubina <2 mg/dl	23	18		
>2 mg/dl	20	15	-	ns
Ascite assente	35	31		
presente	8	2	8.6 (1.4-51)	0.02
AFP <200 ng/ml	37	30		
>200 ng/ml	6	3	-	ns
Diabete assente	23	18		
presente	20	15	-	ns
Child Pugh A	32	28		
B	11	5	8.4 (1.7-41)	0.02
Uninodulare	20	19		
Multinodulare	23	14	12.2 (1.4 -99)	0.02
Varici esofagee assenti	10	4		
presenti	33	6	-	ns
Recidiva locale Assente	29	7		
Presente	14	3	-	ns
Nuovi noduli Assente	36	6		
Presente	7	4	6.6 (1.7-37.7)	0.02

Tabella 17 : correlazioni tra sopravvivenza, età, BCLC, CLIP

	Sopravv a tre anni	P<
	$\rho$	
età	-0.138	ns
CLIP	-0.3	0.05
BCLC	-0.4	0.01
Dimensioni degli HCC uninodulari	-0.1	ns

Tabella 18: Analisi della sopravvivenza con il modello di Cox dei predittori di sopravvivenza

	HR	95 % IC	P<
Child Pugh	6.4	2.3-17.6	0.0001
BCLC	5.1	3.5-20.5	0.0001
Comparsa di nuovi noduli	4	1.2-22.5	0.05

## BIBLIOGRAFIA

- AISF Commissione “Imaging e valutazione emodinamica nella diagnosi epatologica”. Lesioni focali epatiche maligne. In: imaging e valutazione emodinamica nella diagnostica epatologica, AISF,2003.
- Anonymous. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 1998; 28: 751–5.
- Bolondi L, Sofia S, Siringo S et al.. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of Hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut* 2001.
- Bolondi L, Gaiani S, Celli N et al. Characterization of small nodules in cirrhosis by assement of vascularity: the problem of hypovascular hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005.
- Bolondi L Scening for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 1076-84
- Borzio M, Fargion S, Borzio F et al. Impact of large regenerative, low grade and high grade displastic nodules in hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 2003; 39: 209-14
- Bruix J, Llovet JM, Castells A, Montana X, Bru C, Ayuso MC, et al. Transarterial embolization versus symptomatic treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a randomized, controlled trial in a single institution. *HEPATOLOGY* 1998;27:1578-1583.

- Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodes J; EASL Panel of Experts on HCC. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol.* 2001 Sep;35(3):421-30.
- Bruix J, Sherman M, Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of liver, Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2005 Nov;42(5):1208-36.
- Bruix J, Sherman M : Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* An update  
[www.aasld.org/practiceguidelines/Documents/Bookmarked%20practice%20Guidelines/Hccupdate2010.pdf](http://www.aasld.org/practiceguidelines/Documents/Bookmarked%20practice%20Guidelines/Hccupdate2010.pdf)
- Buendia MA. Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects. *Med Pediatr Oncol.* 2002 Nov;39(5):530-5
- Byung Ihn Choi :hepatocarcinogenesis in liver cirrhosis: Imaging Diagnosis *J Korean Med Sci* 1998;13:103-116
- Burrel M, Llovet J, Ayuso C et al. MRI angiography is superior to helical CT for detection of HCC prior to liver transplantation : an explant correlatgion. *Hepatology* 2003; 38:1034-42
- Caturelli E Castellano L, Fusilli S et al: Coarse nodular US pattern in hepatic cirrhosis risk for hepatocellular carcinoma. *Radiology* 2003; 226: 691-7
- Cervello M., Foderà D., Florena AM., Soresi M., Tripodo C., D'Alessandro N., Montalto G. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and the presence of inflammatory cells in human



primary hepatocellular carcinoma: possible role in tumor promotion and angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2005; 14; 11(30): 4638-43

- Chow NH, Hsu PI, Lin XZ, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in normal liver and hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1997; 28:698–703
- Colombo M, De Franchis R, Del Ninno E et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with liver cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 325: 675-80: 251-9 Fen Yu, Xi-Xu Piao, Ai-Lian Jin. Efficacy ultrasonography and alpha-fetoprotein on early detection of hepatocellular carcinoma. *WJG* 2006; 12:4656-9
- Edamoto, Y., Hara, A., Biernat, W., Terracciano, L., Cathomas, G., Riehle, H.M., Matsuda, M., Fujii, H., Scoazec, J.Y., Ohgaki, H., 2003. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int. J. Cancer* 106, 334–341
- Edmondson HA , Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 18,900 necropsies. *Cancer* 1987; 60:810-819
- El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, et al. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1299–305
- El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatol Res* 2007 Sep;37 Suppl 2:S88-94.
- Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL et al., Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene.* 2002 Apr 11;21(16):2593-604
- Forner A, Villana R, Ayuso C et al Diagnosis of hepatic nodules

20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 Jan;47(1):97-104

- Ferral H, Male R, Cardiel M, Munoz L, Quiroz y Ferrari F. Cirrhosis: diagnosis by liver surface analysis with high-frequency ultrasound. *Gastrointest Radiol*. 1992;17(1):74-8.
- Gebo KA, Chander G, Jenckes MW, Ghanem KG, Herlong HF, Torbenson MS, El-Kamary SS, Bass EB. Screening tests for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C: a systematic review *Hepatology* 2002;36(5 Suppl 1):S84-92.
- Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire. A comparison of lipiodol chemoembolization and conservative treatment for unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1995;332: 1256-1261.
- Haffner SM, Kennedy E, Gonzalez C et al. A the prospective analysis of the HOMA model. The Mexico City Diabetes Study. *Diabetes care* 1996; 19:1138-41
- Harbin WP, Robert NJ, Ferrucci JT Jr. Diagnosis of cirrhosis based on regional changes in hepatic morphology: a radiological and pathological analysis. *Radiology*. 1980;135:273-83.
- Hisai H, Kato J, Kobune M, et al. Increased expression of angiogenin in hepatocellular carcinoma in correlation with tumor vascularity. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4852-9
- Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18:5356-62

- Kitamura S, Iishi I, Masaharu T et al. Liver with hypoechoic nodular pattern as a risk factor for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1995; 108: 1778-84
- Kimura T, Ebara M, Ohto M, Kondo F. Classification of liver cirrhosis based on parenchymal echo patterns and its clinical usefulness for diagnosis of liver cirrhosis. *Jpn J Gastroenterol.* 1989;86:1473-85.
- Kondo F, Ebara M, Sugiura N, Wada K, Kita K, Hirooka N, Nagato Y, Kondo Y, Ohto M, Okuda K. Histological features and clinical course of large regenerative nodules: evaluation of their precancerous potentiality. *Hepatology.* 1990;12:592-8.
- Jakate S, Yabes A, Giusto D, Naini B, Lassman C, Yeh MM, Ferrell LD. Diffuse cirrhosis-like hepatocellular carcinoma: a clinically and radiographically undetected variant mimicking cirrhosis *Am J Surg Pathol.* 2010 Jul;34(7):935-41.
- International consensus group for hepatocellular neoplasia: Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the International consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009;49:658–64.
- Ikai I, Arii S, Kojiro M, Ichida T, Makuuchi M, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Okita K, Omata M, Takayasu K, Yamaoka Y. Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey. *Cancer.* 2004 Aug 15;101(4):796-802
- Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology.* 2001 Jun;120(7):1763-73

- La Spada E, La Spada M, Brusca T, Campagna ME, Di Gesaro V, Terranova A, Sandonato L, Soresi M. Acute renal failure as a complication of transarterial chemoembolization in a patient with hepatocellular carcinoma *Recenti Prog Med.* 2007; Apr;98(4):232-5.
- Lencioni RA, Allgaier HP, Cioni D, Olschewski M, Deibert P, Crocetti L, Frings H, Laubenberger J, Zuber I, Blum HE, Bartolozzi C. Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology.* 2003 Jul;228(1):235-40.
- Lencioni R. Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2010 Aug;52(2):762-73.
- Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960. *Int J Cancer* 2004; 110: 155-169.
- Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, et al. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci.* 2000 May;113: 1661-70
- Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma  $\leq$  or  $\frac{1}{4}$  4 cm. *Gastroenterology* 2004;127:1714-1723.
- Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC. Randomised controlled trial comparing percutaneous radiofrequency thermal ablation, percutaneous ethanol injection, and percutaneous acetic acid injection to treat hepatocellular carcinoma of 3 cm or less. *Gut* 2005;54:1151-1156.

- Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *HEPATOLOGY* 2002;35: 1164-1171.
- Llovet JM, Fuster J, Bruix. Prognosis of hepatocellular carcinoma: The BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 329-38
- Llovet JM, Real MI, Montana X, Planas R, Coll S, Aponte J, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;359:1734-1739.
- Llovet J and Bruix J for the Barcellona-Clinic Liver Cancer Group Systematic Review of randomized trials for unresectable HCC chemoembolization improves survival *Hepatology* 2003.
- Llovet JM, Real MI, Montana X, Planas R, Coll S, Aponte J, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;359:1734-1739. Llovet JM et al. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003 Dec 6;362(9399):1907-17
- Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *HEPATOLOGY* 2003;37:429-442.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008; 24; 359(4): 378-90
- Marrero JA, Hussain HK, Nghiem HV, Umar R, Fontana RJ, Lok AS. Improving the prediction of hepatocellular carcinoma in

cirrhotic patients with an arterially-enhancing liver mass. *Liver Transpl* 2005;11:281-289

- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996 14;334(11):693-9.
- Mituha N, Shimizu N, Ohtsuka M, et al. Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 37:1105–13
- Morinaga S, Yamamoto Y, Noguchi Y, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) is up-regulated in human hepatocellular carcinoma (HCC) and the corresponding hepatitis liver. *Hepatogastroenterology* 2003; 50:1521–6
- N'Kontchou G, Mahamoudi A, Aout M, Ganne-Carrié N, Grando V, Coderc E, Vicaut E, Trinchet JC, Sellier N, Beaugrand M, Seror O. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: long-term results and prognostic factors in 235 Western patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2009 Nov;50(5):1475-83
- Ogata R, Majima Y, Tateishi Y, Kuromatsu R, Shimauchi Y, Torimura T, et al. Bright loop appearance; a characteristic ultrasonography sign of early hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2000;7:1293-1298.
- Paradis V, Bièche I, Dargère D, et al., Molecular profiling of hepatocellular carcinomas (HCC) using a large-scale real-time RT-PCR approach: determination of a molecular diagnostic index. *Am J Pathol*. 2003 Aug;163(2):733-41.

- Parkin DM, Muir CS. Cancer incidence in five continents. Comparability and quality data. No 120, VI Lyon: IARC Scientific Publications Ryder SD Guidelines for the diagnosis and treatment of HCC in adults gut 2003.
- Pelletier G, Roche A, Ink O, Anciaux ML, Derhy S, Rougier P, et al. A randomized trial of hepatic arterial chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1990;11:181-184.
- Pelletier G, Ducreux M, Gay F, Luboinski M, Hagege H, Dao T, et al. Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with lipiodol chemoembolization: a multicenter randomized trial. *J Hepatol* 1998;29: 129-134.
- Piscaglia F, Bolondi L. The intermediate hepatocellular carcinoma stage: Should treatment be expanded? *Dig Liver Dis* 2010 Jul;42 Suppl 3:S258-63
- Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 1973 Aug;60(8):646-9
- Ray Kim W. The Clip score: is it time to be clipped away? *Liver Int.* 2009 Jan;29(1):2-3.
- Roncalli M, Roz E, Coggi G, Di Rocco MG, Bossi P, Minola E, et al. The vascular profile of regenerative and dysplastic nodules of the cirrhotic liver: implications for diagnosis and classification. *Hepatology* 1999;30:1174-1178.
- Sherman M Alphafetoprotein: an obituary *J Hepatol*, 2001; 34: 603-5
- Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, et

al. A randomized controlled trial of radiofrequency ablation versus ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2005; 129:122-130.

- Smith MW, Yue ZN, Geiss GK, et al. Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. et al., *Cancer Res.* 2003 Feb 15;63(4):859-64.
- Solmi L, *Am J Gastroenterol* 1996; Trevisani F. *Am J Gastroenterol* 2002; Gebo, *Hepatology* 2002
- Soresi M, Carroccio A, Convissuto G, et al. Presentazione dell'epatocarcinoma in una popolazione siciliana. *Gior It Ecogr* 2000; 3: 21-25.
- Soresi M, Magliarisi C, Campagna P et al. Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2003; 23: 1747-53
- Soresi M, La Spada E, Giannitrapani L, Campagna E, Di Gesaro V, Granà W, Sandonato L, Brancatelli G, Rotolo G, Affronti A, Messina S, Montalto G. Hepatocellular carcinoma: comparison of two different periods at the same center *Eur J Intern Med.* 2010 Apr;21(2):127-30.
- Stiewe T, Tuve S, Peter M, et al. Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15;10(2):626-33.
- Stroffolini T: The descriptive epidemiology of primary liver cancer in Italy. *It J Gastroenterol* 1991; 23: 443-7
- Tarao K, Hoshino H, Shimizu A, Ohkawa S, Harada M, Nakamura Y, Ito Y, Tamai S, Okamoto N. Patients with ultrasonic coarse-nodular cirrhosis who are anti-hepatitis C virus-positive are at high



risk for hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1995 15;75(6):1255-62

- Tarao K, Shimizu A, Ohkawa S, Harada M, Ito Y, Tamai S, Kuni Y, Okamoto N, Inoue T, Kanisawa M. Development of hepatocellular carcinoma associated with increases in DNA synthesis in the surrounding cirrhosis. *Gastroenterology*. 1992;103(2):595-600.
- Terminology of nodular hepatocellular lesion. International Working Party Hepatology 1995;22:983-993.
- The Cancer of Liver Italian Programme (CLIP) Investigators prospective validation of the Clip score. A new prognostic system for patient with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 31 (2000).
- Wulfkühle, J.D., Liotta, L.A., Petricoin, E.F., 2003. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 3, 267–275
- Wurmbach E, Chen YB, Khitrov G, Zhang W, Roayaie S, Schwartz M, Fiel I, Thung S, Mazzaferro V, Bruix J, Bottinger E, Friedman S, Waxman S, Llovet JM. Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):938-47.
- Yao DF, Wu XH, Zhu Y, et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4:220–6