



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO**

**Dottorato di Ricerca in “Medicina Clinica e Scienze del comportamento”  
Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (Di.Bi.M.I.S)  
Settore Scientifico Disciplinare MED/09 – Medicina Interna**

## ***RUOLO DEI PATTERN ECOGRAFICI NELLA SORVEGLIANZA PER LA DIAGNOSI PRECOCE DELL’HCC***

**IL DOTTORE  
Dr. ANTONINO TERRANOVA**

**IL COORDINATORE  
Prof. ANTONIO PINTO**

**IL TUTOR  
Prof. MAURIZIO SORESI**

---

**CICLO XXX**

*Anno Accademico 2015-2017*

# INDICE

1. Introduzione	3
2. Eziologia e fattori di rischio	6
3. Epatocarcinogenesi	9
3.1 Modifiche vascolari	15
4. Sorveglianza	18
4.1 Popolazione a rischio	19
4.2 Test di sorveglianza	27
4.3 Intervallo di sorveglianza	30
4.4 Efficacia della sorveglianza	31
5. Diagnosi	32
5.1 Diagnosi non invasiva	33
5.2 Diagnosi anatomo-patologica	42
6. Sistemi di stadiazione	45
7. Trattamento	56
8. Parte sperimentale	70
Bibliografia	88

## 1. INTRODUZIONE

Il carcinoma epatocellulare (HepatoCellular Carcinoma, HCC) viene diagnosticato in oltre mezzo milione di persone al mondo ogni anno. Esso rappresenta il sesto cancro in ordine di frequenza, la terza causa di morti cancro-correlate ed il 7% di tutte le neoplasie maligne.

L'epatocarcinoma costituisce oltre il 90% dei tumori maligni primitivi del fegato ed è un importante problema di salute mondiale.

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

Negli ultimi anni, però, l'introduzione di trattamenti, sia curativi che palliativi, e di criteri più selettivi per il trapianto di fegato, hanno condotto ad una migliore aspettativa di vita per questi pazienti.

E' chiaro, però, che 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, AASLD, EASL), hanno consigliato l'attivazione di programmi di sorveglianza per i soggetti a rischio. Ed è proprio grazie alla diagnosi precoce che, rispetto alle decenni passate, l'HCC è divenuto da una quasi universale sentenza di morte, un cancro che può essere prevenuto, diagnosticato precocemente e curato con apprezzabile frequenza.

L'incidenza del carcinoma epatocellulare aumenta progressivamente con l'avanzare dell'età in tutta la popolazione, raggiungendo un picco a 70 anni (El-Serag HB, 1999). Nelle popolazioni dei Cinesi e degli Africani, l'età media dei pazienti con il tumore è apprezzabilmente più bassa. Ciò è in netto contrasto con il dato che si registra in Giappone, dove l'incidenza di epatocarcinoma è più alta negli uomini di età 70-79 anni (Tanaka H, 2008). L'HCC ha una forte preponderanza nel sesso maschile, con un rapporto maschi/femmine di 4:2 (IARC <http://www-dep.iarc.fr/>).

Il pattern di presentazione dell'epatocarcinoma ha una chiara distribuzione geografica, con i più alti tassi di incidenza in Asia orientale, Africa sub-Sahariana e Melanesia, ove si presenta l'85% circa dei casi (Parkin DM, 2005; IARC <http://www-dep.iarc.fr/>). Nelle aree sviluppate l'incidenza è bassa, con l'eccezione del Sud Europa ove, negli individui di sesso maschile, è significativamente più alta che in altre regioni sviluppate (Bosetti C, 2008).

A livello mondiale si registra un incremento di incidenza dell'epatocarcinoma. Complessivamente i tassi di incidenza e mortalità nel 2008 sono stati, rispettivamente, di 65.000 e 60.240 casi in Europa e di 21.000 e 18.400 casi negli Stati Uniti. È stato stimato che dal 2020 il numero di casi raggiungerà, rispettivamente, i valori di 78.000 e 27.000 (IARC <http://www-dep.iarc.fr/>). Le persone infettate dall'HCV in Europa negli anni 1940-1960 e negli USA negli anni 1960-1970 hanno guidato l'attuale aumento di incidenza dell'HCC (con i casi in Nord America risultanti dalla condivisione di aghi contaminati dai consumatori di droghe iniettive e dalle trasfusioni ematiche) (Tanaka Y, 2006). In Europa, i tassi di incidenza e mortalità riportati sono eterogenei (Bosetti C, 2008). Negli Stati Uniti il tasso di mortalità per HCC sembra aver avuto un incremento del 40% nel periodo 1990-2004, mentre il tasso complessivo di morti per cancro si è ridotto del 18% nello stesso periodo (Jemal A, 2008). Oltre che alla comparsa dell'epatopatia dovuta all'epatite C, tale crescita di incidenza può anche essere ricondotta all'aumento di epatocarcinomi HBV-correlati, in particolare tra gli immigrati provenienti da nazioni endemiche. Per contro, in Giappone, una nazione in cui l'impatto dell'epatocarcinoma HCV-correlato è stato per la prima volta rilevato dopo la II Guerra Mondiale, c'è stato un apparente declino nell'incidenza di questa neoplasia a partire dal 1990 (Tanaka H, 2008).

Infine, l'effetto della vaccinazione generale nell'infanzia contro l'HBV ha ridotto il tasso dell'epatocarcinoma HBV-correlato nelle nazioni di endemia. Finora questo trend è stato osservato nei bambini di Taiwan, ma ci si aspetta che divenga più evidente con la crescita dei bambini vaccinati (Chang MH, 2009).

L'Italia occupa una posizione intermedia per tassi di incidenza e mortalità, e l'epatocarcinoma rappresenta la settima causa di morte per tumore, con circa 5.000 decessi, ossia circa il 3% delle morti per tumore.

L'incidenza del tumore primitivo del fegato, aggiornato al 2009, (<http://www.registri-tumori.it/cms/>) è la seguente:

- 7° tumore più frequente nei maschi (4% di tutti i tumori);
- 13° tumore più frequente nelle femmine (2.3% di tutti i tumori);

con una prevalenza di:

- 53/100.000 abitanti nei maschi;
- 22/100.000 abitanti nelle femmine;

un rapporto maschi/femmine 2:1;

ed una mortalità di:

- quinta causa di morte per i maschi, terza causa nella fascia di età 50-69;
- settima causa di morte per le femmine (4.5% delle cause neoplastiche).

Secondo una recente stima basata su diversi fattori, tra cui il rapporto WHO, nel 2009, in Italia, il tasso di mortalità aggiustato per età riferibile ad HCC è stato 4/100.000 nel maschio e 1/100.0000 nella donna, con una riduzione rispetto al 2000 del 34% e del 41%, rispettivamente (Bosetti C, 2009).

In Italia la sopravvivenza relativa ed aggiustata a 5 anni dalla diagnosi del paziente con carcinoma epatocellulare è pari al 15% e tale valore non cambia nelle diverse aree del paese (registro AIRTUM, aggiornato 2011).

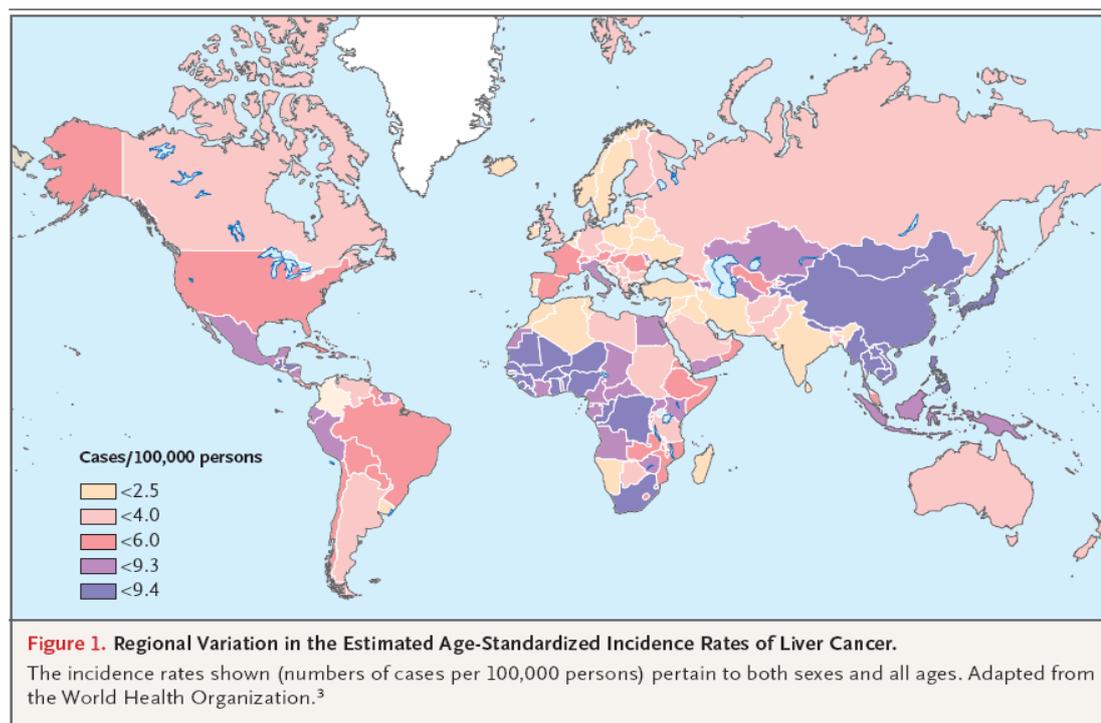


FIGURA 1: *Distribuzione geografica dell'epatocarcinoma. (Da El-Serag HB, N Eng J Med 2011).*

## 2. EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

Il 90% circa degli HCC è associato ad un sottostante fattore di rischio conosciuto. I fattori di rischio più frequenti comprendono le epatiti virali croniche B e C, l'abuso di alcool e l'esposizione ad aflatossine. In Africa e in Asia orientale, la frazione più ampia, pari al 60%, è attribuibile all'epatite B, mentre nel mondo occidentale solo il 20% dei casi può essere attribuito all'infezione da HBV ed invece l'epatite cronica C appare come il maggior fattore di rischio (Parkin DM, 2005). A livello mondiale, circa il 45% dei casi può essere attribuito all'infezione da HBV (che interessa globalmente 400.000.000 di persone), mentre il 31% è attribuibile all'infezione da HCV (che interessa 170.000.000 di persone), con il rimanente 15% circa associato ad altre cause (Llovet JM, Lancet 2003).

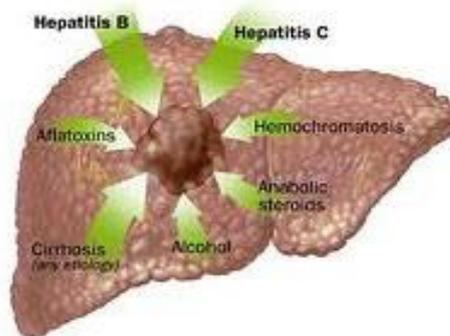
La cirrosi è un importante fattore di rischio per l'HCC e può essere causata da epatiti virali croniche, alcool, malattie metaboliche ereditarie, quali l'emocromatosi o il deficit di alfa-1-antitripsina, e NAFLD. Tutte le forme eziologiche di cirrosi possono complicarsi con la comparsa del tumore, ma il rischio è più alto nei pazienti con infezioni da virus dell'epatite (HBV, HCV, HBV-HDV). Nel complesso un terzo dei pazienti cirrotici svilupperà l'epatocarcinoma durante la propria vita (Sangiovanni A, 2006). Il rischio cumulativo a 5 anni nei pazienti cirrotici oscilla tra il 5% ed il 30% in relazione alla causa (con il rischio più alto nei soggetti con infezione da HCV), alla regione e al gruppo etnico (17% negli USA e 30% in Giappone), ed allo stadio della cirrosi (con il rischio più alto in coloro che hanno una malattia scompensata) (Fattovich G, 2004). In generale, le caratteristiche di severità dell'epatopatia (conta piastrinica inferiore a  $100 \times 10^3$ ; presenza di varici esofagee), insieme all'età avanzata e al sesso maschile, correlano con lo sviluppo di epatocarcinoma nei pazienti cirrotici (Lok AS, 2009). Recenti studi hanno messo in evidenza che l'incidenza del carcinoma epatocellulare aumenta parallelamente alla pressione portale misurata direttamente o al grado di *stiffness* epatica misurato mediante l'elastografia (Ripoll C, 2009; Masuzaki R, 2009).

Numerosi studi hanno identificato fattori legati all'HBV come predittori dello sviluppo di HCC in pazienti con epatite cronica B. L'HBeAg positività, il genotipo C e l'alto carico virale, sono predittori indipendenti dello sviluppo di epatocarcinoma (Yang HI, 2002; Yu MW, 2005; Chen CJ, 2006). Inoltre, il carico virale dell'HBV correla con il rischio di progressione verso la cirrosi (Iloeje UH, 2006). I pazienti con infezione da HBV possono sviluppare l'epatocarcinoma anche in assenza di cirrosi, ma nella maggior parte dei casi (70-80%) il tumore si instaura su una cirrosi pre-esistente (El-Serag HB, 2011).

Il rischio stimato di HCC è da 15 a 20 volte più alto tra i soggetti infetti dall'HCV che tra i non infetti, con maggior rischio per coloro che hanno una fibrosi epatica avanzata o una cirrosi. I fattori di rischio tra gli infetti da HCV includono un'età più avanzata al momento della diagnosi, il sesso maschile, la coinfezione con HIV o HBV, e probabilmente il diabete o l'obesità (Calle EE, 2003; El-Serag HB, 2011). In una recente meta-analisi, il genotipo 1b dell'HCV è stato chiamato in causa come responsabile dell'aumento del rischio di sviluppare il tumore (Raimondi S, 2009).

L'abuso prolungato di alcool (definito come l'ingestione giornaliera di 40-60g di alcool, con una bevanda standard contenente 13.7g) è un ben definito fattore di rischio per l'epatocarcinoma, sia indipendentemente (con il rischio aumentato di un fattore oscillante da 1.5 a 2.0), sia in combinazione con l'infezione da HCV e, in minore entità, con l'infezione da HBV.

L'esposizione alimentare all'aflatossina B1, contenuta nei funghi *Aspergillus flavus* ed *Aspergillus parasiticus*, è un importante cofattore per lo sviluppo dell'HCC in alcune aree dell'Africa e dell'Asia. Queste muffe sono ubiquitarie in natura e contaminano un gran numero di derrate alimentari nelle regioni tropicali e sub-tropicali. Studi epidemiologici hanno mostrato una forte correlazione tra l'introduzione dietetica di aflatossina B1, mutazione di TP53 ed incidenza di epatocarcinoma, specificamente negli individui HBV-infetti (Hsu IC, 1991).



L'obesità, il diabete e la steatosi sono stati riconosciuti come cause di carcinoma epatocellulare, sebbene il meccanismo secondo cui queste sovrapposte condizioni contribuiscano alla genesi tumorale rimanga vago (El-Serag HB, 2001; Marrero J, J Hepatol 2005). In studi basati su coorti di popolazione è stato osservato che l'HCC si sviluppava da 1.2 a 2.0 volte con maggior probabilità in persone obese piuttosto che non obese (Calle EE, 2003). Molti studi hanno mostrato che, in media, è due volte più probabile che la neoplasia si sviluppi in persone affette da diabete di tipo 2 che in persone che non hanno il diabete (El-Serag HB, 2006). La NAFLD, che è presente in oltre il 90%

delle persone obese ed in oltre il 70% dei soggetti affetti da diabete di tipo 2, è stata proposta come fattore di rischio per l'HCC (Neuschwander-Tetri BA e Caldwell SH, 2003). La cirrosi conseguente a steatoepatite non alcolica può dare inizio all'epatocarcinoma, ma pare che tali fattori possano anche essere additivi alle epatiti virali croniche (Marrero J, J Hepatol 2005). A causa dell'esiguità dei dati relativi ad un'associazione diretta tra la progressione della steatosi e l'HCC, le stime sul rischio al momento disponibili non sono chiare.

Diversi studi, condotti in Giappone e nel Sud Europa, hanno mostrato che il consumo di caffè è associato ad una riduzione del rischio di epatocarcinoma. Il meccanismo di questo possibile effetto protettivo non è stato stabilito. Il consumo di caffè è stato anche associato con ridotti livelli di insulina e ad un ridotto rischio di diabete di tipo 2 (El-Serag HB, 2011).

I pazienti con emocromatosi sviluppano l'HCC in oltre il 45% dei casi, più spesso su una pre-esistente cirrosi. Il carcinoma epatocellulare è, anche, ben documentato come complicazione della cirrosi da deficit di alfa-1-antitripsina. Occasionalmente l'epatocarcinoma si sviluppa in pazienti affetti dalla malattia di Wilson, ma solo in presenza di cirrosi (EASL, 2012).

L'evidenza epidemiologica di un legame tra il fumo di sigaretta e la comparsa di HCC è sempre stata controversa (El-Serag HB, 2001), ma prove recenti sostengono che l'abitudine al fumo costituisca un chiaro cofattore (Trichopoulos D, 2011). I forti fumatori hanno un rischio più alto dei non fumatori.

Nella popolazione generale, l'incidenza di epatocarcinoma è maggiore tra i pazienti con infezione da HIV rispetto ai controlli, e questo virus sembra essere un cofattore additivo che aumenta il rischio di HCC nei pazienti con epatiti virali croniche. (EASL, 2012).

L'identificazione di mutazioni nella sequenza del DNA virale che definiscano pazienti ad alto rischio di sviluppare il tumore è divenuta la sfida per i programmi di sorveglianza e le strategie chemiopreventive. Per quanto concerne l'epatocarcinoma, un recente studio caso-controllo ha trovato un'associazione significativa tra i polimorfismi del gene dell'EGF e il rischio di HCC (Tanabe KK, 2008), mentre un altro studio suggerisce una predisposizione genetica di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) a livello di loci coinvolti nella risposta immunitaria (Clifford RJ, 2010). Tuttavia queste scoperte richiedono conferma da parte di ricercatori indipendenti.

In Italia la causa più frequente di epatocarcinoma, nel periodo 2002-2008, è stata, secondo il database ITA.LI.CA. (che raccoglie i casi osservati e seguiti in 11 centri italiani), l'infezione da HCV (49%), seguita dall'abuso di alcool (21%), dalla combinazione di virus epatitico ed alcool (12%) e dall'infezione isolata da HBV (11%) (Santi V , 2012).

### 3. EPATOCARCINOGENESI

La maggior parte degli epatocarcinomi insorge in un fegato cirrotico. Diversi fattori genetici, ambientali, virali possono contribuire all'evoluzione della cirrosi in neoplasia. Da molti anni è noto che tale processo avviene in *multiple steps* con il passaggio dal nodulo cirrotico all'HCC (IWP, 1995). 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.

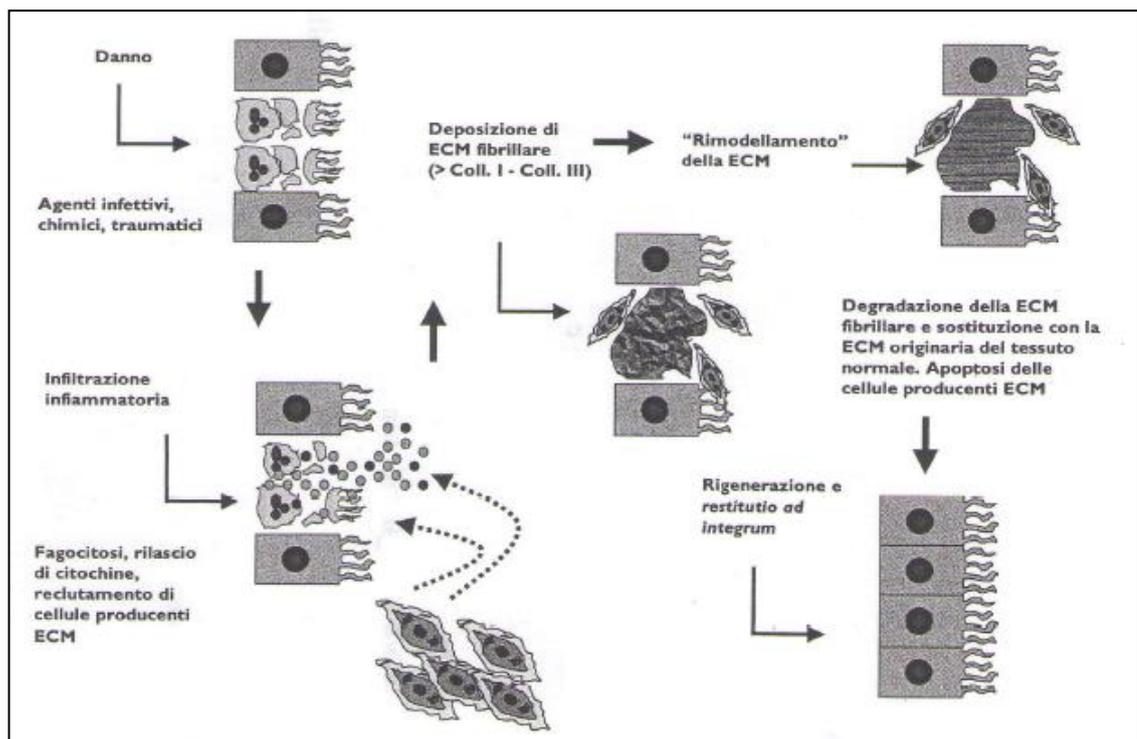


FIGURA 2: Danno tissutale, riparazione e riparazione tissutale. (Da Gentilini P, in *Il fegato*. Ed UTET 2002).

Quando la noxa patogena non viene o non può essere rimossa, la flogosi diventa cronica e la restitutio ad integrum non è possibile. Ciò comporta un'evoluzione verso la fibrosi e, nel caso specifico del fegato, verso la formazione di pseudonoduli cirrotici.

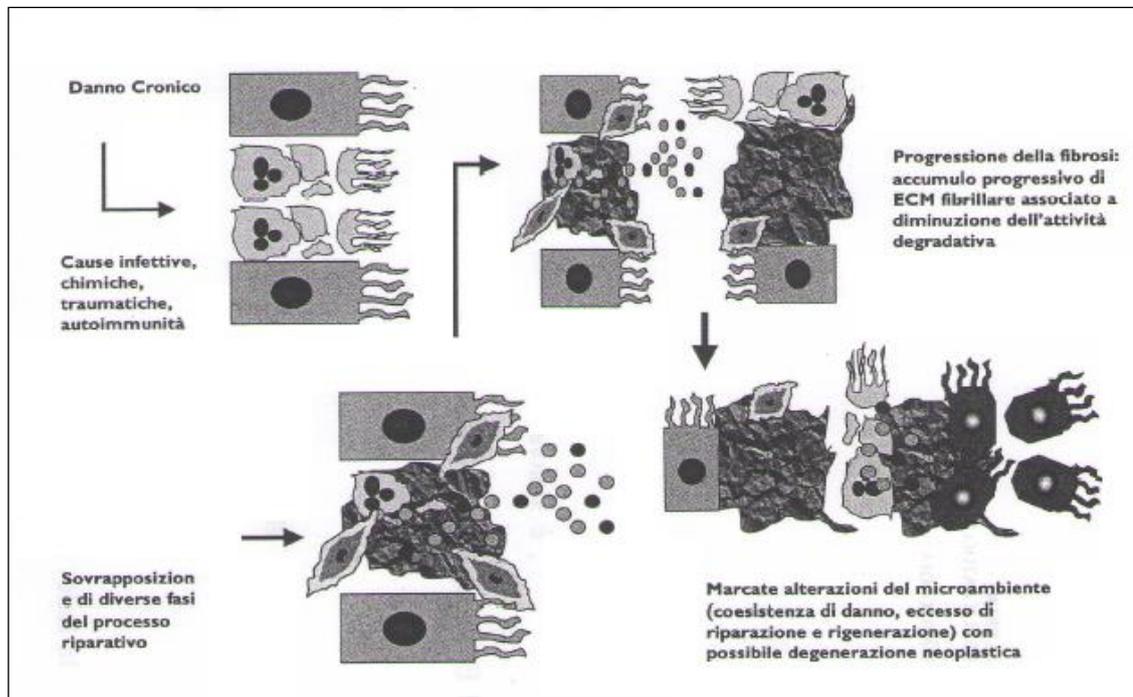


FIGURA 3: Attivazione cronica del processo di rigenerazione. (Da Gentilini P, in *Il fegato*. Ed UTET 2002).

In questo microambiente, la persistenza degli eventi flogistici e fibrotici e le associate alterazioni dei meccanismi di apoptosi portano all'iperplasia ed allo sviluppo di displasia e neoplasia.

Lo *stepwise pathway* passa attraverso le fasi di nodulo rigenerativo, nodulo displastico e nodulo neoplastico. Più specificamente è possibile distinguere le tappe che portano dal nodulo displastico di basso grado (LGDN), al nodulo displastico di alto grado (HGDN), all'early HCC, all'HCC ben differenziato, all'HCC 'nodulo nel nodulo', ed infine, all'HCC moderatamente differenziato (Kudo M, 2009).

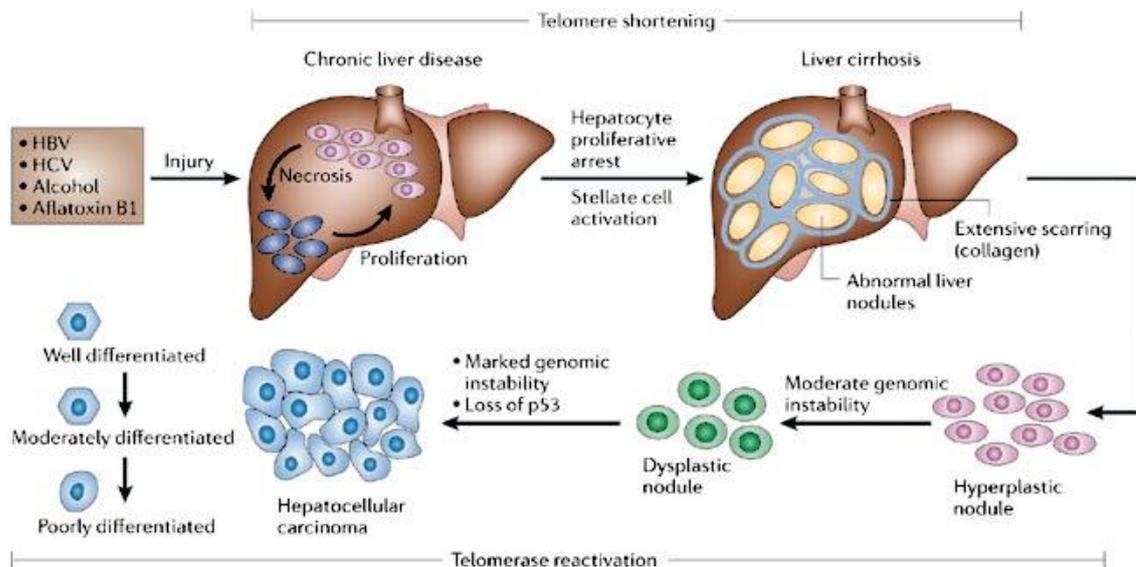


FIGURA 4: *Tappe della carcinogenesi epatica.* (Da Farazi PA e DePinho RA, *Nat Rev Cancer* 2006).

L'epatocarcinogenesi in fegato sano sembrerebbe seguire il modello 'de novo'. L'epatocarcinoma su fegato non cirrotico, infatti, non si associa alla presenza di lesioni pre-neoplastiche, poichè l'evento cancerogenetico interessa direttamente gli epatociti e non è mediato dallo stimolo rigenerativo protratto dei noduli cirrotici.

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

- il nodulo rigenerativo monoacinare;
- il nodulo rigenerativo multiacinare;
- il nodulo cirrotico.

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

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

Il nodulo displastico è costituito da epatociti che mostrano segni istologici di displasia, ma non di malignità. La displasia consiste nella presenza di alterazioni citoplasmatiche con minime o severe atipie nucleari, aumento del glicogeno e del grasso citoplasmatico. Le cellule displastiche sono aggregate a formare dei foci (cluster < 1 mm). La displasia può essere a piccole o larghe cellule.

I noduli displastici sono distinti in noduli di (IWP, 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, che può presentare diversi gradi di differenziazione.

Recentemente è stata fatta una distinzione tra “very early HCC” (Sakamoto M, 1998; Takayama T, 1998) e “small HCC” (detto anche “progressed”) (Takayama T, 1990; ICGHN, 2009).

L’early HCC, come definito dai patologi giapponesi, è generalmente ipovascolare e ha margini mal definiti (Kojiro M, 2004). Perciò ha contorni in qualche modo vaghi all’ecografia e può essere ipovascolare alla TC. A livello istologico, sono presenti poche arterie spaiate e le cellule mostrano vari gradi di displasia (Nakashima Y, 2003). Vi può essere invasione degli spazi portali da parte degli epatociti, ma l’invasione vascolare è assente. Le hepatocyte-like cells nel nodulo possono contenere grassi, hanno un circolo portale, piuttosto che arterioso, e non hanno capsula, a differenza di quanto si osserva nello small HCC (Roncalli M, 1999; Ogata R, 2000). Esso all’imaging può apparire come “nodulo nel nodulo”.



FIGURA 5: Immagine ecografica di ‘nodulo nel nodulo’.

Queste lesioni sono state chiamate very early HCC nello schema di stadiazione BCLC. L’anatomia patologica di queste lesioni è stata definita in campioni provenienti da resezioni e, perciò, la loro storia naturale è sconosciuta. Tuttavia, è stata notata la presenza di piccoli foci di cellule neoplastiche al loro interno, suggerendo che tali lesioni siano

precursori dell'HCC tipico (Takayama T, 1990; Sakamoto M, 1998; ICGHN, 2009;). La frequenza con cui queste lesioni evolvono in HCC tipico è ignota.

Lo small HCC, al contrario, ha margini ben definiti all'ecografia ed esibisce le tipiche caratteristiche di HCC ben differenziato alla TC ed all'esame istologico (Sakamoto M, 1998; Nakashima Y, 2003; ICGHN, 2009). Queste lesioni, spesso, mostrano invasione microvascolare, nonostante le loro piccole dimensioni (Nakashima Y, 2003). Lo small HCC è un tumore di diametro  $\leq 2$  cm. La presenza di invasione microvascolare suggerisce che la prognosi, dopo trattamento, è meno buona che per l'early HCC, ove l'invasione vascolare è rara. Tuttavia, ciò non è stato provato in studi clinici.

Sia l'early che lo small HCC possono essere indistinguibili dai noduli displastici. I criteri a favore della malignità includono: numerose atipie nucleari; alto rapporto nucleo/citoplasma con densità doppia; presenza di almeno tre filiere di epatociti non vascolarizzate; aumentato numero di mitosi; invasione dello stroma e dei tratti portalì.

La classificazione e la descrizione dei noduli displastici e dell'early HCC è stata recentemente rivista per armonizzare gli approcci dei patologi occidentali e giapponesi (ICGHN, 2009). È importante riconoscere che, piuttosto che costituire stati singoli discreti, c'è un continuum tra HGDN e HCC.

International Consensus on Small Nodular Lesions in cirrhotic liver				
IWP classification	L-DN	H-DN	WD-HCC	MD-HCC
<b>Pathological features</b>				
gross appearance			vaguely-nodular	distinctly-nodular
stromal invasion	(-)	(-)	+ / -	+ / -
<b>Clinical (imaging)</b>				
arterial supply	iso / hypo	iso / hypo	iso / hypo rarely hyper	hyper
portal vein supply	+	+	+	-
<b>Clinico-pathological</b>	Premalignant		Early HCC	Progressed HCC

 Intratumoral portal tract     
  Unpaired artery

H-DN: High grade dysplastic nodule    L-DN: Low-grade dysplastic nodule    WD: Well-differentiated  
 MD: Moderately differentiated    iso: isovascular    hypo: hypovascular    hyper: hypervascular

FIGURA 6: Correlazioni cliniche (imaging) e anatomo-patologiche delle lesioni epatiche su fegato cirrotico. (Da ICGHN, Hepatology 2009).

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, Cancer 1987).

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

**Grado II:** tumori a prevalente struttura microacinare e solida.

**Grado III:** tumori a prevalente struttura solida e trasecolare, 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.

Dal punto di vista macroscopico, secondo il "Liver Cancer Study Group of Japan" l'epatocarcinoma è stato classificato in 5 tipi: tipo nodulare con margini mal definiti; tipo nodulare semplice; tipo nodulare semplice con crescita extratumorale; tipo multinodulare confluyente; tipo infiltrante.

	Small nodular type with indistinct margin
	Simple nodular type
	Simple nodular type with extranodular growth
	Conflict multinodular type
	Infiltrative type

FIGURA 7: Configurazioni macroscopiche dell'epatocarcinoma. (Da Minami Y, World J Radiol 2010).

Lo sviluppo tumorale può realizzarsi con modalità differenti. Diversi studi longitudinali hanno identificato due principali pattern di sviluppo tumorale. La maggior parte dei pazienti si presentano con un nodulo singolo o, più raramente, multipli noduli espansivi capsulati, mentre una minoranza mostra una forma infiltrante, più aggressiva, di epatocarcinoma (Colombo M, 1991; Benvegnù L e Alberti A, 2001). Studi epidemiologici

hanno rilevato che, in Italia, la prevalenza di quest'ultima forma costituisce l'8% degli HCC (Stroffolini T, 1998; Borzio M, 2007).

Il tipo nodulare è stato associato con una cirrosi di vecchia data e persistente attività a livello istologico e con la presenza di attività biochimica continua, ma non con l'eziologia dell'epatopatia. L'HCC infiltrante, invece, è risultato strettamente e significativamente correlato all'eziologia, essendo più frequente nei pazienti HBsAg+ che negli HBsAg-, ed ancora di più in presenza di coinfezione HBV-HCV; si è, inoltre, mostrato indipendente da variabili correlate allo stadio della cirrosi e ha presentato correlazione solo con il profilo dell'AFP, suggerendo che la displasia cellulare potrebbe essere più pronunciata nei soggetti HBV-infetti. Sulla base di queste scoperte, si è ipotizzato che potrebbero operare differenti meccanismi di carcinogenesi nelle cirrosi HBV- e HCV-correlate. Nei pazienti con epatite C, lo sviluppo del carcinoma epatocellulare sembra seguire la storia naturale dell'epatopatia cronica e trarre origine da foci di cellule neoplastiche entro i noduli rigenerativi cirrotici, indicando un più forte effetto del processo cirrotico in sé ed un meno importante ruolo della sottostante infezione virale nella morfogenesi tumorale. Al contrario, lo sviluppo dell'epatocarcinoma nei soggetti HBV-infetti sembra essere indipendente dalla durata e dallo stadio della cirrosi, suggerendo un più diretto ruolo carcinogenetico del virus, il quale è in grado di integrare il proprio genoma in quello della cellula ospite, a differenza dell'HCV. In questi pazienti, infatti, il carcinoma epatocellulare si manifesta più frequentemente non come nodulo ben definito, bensì come un tumore infiltrante più diffuso (Benvegnù L e Alberti A, 2001).

### 3.1 MODIFICHE VASCOLARI

Nello *stepwise pathway* che porta dal nodulo rigenerativo all'HCC avviene una trasformazione vascolare.

Il passaggio graduale dalle forme pre-neoplastiche al piccolo HCC ed all'HCC avanzato viene tipicamente accompagnato da una progressiva modificazione del flusso vascolare endonodulare caratterizzata dalla neoangiogenesi di microstrutture vascolari arteriose e dalla sostituzione delle strutture portali tipiche delle forme displastiche e dell'early cancer (Choi BI, 1998).

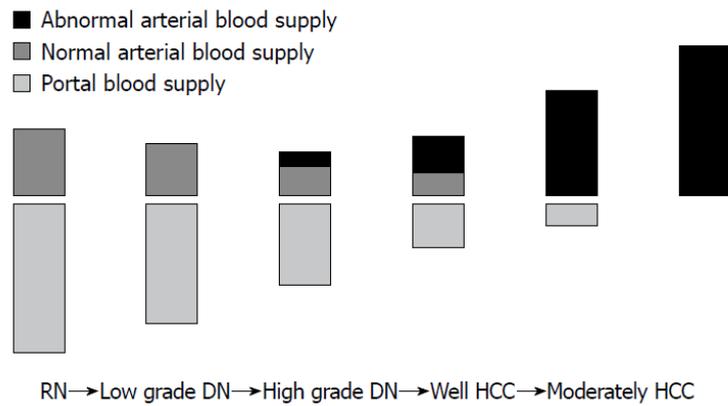


FIGURA 8: *Modiche del flusso ematico intranodulare con la progressione dell'epatocarcinogenesi. (Da Minami Y, World J Radiol 2010).*

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. 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. New Engl J Med 2008).

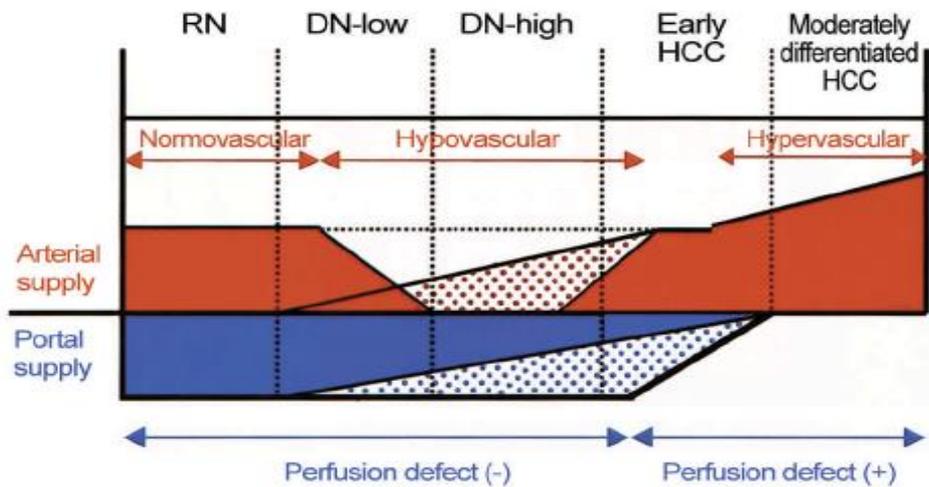


FIGURA 9: *Modifiche dell'emodinamica intranodulare nel corso dell'epatocarcinogenesi in fegato. (Da Choi BI, J Korean Med Sci 1998).*

Il diffondersi delle nuove metodiche di imaging (TC spirale bi e multifasica, RMN di ultima generazione) e dell'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS), ha permesso di studiare in maniera dettagliata le varie fasi della vascolarizzazione epatica: la fase arteriosa (precoce), la fase portale, la fase tardiva.

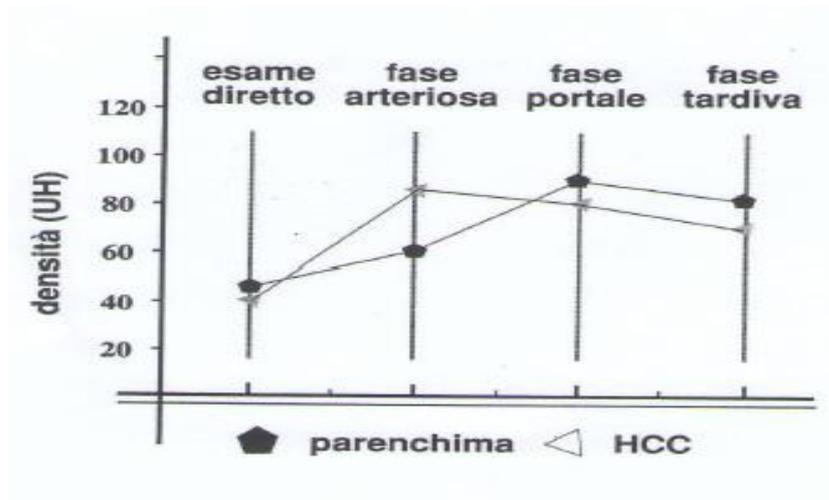


FIGURA 10: Il tumore è leggermente ipodenso nelle scansioni dirette, iperdenso in fase arteriosa, modicamente ipodenso in fase portale e ancora di più in fase tardiva (wash-out). (Da Siani A e Catalano O, in TC e TC spirale del fegato. Ed Idelson-Gnocchi 2000).

L'imaging radiologico nella caratterizzazione delle lesioni pre-maligne e maligne si avvale, pertanto, dello studio dell'emodinamica intranodulare.

Il comportamento vascolare arterioso dei noduli epatici su cirrosi viene distinto in:

- ipervascolare, tipico dell'HCC;
- isovascolare;
- ipovascolare;
- spot vascolare in nodulo ipovascolare.

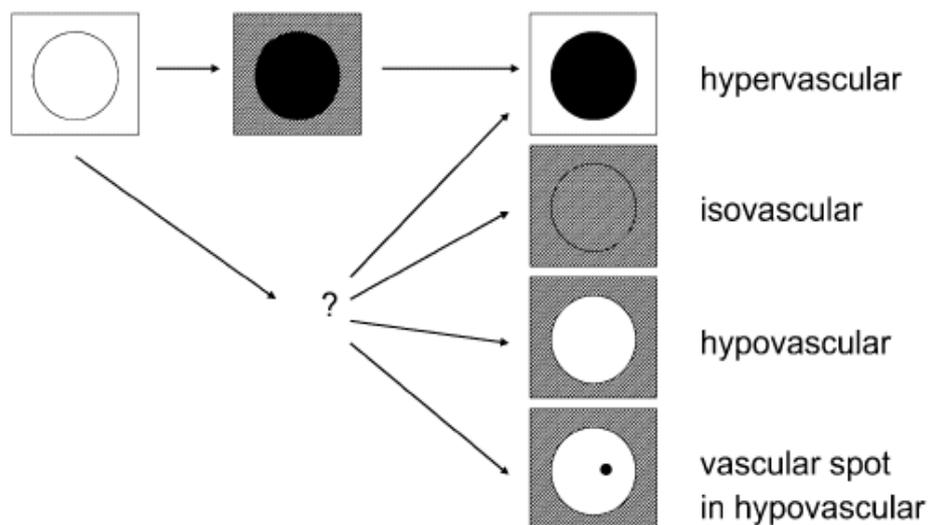


FIGURA 11: Pattern vascolari arteriosi dei noduli epatici su cirrosi. (Da Siani A e Catalano O, in TC e TC spirale del fegato. Ed Idelson-Gnocchi 2000).

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.

È, però, possibile che vi siano HCC che non presentano il pattern vascolare tipico (assenza di enhancement arterioso, presenza di enhancement arterioso senza wash-out tardivo) e ciò avviene soprattutto nei tumori di dimensioni <2 cm e nei noduli displastici ad alto grado che, dal punto di vista biologico, vanno considerati lesioni maligne.

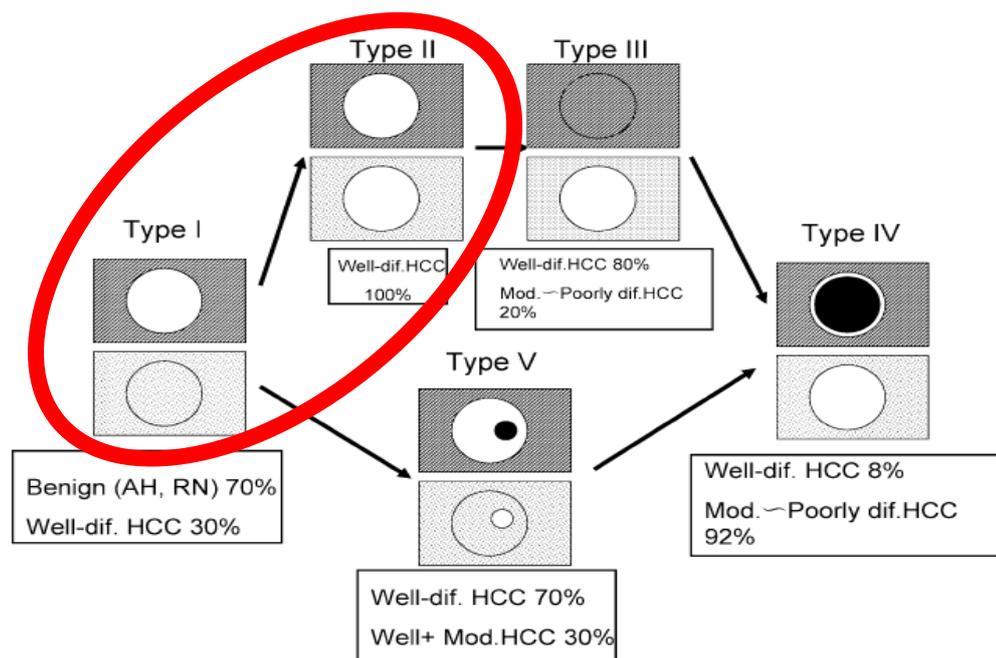


FIGURA 12: Alterazioni del pattern vascolare intranodulare durante l'epatocarcinogenesi. (Da Kudo M, Intervirology 2004).

#### 4. SORVEGLIANZA

La sorveglianza consiste nell'applicazione periodica di un test diagnostico a soggetti a rischio di sviluppare una determinata malattia. L'utilità e l'applicabilità di questo test sono influenzate da vari fattori, quali l'incidenza della malattia ricercata nella popolazione bersaglio, la disponibilità di test diagnostici a costi sostenibili e la loro accettabilità da parte della popolazione bersaglio, la disponibilità di trattamenti e la loro efficacia. Inoltre, la sorveglianza dovrebbe essere offerta nel contesto di un programma in cui i test di screening e i protocolli diagnostici siano standardizzati ed in cui siano attive procedure di controllo di qualità.

Il processo di sorveglianza coinvolge anche la decisione di quale sia il livello di rischio al quale far partire la sorveglianza medesima, quali test di screening applicare e con quale frequenza, e quali risultati vanno considerati anormali.

Lo scopo della sorveglianza è ottenere una riduzione della mortalità correlata alla malattia. Questo obiettivo è solitamente raggiunto attraverso la diagnosi precoce, che, a sua volta, incrementa la fattibilità ed il rapporto costo-efficacia delle terapie curative. Altri end-point, quali una diagnosi anticipata ed il tasso di mortalità a 5 anni, non sono obiettivi surrogati appropriati, come emerso dall'analisi del Surveillance, Epidemiology and End Results Program (SEER) del National Cancer Institute, che ha dimostrato che tali obiettivi non correlano con una riduzione della mortalità per specifica malattia (Welch HG, 2000).

L'epatocarcinoma è una patologia idonea ad essere sottoposta a sorveglianza in quanto gli individui a rischio possono essere facilmente identificati per la presenza di una sottostante epatopatia, in primis la cirrosi, di cui il carcinoma epatocellulare costituisce una temibile complicanza. Infatti, nei paesi occidentali, l'epatocarcinoma insorge sulla cirrosi in oltre il 90% dei casi (El-Serag HB, 2011) e questa è di per sé una malattia che condiziona la sopravvivenza, in quanto influenza le possibilità di un trattamento antitumorale ed i suoi effetti, rendendo così la diagnosi precoce dell'HCC ancor più cruciale. Inoltre, i vari trattamenti disponibili possono avere un impatto diverso sulla cirrosi; infatti, in pazienti con cirrosi ed epatocarcinoma, la precisa causa della morte potrebbe essere tanto la sottostante epatopatia quanto il tumore, senza che questa possa essere chiaramente stabilita in alcune circostanze.

La conoscenza dei vari fattori di rischio per lo sviluppo dell'epatocarcinoma è un requisito fondamentale per individuare le popolazioni bersaglio da sottoporre a sorveglianza.

#### 4.1 POPOLAZIONE A RISCHIO

##### *Cirrotici*

La decisione di includere un paziente in un programma di sorveglianza è determinata dai livelli di rischio per l'epatocarcinoma, i quali sono, a loro volta, correlati all'incidenza di HCC. Tuttavia, non vi sono dati sperimentali che indichino quale livello di rischio o quale incidenza di HCC dovrebbero far scattare la sorveglianza. Si è, invece, usata l'analisi decisionale per fornire delle linee-guida circa la soglia d'incidenza di HCC alla quale la sorveglianza può divenire efficace. Un intervento è considerato efficace se fornisce un

incremento in longevità di circa 100 giorni, ovvero circa 3 mesi, al costo di meno di 50.000\$ per anno di vita guadagnato (Laupacis A, 1992). Sono state condotte molte analisi decisionali e sul rapporto costo-efficacia inerenti la sorveglianza per l'epatocarcinoma. Tali analisi differiscono nella natura della popolazione teorica analizzata e negli interventi applicati, ma hanno molti risultati in comune. Esse hanno tutte rilevato che la sorveglianza ha un buon rapporto costo-efficacia, sebbene in alcuni casi solo marginale, e la maggior parte ha mostrato che l'efficacia della sorveglianza è altamente dipendente dall'incidenza di HCC. Lin OS et al. (2004) hanno trovato che la sorveglianza con AFP ed ecografia aveva un buon rapporto costo-efficacia indipendentemente dall'incidenza del tumore. Diverse analisi costo-efficacia indicano, invece, che un'incidenza dell'1.5% o superiore giustificerebbe la sorveglianza nei pazienti cirrotici (Sarasin FP, 1996; Yoshida H, 1999; Fattovich G, 2004; Sangiovanni A, 2006; Lok AS, 2009).

Va precisato che la presenza di cirrosi avanzata (classe C secondo Child-Pugh) preclude l'impiego di terapie potenzialmente curative e, perciò, in questi pazienti, la sorveglianza non ha un buon rapporto costo-efficacia (Bruix J, 2001; Trevisani F, 2007). Costituiscono un'eccezione i pazienti in lista d'attesa per trapianto di fegato, i quali, indipendentemente dallo stato della funzionalità epatica, dovrebbero essere controllati periodicamente per individuare i tumori che oltrepassano i criteri convenzionali e i piccoli tumori che potrebbero richiedere una terapia, nonché per aiutare a delineare le scelte di priorità per il trapianto.

Le suddette analisi sul rapporto costo-efficacia, essendo limitate alle popolazioni di cirrotici, non possono essere applicate ai pazienti affetti da epatite B senza cirrosi. Anche questi pazienti, sono a rischio di HCC, particolarmente in Asia ed Africa. Un'analisi costo-efficacia della sorveglianza dei carriers B mediante l'uso di ecografia e AFP ha suggerito che questa raggiunge un buon rapporto costo-efficacia quando l'incidenza di carcinoma epatocellulare supera lo 0.2% per anno (Bruix J e Sherman M, 2011).

### **Non cirrotici**

- *Epatite B*

Beasley R et al. (1982) hanno mostrato che l'incidenza annuale di HCC nei carriers B era dello 0.5%. L'incidenza annuale aumentava con l'età, cosicché all'età di 70 anni era dell'1%. Nei pazienti con cirrosi nota l'incidenza era, invece, del 2.5% per anno. Il rischio relativo di HCC era di circa 100 e pertanto i carriers B avevano 100 volte più probabilità di sviluppare la neoplasia rispetto ai non infetti. Sakuma K et al. (1988) hanno riportato

un'incidenza di epatocarcinoma in una popolazione di maschi giapponesi dello 0.4% per anno. Entrambe queste popolazioni erano costituite da maschi asiatici con infezione da HBV probabilmente acquisita alla nascita o durante l'infanzia. Studi condotti in Occidente, dove l'epidemiologia dell'epatite B è differente in quanto acquisita più tardi nella vita, hanno indicato che l'incidenza del carcinoma epatocellulare nei carriers B varia dallo 0.1% allo 0.4% per anno (Sánchez-Tapias JM, 2002; Fattovich G, 2008). In Europa, l'HCC nei carriers B si manifesta principalmente nei pazienti con cirrosi radicata (Fattovich G, 1991). I carriers cronici non asiatici anti-HBe positivi, con replicazione virale inattiva da lungo tempo e che non hanno cirrosi sembrano avere uno scarso rischio di sviluppare l'HCC (De Franchis R, 1993; Sánchez-Tapias JM, 2002). I carriers B asiatici senza cirrosi sono, invece, a rischio di HCC indipendentemente dallo stato della replicazione virale (Yang HI, 2002). Allo stesso modo, il rischio di epatocarcinoma persiste nei carriers HBV cronici asiatici che hanno perso l'HBsAg e pertanto questi pazienti dovrebbero continuare ad essere sottoposti a sorveglianza (Yuen MF, 2004). Nei carriers B caucasici che hanno perso l'HBsAg, invece, il rischio di HCC sembra ridursi drasticamente (Fattovich G, *Hepatology* 1997).

L'incidenza annuale di epatocarcinoma nei carriers B di sesso maschile del Sud-Est asiatico inizia a superare il cut-off dello 0.2% a circa 40 anni di età, indipendentemente dalla presenza di cirrosi o dall'attività della malattia (Beasley R, 1982). Al contrario, nei caucasici il rischio è correlato all'attività infiammatoria ed alla presenza di cirrosi. Pertanto, le raccomandazioni vigenti indicano di sottoporre a sorveglianza gli uomini asiatici dall'età di 40 anni in poi. Anche la carica virale sembra far aumentare il rischio di sviluppare l'HCC. L'incidenza del tumore epatocellulare nelle donne è più bassa che negli uomini. Sebbene il tasso di incidenza legato all'età non sia ben definito nelle donne asiatiche, sembra appropriato far partire la sorveglianza all'età di 50 anni in tale popolazione. Nei pazienti asiatici, valori di HBV-DNA sierico superiori alle 10.000 copie/ml sono stati associati con un rischio annuale superiore allo 0.2% per anno (Chen CJ, 2006). In presenza di una storia familiare con un parente di primo grado affetto da epatocarcinoma la sorveglianza dovrebbe iniziare ad un'età inferiore ai 40 anni, sebbene tale età sia difficile da definire (Yu MW, 2000). Gli africani con epatite B sembrano sviluppare l'HCC ad un'età più giovane (Kew MC, 1988) e, pertanto, anche in questa popolazione la sorveglianza dovrebbe iniziare ad un'età più giovane. Nei carriers B caucasici senza cirrosi e con epatite inattiva, come determinato da normali livelli di ALT da lungo tempo e bassa concentrazione di HBV-DNA (De Franchis R, 1993), l'incidenza di HCC è probabilmente troppo bassa perché la sorveglianza abbia qualche efficacia.

Tuttavia, vi sono ulteriori fattori di rischio da prendere in considerazione in questi pazienti, quali un'età più avanzata, la persistenza di replicazione virale, la coinfezione con HCV o HIV, o la presenza di altra epatopatia. Al contrario, gli adulti caucasici con epatite B attiva, anche in assenza di cirrosi, sono probabilmente a rischio di carcinoma epatocellulare e dovrebbero essere periodicamente controllati. Tutti i carriers B con cirrosi, indipendentemente dall'età, devono essere controllati per l'HCC.

Il genotipo dell'HBV è un ulteriore fattore che influenza il rischio di cancro, probabilmente per le differenze nella durata e nella severità dell'infiammazione epatica indotta. I genotipi A e D (europeo e medio-orientale) sono stati confrontati con i genotipi B e C (asiatici) (Sánchez-Tapias JM, 2002) (Yang HI, 2008; Yuen MF, 2009). Il genotipo A ha generalmente un outcome più favorevole del D, ed il genotipo C è associato ad un più alto rischio di neoplasia rispetto al B.

Due studi hanno tentato di regolare la selezione dei pazienti con epatite cronica B per la sorveglianza. Al fine di una più accurata identificazione degli individui a maggior rischio di HCC sono stati sviluppati degli scores di rischio per questi soggetti. Yuen MF et al. (2009) hanno elaborato uno score utilizzando, quali fattori predittivi di HCC, il sesso maschile, l'invecchiamento, alti livelli di HBV-DNA (log copie/ml), mutazioni della zona *core promoter* e la presenza di cirrosi, che sono stati combinati per predire lo sviluppo di epatocarcinoma a 5 e a 10 anni. Uno studio simile è stato pubblicato usando i dati dello studio REVEAL (Yang HI, 2010; Chen JD, 2010). Entrambi questi scores di rischio necessitano di validazione e pertanto non sono pronti per essere impiegati nella pratica.

#### ▪ *Epatite C*

Il rischio di HCC nei pazienti con epatite cronica C è più alto tra i soggetti con cirrosi (Fattovich G, Gastroenterology 1997; Degos F, 2000), in cui l'incidenza di epatocarcinoma è compresa tra il 2 e l'8% per anno. E' stato condotto un singolo studio di popolazione prospettico sul rischio di HCC in pazienti con epatite C (Sun CA, 2003). In questo studio l'anti-HCV positività conferiva un rischio 20 volte più alto della anti-HCV negatività, ma la presenza o assenza di cirrosi non è stata valutata.

Gli individui HCV-infetti che non hanno cirrosi hanno un rischio molto più basso di sviluppare l'HCC (Yoshida H, 1999; Lok AS, 2009). Dati provenienti dal Giappone indicano che i pazienti con fibrosi lieve hanno un'incidenza annuale di carcinoma epatocellulare dello 0.5% (Yoshida H, 1999). Un recente studio statunitense ha segnalato che l'epatocarcinoma si presenta in pazienti con epatite cronica C e fibrosi a ponte in assenza di cirrosi (metavir F3) (Lok AS, 2009). Il rischio a 5 anni di sviluppare HCC in

questi soggetti era del 4.8%. Il fatto che la transizione da uno stato di fibrosi avanzata a cirrosi non possa essere accuratamente definita ha condotto le linee-guida dell'EASL a raccomandare la sorveglianza anche nei pazienti con fibrosi a ponte (Bruix J, 2001). Sono stati fatti diversi tentativi di sviluppare marcatori non invasivi per stabilire lo stadio della fibrosi e, se correttamente validati, potrebbero essere usati per determinare quando iniziare la sorveglianza (Callewaert N, 2004). Allo stesso modo, molti altri marcatori possono predire un significativo rischio di HCC. Uno di questi può essere la conta piastrinica. E' stato suggerito che l'incidenza di epatocarcinoma nei pazienti con cirrosi HCV-correlata aumenta sostanzialmente quando la conta piastrinica scende al di sotto di  $100 \times 10^9/l$ , indipendentemente dalla funzionalità epatica (Degos F, 2000; Moriyama M, 2003; Velazquez RF, 2003), ma tale dato necessita di essere confermato. Altri studi hanno tentato di sviluppare indici predittivi basati su un pannello di test sierologici comunemente eseguiti quali le transaminasi, l' $\alpha$ -2-macroglobulina, l'apolipoproteina A1, l'aptoglobina, la bilirubina e la gamma-glutamminil-transpeptidasi (Callewaert N, 2004; Moriyama M, 2003; Velazquez RF, 2003). Tuttavia, questi indici devono ancora essere validati prima di entrare nell'uso generale e, ad oggi, non sono raccomandati.

Sono stati fatti anche tentativi di sviluppare uno score di rischio per i pazienti con epatite cronica C (Lok AS, 2009). La coorte è stata ricavata dallo studio HALT-C, che ha identificato l'età avanzata, la razza africana americana, la bassa conta piastrinica, gli alti livelli di fosfatasi alcalina e le varici esofagee come fattori di rischio per HCC. Anche questo score richiede ancora validazione prima di poter essere raccomandato per la pratica. Infine, l'elastografia è stata usata per stratificare i pazienti a diverso rischio per epatocarcinoma (Masuzaki R, 2009). Sebbene promettente, allo stato dell'arte, questa tecnologia non è sufficientemente avanzata per consentire una valutazione di routine del rischio di HCC (Chen JD, 2010).

- *Coinfezione con HIV*

I pazienti che hanno un'epatite B o C ed una coinfezione da HIV possono avere una malattia epatica più rapidamente progressiva e quando giungono alla cirrosi sono anche ad incrementato rischio di HCC (Giordano TP, 2004). Lo studio MORTAVIC ha indicato che il carcinoma epatocellulare era responsabile del 25% di tutte le morti per epatopatia nell'era post-HAART (Puoti M, 2004). Lo sviluppo di HCC in pazienti coinfecti è stato descritto più aggressivo che nei mono-infetti (Puoti M, 2004). Se vero, ciò annullerebbe, probabilmente, l'efficacia della sorveglianza, in quanto essa è più efficace per i tumori a lenta crescita (length bias). Tuttavia, finchè non saranno disponibili dati che mostrino

l'inefficacia della sorveglianza, questi pazienti dovrebbero continuare ad essere sottoposti allo screening. I criteri per includere i pazienti con coinfezione nei programmi di sorveglianza per HCC sono gli stessi utilizzati per i pazienti mono-infetti e si basano sullo stadio ed il grado dell'epatopatia come prima descritto.

- *Cirrosi da altre cause rispetto alle epatiti virali*

L'incidenza di HCC nelle cirrosi causate da malattie diverse dalle epatiti virali è, con qualche eccezione, non accuratamente conosciuta.

La maggior parte degli studi sull'incidenza dell'epatocarcinoma nella cirrosi alcolica risale a prima dell'identificazione del virus dell'epatite C. Dato che l'epatite C è relativamente frequente negli alcolisti (Befrits R, 1995) la gran parte dei tassi di incidenza di HCC in quegli studi deve essere stata sovrastimata. Che la cirrosi alcolica sia un fattore di rischio per epatocarcinoma è chiaro. In uno studio l'epatopatia alcolica rendeva conto del 32% di tutti gli HCC (Hassan MM, 2002). Negli USA il tasso approssimativo di ospedalizzazione per carcinoma epatocellulare correlato a cirrosi alcolica è 8-9/100.000/anno in confronto a quello di circa 7/100.000/anno dell'epatite C (El-Serag HB e Mason AC, 2000). Questo studio non ha determinato l'incidenza del tumore nell'epatopatia alcolica, ma conferma che la cirrosi alcolica è un fattore di rischio significativo per HCC, probabilmente sufficiente per giustificare la sorveglianza.

Con il riconoscimento della steatoepatite come causa di cirrosi si è fatto strada il sospetto che questa possa anche costituire un fattore di rischio per epatocarcinoma. Nessuno studio, finora, ha seguito un gruppo sufficientemente numeroso di simili pazienti per un periodo di tempo tale da consentire di calcolare un tasso di incidenza di HCC in questa popolazione. In uno studio di coorte di pazienti affetti da carcinoma epatocellulare, il diabete è stato trovato nel 20% dei casi come solo fattore di rischio per l'HCC (Adami HO, 1996), ma non è stato notato se tali pazienti fossero cirrotici o meno. La NAFLD è stata descritta in coorti di pazienti con HCC (Bugianesi E, 2002) ma, dal momento che l'incidenza di HCC nelle cirrosi dovute a NAFLD non è nota, non è possibile valutare se la sorveglianza potrebbe essere efficace o avere un buon rapporto costo-efficacia in questi pazienti. Allo stato attuale, la sorveglianza non è, pertanto, raccomandata, se non nei soggetti la cui steatoepatite sia già evoluta in cirrosi.

I pazienti con emocromatosi genetica (GH) che hanno una cirrosi consolidata hanno un aumentato rischio di HCC. L'incidenza della neoplasia nella cirrosi dovuta a GH è sufficientemente alta (circa 3-4% per anno) perché questi pazienti vengano inclusi nei

programmi di sorveglianza. L'incidenza di HCC nello stadio 4 della cirrosi biliare primitiva è all'incirca la stessa di quella registrata nella cirrosi HCV-correlata. Per quanto concerne la cirrosi dovuta a deficit di  $\alpha$ -1-antitripsina i dati provenienti da studi di coorte sono insufficienti per valutare accuratamente l'incidenza del tumore. Dati recenti hanno suggerito che il rischio di HCC nell'epatite autoimmune con cirrosi è alto abbastanza da giustificare la sorveglianza. Tuttavia, l'incidenza registrata nelle cirrosi legate ad epatiti autoimmuni è di circa 1.1% per anno e tale valore non raggiunge il cut-off di 1.5% al quale la sorveglianza ha un buon rapporto costo-efficacia. Pertanto le linee guida non fanno alcuna raccomandazione specifica circa la sorveglianza in questo gruppo (Bruix J e Sherman M, 2011).

- *Epatiti virali croniche trattate*

I recenti progressi nella terapia delle epatiti hanno condotto ad un tasso relativamente alto di clearance virale o soppressione nei pazienti trattati per epatite cronica B o C. Un trattamento di successo, che conduca ad una risposta virologica prolungata nell'epatite cronica C, ed alla sierconversione dell'HBsAg o alla soppressione prolungata dell'HBV-DNA nell'epatite cronica B, riduce, ma non elimina il rischio di epatocarcinoma (Fattovich G, Gastroenterology 1997; Craxì A e Cammà C, 2005; Sung JJ, 2008). Pertanto, la sorveglianza è raccomandata sia per i pazienti con epatite cronica B trattata che rimangono a rischio di sviluppare l'HCC per i fattori di base, anche dopo il raggiungimento di una risposta virologica prolungata, sia per i pazienti con epatite cronica C e cirrosi nonostante l'ottenimento della clearance virale grazie alla terapia. Va notato che i pazienti con epatite cronica B o C inattiva, grazie al trattamento o spontaneamente, possono mostrare una regressione della fibrosi sufficiente a suggerire una reversione della cirrosi. Il rischio di HCC in questi pazienti probabilmente non decresce in proporzione al miglioramento della fibrosi. Vi sono molte teorie sulla patogenesi dell'epatocarcinoma in questi pazienti, ma un fattore comune sembra essere la necessità di ripetuti cicli di necrosi e rigenerazione. I passi necessari per iniziare il pathway carcinogenetico probabilmente richiedono molti anni prima che la malattia divenga inattiva e così la minaccia di HCC permane anche se la fibrosi diminuisce. I pazienti che eliminano il virus prima della sviluppo di cirrosi hanno, invece, una probabilità molto bassa di sviluppare l'epatocarcinoma e ciò non giustifica la sorveglianza.

- *Altri fattori predittivi di HCC*

Nei pazienti a rischio di carcinoma epatocellulare sono stati osservati dei fattori che si associano ad un rischio aumentato di sviluppare il tumore. Questi includono un'alta concentrazione di AFP, la presenza di noduli macrorigenerativi, una rigenerazione irregolare (marginari dei noduli rigenerativi irregolari), la displasia a piccole e grandi cellule (Colombo M, 1991; Hytioglou P, 1995; Shibata M, 1998; Degos F, 2000). Sebbene questi pazienti abbiano un rischio maggiore di sviluppare l'HCC saranno probabilmente già inseriti in programmi di sorveglianza per altri riconosciuti fattori di rischio, quali la cirrosi o l'epatite cronica B. Il rischio aumentato, tuttavia, non richiede un cambiamento nel protocollo della sorveglianza.

Le raccomandazioni per i soggetti da sottoporre a sorveglianza sono ampiamente basate su modelli di studio che dimostrano uno specifico cut-off d'incidenza di HCC al quale la sorveglianza raggiunge un buon rapporto costo-efficacia (Sarasin FP, 1996; Lin OS, 2004). Tuttavia, anche entro questi gruppi vi sono individui il cui rischio di cancro è basso e per i quali la sorveglianza potrebbe non essere necessaria.

<b>SORVEGLIANZA RACCOMANDATA</b>		
<b>Gruppi di popolazione</b>	<b>Soglia di incidenza per l'efficacia della sorveglianza (&gt; 0.25LYG) (%/anno)</b>	<b>Incidenza di HCC</b>
Maschi asiatici carriers B over 40	0.2	0.4-0.6
Femmine asiatiche carriers B over 50	0.2	0.3-0.6
Carriers B con storia familiare di HCC	0.2	Incidenza più alta che in assenza di storia familiare
Africani/Nord Americani bianchi con epatite B	0.2	HCC insorgente ad un'età più giovane
Cirrotici HBV-infetti	0.2-1.5	3.8
Cirrosi HCV-correlata	1.5	3.5
Cirrosi biliare primitiva in stadio 4	1.5	3.5
Emocromatosi genetica e cirrosi	1.5	Ignota, ma probabilmente > 1.5
Deficit di alfa1antitripsina e cirrosi	1.5	Ignota, ma probabilmente > 1.5
Altre cirrosi	1.5	Ignota
<b>Sorveglianza a beneficio incerto</b>		
Carriers B under 40 (M) o 50 (F)	0.2	< 0.2
Epatite C e fibrosi in stadio 3	1.5	< 1.5
NAFLD non cirrotica	1.5	< 1.5

TABELLA 1: Gruppi per i quali la sorveglianza è raccomandata o in cui il rischio di HCC è aumentato, ma per i quali l'efficacia della sorveglianza non è stata dimostrata. (Da Bruix J e Sherman M, *Hepatology* 2011).

## 4.2 TEST DI SORVEGLIANZA

I test che possono essere impiegati nell'ambito della sorveglianza per l'epatocarcinoma includono analisi sierologiche e tecniche di imaging. La metodica di imaging più ampiamente utilizzata per la sorveglianza è l'ecografia. All'esame ecografico il carcinoma epatocellulare può presentarsi come una massa solitaria, come multipli noduli, o con un pattern infiltrativo diffuso. Sebbene l'HCC possa essere ipoecogeno, isoecogeno o iperecogeno, la maggior parte degli HCC di più piccole dimensioni sono ipoecogeni rispetto al parenchima epatico. Un piccolo e sottile alone ipoecogeno può notarsi attorno ad un piccolo nodulo tumorale (Brunello F, 2007). Occasionalmente, un piccolo nodulo può diventare iperecogeno per trasformazione grassa al suo interno producendo un aspetto ecografico simile a quello di un emangioma. I tumori di maggiori dimensioni tendono ad avere aspetti più eterogenei all'ecografia. Aree di aumentata ecogenicità possono divenire visibili secondariamente ad emorragia, fibrosi o infiltrazione grassa focale. Le calcificazioni sono infrequenti nell'epatocarcinoma, ma talvolta si riscontrano nel tipo fibrolamellare, che tipicamente mostra una cicatrice centrale.

Gli studi inerenti l'ecografia come modalità di screening hanno mostrato valori variabili di sensibilità, specificità e valori predittivi per l'identificazione dell'HCC. Sherman M et al. (1995) hanno riportato che l'ecografia ha una sensibilità del 71.4%, una specificità del 93.8%, con solo il 14% di valore predittivo positivo, come test di screening in carriers HBsAg cronici. Chalasani N et al. (1999) hanno confrontato la sensibilità dell'ecografia e della TC in un programma di screening ed hanno trovato una sensibilità molto più bassa dell'ecografia (59%), rispetto alla TC (91%). Studi recenti hanno utilizzato come gold standard l'analisi di fegati espantati ottenendo dati discordanti. Gambarin-Gelwan M et al. (2000) hanno riportato sensibilità simile per ecografia e TC: 58% per l'ecografia e 53% per la TC. Successivamente, un lavoro di Yao FY et al. (2001) ha riportato una sensibilità del 79,4%, 87,6% e 88,9% rispettivamente per ecografia, TC ed RMN. Tali dati riflettono probabilmente un avanzamento delle tecniche d'immagine, che tuttavia mostrano ancora bassa sensibilità (42,9%) nel diagnosticare piccoli noduli satelliti. Al contrario, Teefey SA et al. (2003) hanno ottenuto una sensibilità dell'ecografia (89%) molto più alta di quella della TC (67%) e della RMN (56%). Tuttavia, si dovrebbe comprendere che è molto difficile comparare diversi studi a causa della differenza nelle attrezzature, nelle tecniche e

nei protocolli utilizzati. Inoltre, la differenza nell'habitus corporeo tra asiatici ed occidentali può tradursi in sensibilità e specificità diverse nei diversi studi.

	ECO		TC		RMN	
	Sens %	Spec %	Sens %	Spec %	Sens %	Spec%
Miller 1994	-	-	68	81	-	-
Taourel 1995	-	-	53	-	-	-
Gambarin-Gelwan	58	94	53	94	91	-
Yao 2001 <sup>a</sup>	79.4	-	87.6	-	88.9	-
Yao 2001 <sup>b</sup>	34.3	-	27.6	-	42.9	-
Llovet 2002	-	-	-	-	100	95
Teefey 2003	89	51-45	67-55	-	56-50	-

<sup>a</sup> *lesione principale*

<sup>b</sup> *nodulo satellite*

TABELLA 2: *Sensibilità e specificità delle tecniche di imaging nell'identificazione dell'HCC nel cirrotico. (Da Bolondi L, J Hepatol 2003).*

Complessivamente l'ecografia ha un'accettabile accuratezza diagnostica, quando usata come test di screening (sensibilità: 58-89%; specificità: >90%) (Kim CK, 2001; Bolondi L, 2003). Una più recente meta-analisi, che ha raccolto 19 studi, ha mostrato che la sorveglianza mediante ecografia ha individuato la maggior parte degli HCC prima della loro manifestazione clinica, con una sensibilità cumulativa del 94%. Tuttavia, l'ecografia ha minor efficacia nel rilevare l'HCC in stadio precoce, con una sensibilità di solo il 63% (Singal A, 2009). In un recente studio giapponese, però, la sorveglianza con attento esame ecografico, eseguito da operatori altamente competenti, ha dato come risultato una dimensione media dei tumori individuati di  $1.6 \pm 0.6$  cm, con una quota di casi con dimensioni superiori ai 3 cm inferiore al 2% (Sato T, 2009).

L'ampio uso dell'ecografia si fonda anche sull'assenza di rischio, la non invasività, la buona accettabilità da parte dei pazienti ed i costi relativamente moderati. Ciononostante, l'individuazione ecografica di un epatocarcinoma su di un tessuto epatico cirrotico è una questione impegnativa. La cirrosi epatica è caratterizzata da setti fibrotici e noduli rigenerativi. Queste caratteristiche producono un pattern grossolano all'ecografia che può ostacolare l'identificazione di piccoli tumori. A causa di queste limitazioni la performance dell'ecografia nel rilievo precoce dell'epatocarcinoma è altamente dipendente dalla competenza dell'operatore e dalla qualità dell'attrezzatura. Pertanto è raccomandata un formazione specifica per gli ecografisti. La recente introduzione di agenti di contrasto ecografici non ha dimostrato di poter incrementare la capacità dell'ecografia di rilevare piccoli HCC (Lencioni R, 2008).

Con i progressi tecnologici nella TC e nella RMN e con l'uso della TC spirale multidetettore e dei protocolli di RMN a sequenza rapida, l'identificazione delle più piccole neoformazioni epatiche è divenuta più facile. Non vi sono però dati a supporto dell'uso della TC multidetettore o della RMN dinamica nella sorveglianza. L'esperienza pratica suggerisce che il tasso di risultati falsi-positivi che indurrebbero ad ulteriori indagini sarebbe molto alto e con uno sfavorevole rapporto costo-efficacia. Nel caso della TC, vi sarebbe, inoltre, un'esposizione ad alti livelli di radiazione con potenziale rischio di carcinogenesi a lungo termine. Queste tecniche potrebbero essere prese in considerazione quando obesità, gas intestinali e deformità della parete toracica ostacolano un'adeguata valutazione ecografica. Ma anche in queste circostanze, il rischio di radiazioni dovuto alla ripetuta esposizione alla TC e l'alto costo della RMN rendono discutibile il loro utilizzo nella sorveglianza a lungo termine.

Per i motivi esposti l'ecografia mantiene, a livello mondiale, un posto preferenziale nello screening di routine per il carcinoma epatocellulare nei pazienti con epatopatia nota.

Tests sierologici quali l'alfa-fetoproteina (AFP), la de-gamma-carbossil-protrombina (DCP) -anche nota come protrombina indotta dall'assenza di vitamina K II (PIVKA II)-, il rapporto tra AFP glicosilata (frazione L3) e AFP totale, l'alfa-fucosidasi ed il glipicano 3, sono stati studiati o sono ancora in corso di valutazione per la diagnosi precoce dell'epatocarcinoma (Marrero J, 2003; Lok AS, 2009).

La AFP è il biomarcatore più ampiamente testato per l'HCC. Izzo F et al. (1999) hanno riportato che la sensibilità e la specificità dell'AFP erano, rispettivamente, del 13.8% e 97.4% con un cut-off di 200 ng/ml, e del 62.1% e 78.3% con un cut-off di 20 ng/ml. In un altro studio, Tong MJ et al. (2001) hanno mostrato che il valore predittivo positivo dell'AFP per la diagnosi precoce dell'epatocarcinoma era solo del 12% o meno e le massime sensibilità e specificità raggiunte erano, rispettivamente, del 65% e 90%. Altri studi hanno mostrato che il cut-off di 20 ng/ml per l'AFP presenta una bassa sensibilità per la diagnosi di epatocarcinoma (<50%) (Caturelli E, 2002; Bolondi L, 2003). Valori superiori a 200 ng/ml, benché fortemente suggestivi per il carcinoma epatocellulare, sono riscontrabili solo nel 25% dei casi ed ancor più raramente nei casi diagnosticati precocemente. È noto che livelli di AFP persistentemente elevati sono un fattore di rischio per lo sviluppo di HCC e possono essere usati per aiutare a definire la popolazione a rischio (Tsukuma H, 1993). Una precisazione da fare è che l'AFP è stata testata quasi sempre in contesti diagnostici piuttosto che di sorveglianza. Ciò è importante in quanto la sua performance come test diagnostico non può essere estrapolata in un contesto di

sorveglianza. Quando associati all'ecografia, i livelli di AFP sono in grado di aumentare il tasso di identificazione dell'HCC solo nel 6-8% dei casi non precedentemente identificati all'ecografia, comportando, invece, un notevole incremento dei falsi-positivi e dei costi (Singal A, 2009). Come test sierologico per la sorveglianza l'AFP ha, pertanto, una performance subottimale e le ragioni di ciò sono duplici. In primo luogo, i livelli di AFP fluttuanti nei pazienti cirrotici potrebbero essere il riflesso della riaccensione dell'infezione da parte dell'HBV o dell'HCV, di un'esacerbazione della sottostante epatopatia o dello sviluppo dell'epatocarcinoma (Di Bisceglie AM, 2005). In secondo luogo, solo una piccola parte di tumori in stadio precoce (10-20%) si presenta con livelli sierici di AFP anormali, fatto che recentemente è stato messo in correlazione con una sottoclasse molecolare di HCC aggressiva (classe S2, EpCAM positiva) (Yamashita T, 2008).

Tutti gli altri marcatori sierologici sono stati solitamente valutati, da soli o in associazione, in contesto diagnostico, piuttosto che di sorveglianza, in cui la prevalenza di epatocarcinoma è notevolmente più alta di quella attesa in un contesto di sorveglianza (EASL, 2012). In quest'ultimo contesto, la DCP non ha fornito sostanziali vantaggi rispetto all'AFP (Koike Y, 2001). Inoltre, i livelli di DCP sono stati associati ad invasione portale e ad uno stadio tumorale avanzato, fatto che preclude l'uso di questo marcatore per la diagnosi precoce (Koike Y, 2001). Una situazione simile si verifica con la frazione L3 dell'AFP (Sterling RK, 2007). Le linee-guida giapponesi, tuttavia, suggeriscono di usare almeno due dei tre marcatori sierologici (AFP, DCP, AFP-L3) nella sorveglianza, poiché ciò comporta comunque un aumento della sensibilità (Kudo M, 2011). Molti marcatori sono tutt'ora in corso di valutazione.

In conclusione, l'ecografia può essere considerata il test più appropriato per realizzare la sorveglianza. L'associazione con l'AFP non è raccomandata, poiché il guadagno del 6-8% nel tasso di identificazione del tumore non controbilancia l'aumento dei risultati falsi-positivi, conducendo, invece, ad un incremento di circa l'80% del costo per ogni piccolo HCC diagnosticato (Singal A, 2009).

#### 4.3 INTERVALLO DI SORVEGLIANZA

L'intervallo ideale di sorveglianza per l'epatocarcinoma dovrebbe essere dettato da due principali caratteristiche: il tasso di crescita tumorale fino alla soglia della sua rilevanza all'imaging e l'incidenza del tumore nella popolazione bersaglio. Alla luce della conoscenze disponibili sul tempo medio di raddoppiamento del volume dell'HCC (Barbara

L, 1992) un intervallo di 6 mesi rappresenta una scelta ragionevole. Il confronto di coorti sottoposte a sorveglianza con schemi di 6 versus 12 mesi ha fornito risultati simili (Santagostino E, 2003), mentre un altro studio ha evidenziato una migliore performance in termini di diagnosi precoce e sopravvivenza con un intervallo di 6 mesi (Santi V, 2010). Una meta-analisi di studi prospettici ha mostrato che la sensibilità cumulativa della sorveglianza basata sull'ecografia scende dal 70% con un programma a 6 mesi al 50% con un programma annuale (Singal A, 2009).

Infine, studi sul rapporto costo-efficacia hanno mostrato che la sorveglianza semestrale basata sull'ecografia migliora l'aspettativa di vita corretta per la qualità ad un costo ragionevole (Andersson KL, 2008). Considerando, però, che la variabilità tra i pazienti è molto ampia le linee-guida giapponesi propongono, invece, un intervallo di sorveglianza più stretto, di 3-4 mesi, per le popolazioni a rischio molto elevato (individuate nelle cirrosi HBV ed HCC-correlate) (Kudo M, 2011). L'unico studio randomizzato che ha confrontato programmi di sorveglianza ogni 3 mesi versus 6 mesi non ha trovato alcuna differenza (Trinchet JC, 2011).

L'intervallo di sorveglianza è determinato dal tasso di crescita del tumore e non dal grado di rischio. Questo è un importante concetto perché significa che l'intervallo di sorveglianza non necessita di essere accorciato per i pazienti che sono considerati a più alto rischio. Tuttavia, è importante fare una distinzione nell'ambito dei pazienti sottoposti a sorveglianza tra quelli in cui, sebbene sia riconosciuto un alto rischio non vi è ragione di sospettare a priori un HCC, e quelli in cui i tests di sorveglianza sono risultati anormali e vi è il timore che un epatocarcinoma possa già essere presente. Questi pazienti dovrebbero ricevere un follow-up intensificato. Al contrario, l'allungamento dell'intervallo di sorveglianza per i pazienti a più basso rischio di HCC comporterebbe una diagnosi ad uno stadio più tardivo, annullando così probabilmente i benefici della sorveglianza.

#### 4.4 EFFICACIA DELLA SORVEGLIANZA

Sono stati condotti due RCT sulla sorveglianza per epatocarcinoma. In uno studio di popolazione controllato randomizzato sono state messe a confronto la sorveglianza (ecografia ed AFP ogni 6 mesi) e l'assenza di sorveglianza in una popolazione di pazienti Cinesi con epatite cronica B, a prescindere dalla presenza di cirrosi (Zhang BH, 2004). Nonostante l'aderenza subottimale al programma di sorveglianza (55%), la mortalità per HCC è diminuita del 37% nel braccio in sorveglianza in conseguenza dell'aumentata

possibilità di praticare il trattamento resettivo nei casi identificati. L'altro studio di sorveglianza basato sull'AFP, realizzato anch'esso in Cina su soggetti ad alto rischio (maschi, HBsAG+), non ha evidenziato differenze nella sopravvivenza complessiva (Chen JG, 2003).

Altri tipi di evidenze provengono da studi di popolazione e di coorte e da analisi costo-efficacia che evidenziano quasi sempre il beneficio di schemi regolari di ecografia (Barbara L, 1992; Santagostino E, 2003; Trevisani F, 2007; Makuuchi M, 2008; Singal A, 2009; Trinchet JC, 2011). Tuttavia, questi studi sono eterogenei tanto per lo stadio, quanto per l'eziologia dell'epatopatia, e per i protocolli di sorveglianza. Inoltre, quasi tutti soffrono di biases metodologici, quali il lead-time bias (apparente miglioramento della sopravvivenza dovuto alla diagnosi anticipata) ed il length-time bias (sovra-rappresentazione di tumori a lenta crescita). Mentre l'ultimo bias è inevitabile in questo genere di studi, il lead-time bias può essere minimizzato mediante formule di correzione ed una volta fatto ciò, il vantaggio della sorveglianza persiste (Trevisani F, 2004).

## 5. DIAGNOSI

Nell'ambito dei programmi di sorveglianza, il processo diagnostico prende inizio in occasione del riscontro di risultati anormali ai test di screening. Nel caso dell'epatocarcinoma, risultati anormali all'ecografia consistono sia in una lesione focale di nuova identificazione, sia in una lesione epatica nota che cresce e/o modifica il suo aspetto ecografico (Lencioni R, Semin Liver Dis 2010).

Oggi la diagnosi precoce di epatocarcinoma è fattibile nel 30-60% dei casi nelle nazioni sviluppate e questo consente l'applicazione di trattamenti curativi. Infatti, mentre i tumori con diametro <2 cm rappresentavano meno del 5% dei casi nei primi anni '90 in Europa, oggi rappresentano oltre il 30% dei casi in Giappone. Ci si attende che questo trend continui a crescere in parallelo all'attuazione estesa di programmi di sorveglianza nelle nazioni sviluppate (Llovet JM e Bruix J, J Hepatol 2008). Tuttavia, l'identificazione di questi piccoli noduli di circa 2 cm di diametro pone una sfida diagnostica in quanto essi sono difficili da caratterizzare sia all'esame radiologico che patologico (Bolondi L, 2005, Forner A, 2008; Roskams T, 2010).

La corretta definizione dei noduli come lesioni pre-neoplastiche o early HCC ha delle implicazioni critiche. Le lesioni displastiche dovrebbero essere tenute sotto controllo con studi di imaging regolari, dato che almeno un terzo di queste sviluppa un fenotipo maligno

nel tempo (Borzio M, 2003). Per contro, i tumori precoci vanno trattati con procedure potenzialmente curative, quali la resezione, il trapianto e l'ablazione percutanea. E' necessario, pertanto, identificare gli strumenti migliori per caratterizzare queste lesioni.

## 5.1 DIAGNOSI NON INVASIVA

La diagnosi accurata dei piccoli noduli epatici è di massima importanza. Fino al 2000 la diagnosi si è basata sulla biopsia. Questo approccio ha delle limitazioni legate alla fattibilità della procedura dovute alla sede ed al rischio di complicazioni quali il sanguinamento o la disseminazione di cellule tumorali lungo il tragitto dell'ago (Stigliano R, 2007). Inoltre, l'accuratezza raggiungibile nella differenziazione di noduli ad alto grado di displasia ed early HCC è limitata poiché l'invasione stromale, il più rilevante criterio distintivo, è difficile da riconoscere anche per un anatomopatologo esperto (Roskams T, 2010).

Nel 2001, un comitato di esperti in epatocarcinoma riunitosi a Barcellona ha formulato per la prima volta, tramite l'EASL, dei criteri non invasivi per la diagnosi di epatocarcinoma basati sulla combinazione dei rilievi di imaging e di laboratorio (Bruix J, 2001). Inizialmente, un solo comportamento radiologico dinamico (l'assunzione di m.d.c. in fase arteriosa alla TC, RMN, angiografia o ecografia) aveva costituito il fulcro della diagnosi radiologica dell'early cancer. Nei pazienti cirrotici con noduli >2 cm, rilievi concordanti a due metodiche di imaging erano considerati diagnostici o, alternativamente, la positività ad una tecnica di imaging associata a livelli di AFP >400 ng/ml. In tutte le altre circostanze la biopsia era necessaria.

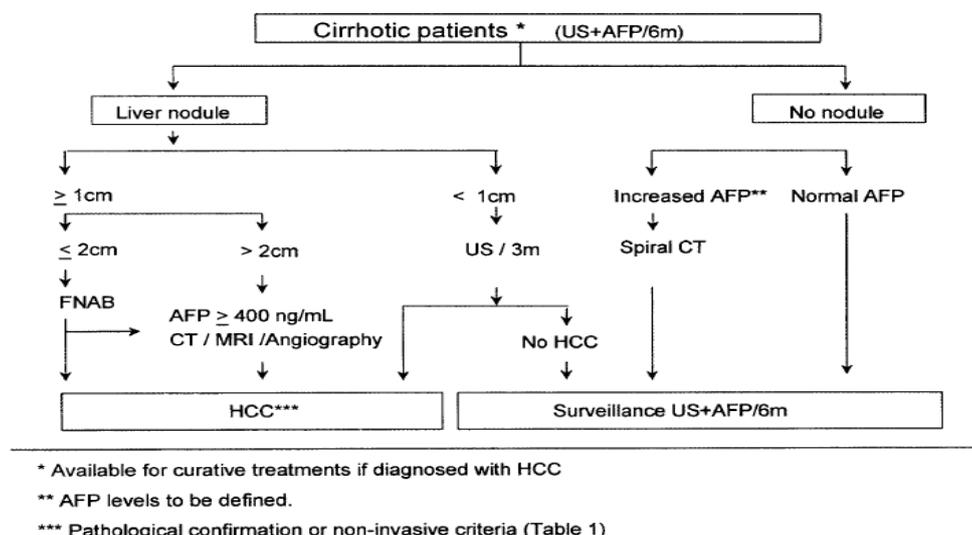


FIGURA 13: Strategie diagnostiche secondo le linee guida della EASL Conference di Barcellona 2000. (Da Bruix J et al. J Hepatol 2001).

Nel 2005, le linee-guida dell'AASLD hanno adottato un nuovo segno distintivo per la diagnosi dell'epatocarcinoma, ovvero l'assunzione del mezzo di contrasto in fase arteriosa ed il washout in fase venosa/tardiva (Bruix J e Sherman M, 2005). La presenza di ipervascolarità arteriosa da sola è stata considerata insufficiente, mentre la presenza di washout venoso è divenuta essenziale. In fase arteriosa l'HCC si evidenzia meglio del fegato circostante perché fornito solo da sangue arterioso, contenente l'agente di contrasto, a differenza del parenchima epatico il cui flusso arterioso è diluito dal sangue venoso, che non lo contiene. In fase venosa l'HCC si evidenzia meno rispetto al parenchima circostante perché il sangue arterioso che scorre entro la lesione non contiene più il mezzo di contrasto, che, ora, si concentra prevalentemente nei vasi portalici che irrorano il fegato e di cui il carcinoma è privo. Questo aspetto è noto come washout, sebbene il termine non descriva realmente la sequenza di eventi. In fase tardiva la presenza del washout persiste e talvolta è presente solo in questa fase. La presenza di captazione arteriosa seguita da washout è altamente specifica per HCC (Yu JS, 1999; Forner A, 2008). Per documentare correttamente l'esistenza di HCC è richiesto, pertanto, uno studio in 4 fasi: pre-contrasto, arteriosa, venosa, tardiva. La diagnosi non invasiva è stabilita sulla base di una sola tecnica di imaging nei noduli superiori ai 2 cm che presentano il segno radiologico distintivo dell'HCC e di due tecniche concordanti nei noduli di 1-2 cm di diametro (TC, RMN, CEUS), senza necessità di ricorrere alla biopsia.

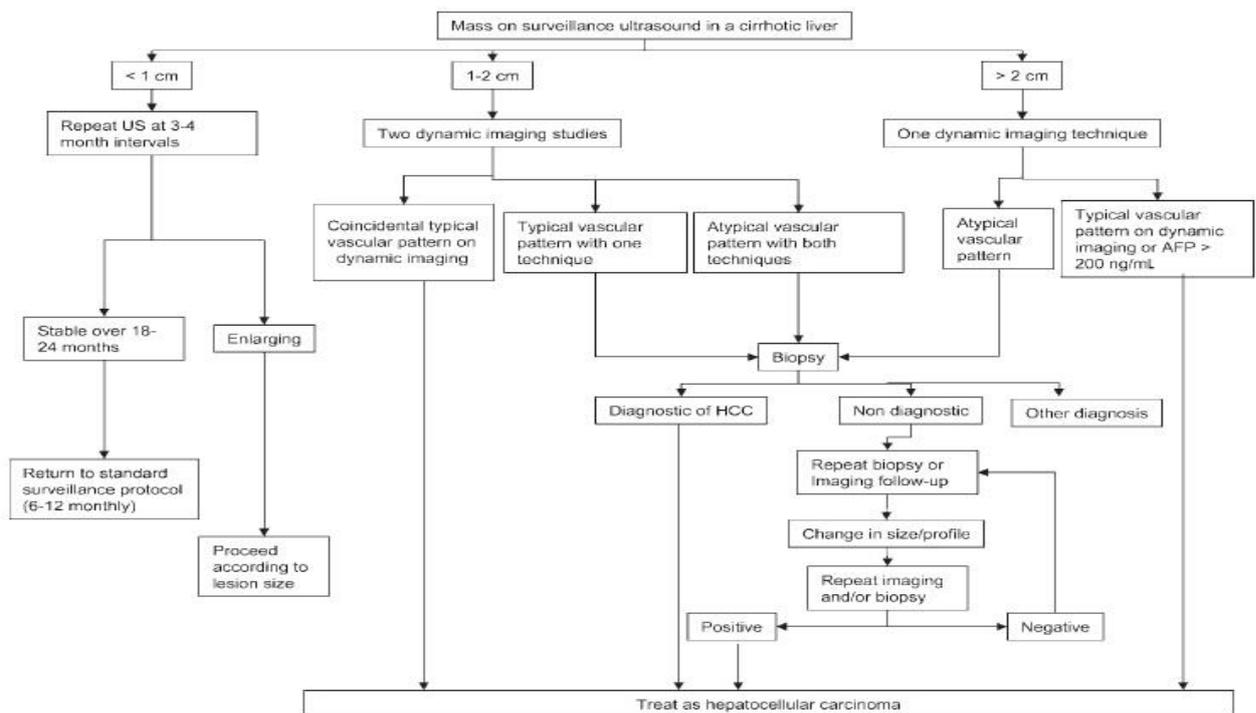


FIGURA 14: Strategie diagnostiche secondo le linee guida dell'AASLD 2005. (Da Bruix J e Sherman M, Hepatology 2005).

Un recente aggiornamento (2010) delle linee-guida AASLD ha proposto che una metodica di imaging che mostri il segno radiologico distintivo dell'HCC sia sufficiente per la diagnosi di tumori di 1-2 cm di diametro (Bruix J e Sherman M, 2011). I livelli di AFP sono fuoriusciti dalla schema diagnostico. L'AFP è stata a lungo usata per la diagnosi del carcinoma epatocellulare. Dati recenti hanno suggerito che il suo uso come test diagnostico è meno specifico di quanto una volta pensato. L'AFP può essere elevata nel colangiocarcinoma intraepatico (ICC) ed in alcune metastasi da cancro del colon (Sato Y, 1994; Adachi Y, 2003). Pertanto, la scoperta di una lesione in un fegato con alti livelli di AFP non indica automaticamente un HCC. L'ICC è anche più comune nei cirrotici che nei non cirrotici. Sebbene l'incidenza di ICC sia molto più bassa di quella dell'HCC, il fatto che entrambi siano più comuni in presenza di cirrosi significa che deve essere prestata attenzione nel distinguerli, date le differenze nel trattamento e nell'outcome. Dal momento che l'AFP può essere elevata in entrambe le condizioni, il suo uso non è stato più raccomandato per la diagnosi dell'epatocarcinoma. Perciò, la diagnosi di HCC deve poggiare sugli aspetti radiologici e sull'istologia.

Va sottolineato che, al contrario, le linee guida-giapponesi assumono come diagnostico per HCC un valore di AFP superiore ai 200 ng/ml, purchè osservato in un contesto clinico di cirrosi o epatite cronica (Kudo M, 2011).

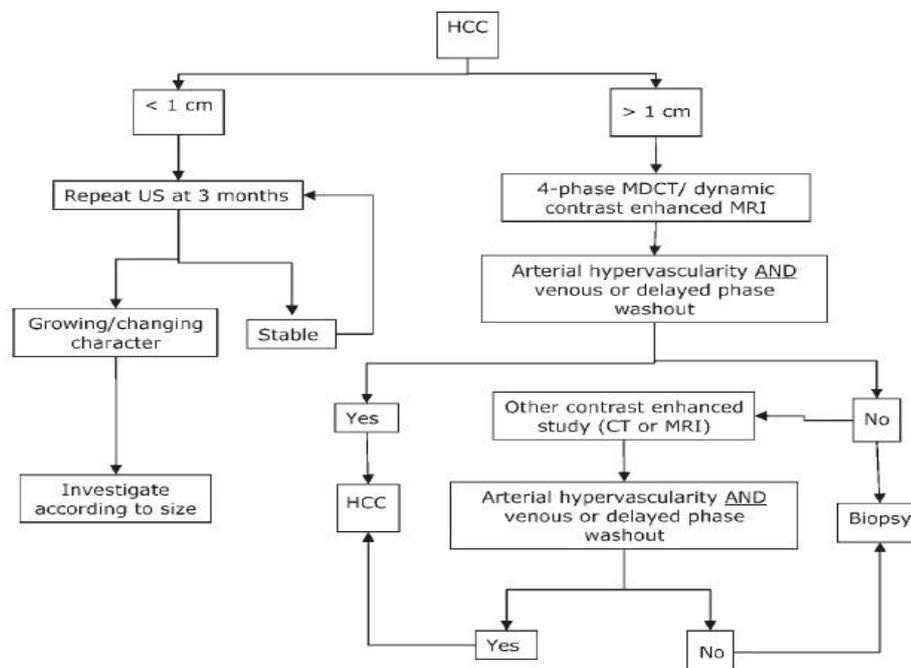


FIGURA 15: Strategie diagnostiche secondo le linee guida dell'AASLD 2010. (Da Bruix J e Sherman M, Hepatology 2011).

Diversi studi basati sull'uso di TC, RMN e CEUS hanno mostrato che l'uso di una singola metodica contrastografica ha un valore predittivo positivo più basso dell'uso di due tecniche, sebbene tale valore sia ancora superiore al 90% (Forner A, 2008; Khalili K, 2008). Altri studi hanno, inoltre, mostrato che l'aspetto tipico di ipervascolarità arteriosa e washout venoso è così altamente specifico che è necessario un singolo studio per porre diagnosi quando questo aspetto è presente (Khalili K, 2008; Sangiovanni A, 2010). La sensibilità dell'uso del doppio imaging per la diagnosi è risultata tra 23 e 37% e la specificità del 100%. Inoltre, questi studi hanno mostrato che l'imaging sequenziale può essere usato per ridurre la necessità della biopsia (Khalili K, 2008; Sangiovanni A, 2010). Usando indagini sequenziali, piuttosto che due metodiche per la ricerca della tipicità, si ottiene un miglioramento della sensibilità a circa 74-80%, ma la specificità cade all'89-97%. Tuttavia, se le lesioni atipiche sono biotizzate la specificità è ristabilita al 100%. Studi recenti hanno mostrato che il colangiocarcinoma intraepatico (ICC) non mostra washout in fase venoso-tardiva alla RMN, sottolineando ulteriormente la specificità di questo profilo negli stadi precoci (Rimola J, 2009). Allo stesso tempo, però, falsi-positivi per HCC sono stati descritti alla CEUS in pazienti con ICC, successivamente diagnosticato alla biopsia (Vilana R, 2010) e, pertanto, tale metodica non è stata più raccomandata per la diagnosi di epatocarcinoma. Qualora l'aspetto tipico non sia presente alle indagini contrastografiche, bisogna procedere alla valutazione istologica.

Nell'aggiornamento del 2012 delle linee-guida dell'EASL sono state poste due questioni in relazione ai criteri per la diagnosi non invasiva di epatocarcinoma. In primo luogo, quali dati rendono affidabile l'accuratezza della diagnosi non invasiva per i noduli di 1-2 cm di diametro. In secondo luogo, quali tecniche di imaging possono essere impiegate. In relazione al primo problema, due studi prospettici hanno mostrato che l'uso di due metodiche di imaging costituisce un approccio con alto valore predittivo positivo ed alta specificità (Bruix J e Sherman M, 2005; Forner A, 2008). In uno studio comprendente 89 casi di noduli di dimensioni comprese tra 0.5 e 2 cm, individuati in programmi di sorveglianza in pazienti cirrotici, è stato messo in evidenza che i criteri non invasivi per la diagnosi di epatocarcinoma sono accurati con una specificità del 100% (Forner A, 2008). Sfortunatamente, una specificità assoluta ha lo svantaggio di una bassa sensibilità (30%), che significa che i due terzi dei noduli richiedono una conferma istologica. L'altro studio ha suggerito che l'impiego di un algoritmo sequenziale manterrebbe un'assoluta specificità, ma incrementerebbe la sensibilità, con un significativo risparmio in termini di procedure biotiche per i noduli di 1-2 cm (Sangiovanni A, 2010). Uno studio retrospettivo che riportava l'accuratezza diagnostica della RMN in un'ampia serie di pazienti trapiantati

ha mostrato un tasso complessivo di falsi-positivi superiore al 10% quando usata come singola tecnica di imaging (Yu NC, 2011). Infine, un recente studio prospettico, che valutava l'accuratezza delle tecniche di imaging nei noduli di 1-2 cm, identificati all'ecografia, ha mostrato un tasso di falsi-positivi -quasi sempre dovuti all'alto grado di displasia dei noduli- superiore al 10% sia per una che per due tecniche di imaging, con una specificità, rispettivamente, di 81% e 85% (Serstè T, 2011). Pertanto, la diagnosi non invasiva delle lesioni di 1-2 cm rimane una questione impegnativa, con dati non inequivocabili in studi di validazione prospettica. Sulla scorta di questi dati l'EASL considera l'inserimento della regola di una singola tecnica allo scopo di avere un consistente approccio nel campo, ma raccomanda una più cauta applicazione di questa regola in contesti subottimali, ove la tecnologia a disposizione o le competenze locali non siano ad eccelsi livelli, prediligendo l'uso della regola delle due tecniche concordanti, in quanto le conseguenze negative di un alto tasso di diagnosi false-positive ridurrebbero i benefici.

In relazione alla questione circa le tecniche da impiegare si deve segnalare che il segno radiologico distintivo dell'HCC è basato sulla performance vascolare dinamica del tumore. Questo limita l'uso della CEUS perché le microbolle, impiegate come agenti di contrasto in tale metodica, rimangono confinate nello spazio intravascolare, a differenza del mezzo di contrasto iodato della TC o del gadolinio della RMN, che sono rapidamente eliminati dal compartimento ematico nello spazio extracellulare. Di conseguenza, per la diagnosi non invasiva di epatocarcinoma le indagini di imaging raccomandate sono la TC e/o la RMN di ultima generazione, mentre la CEUS non è più menzionata.

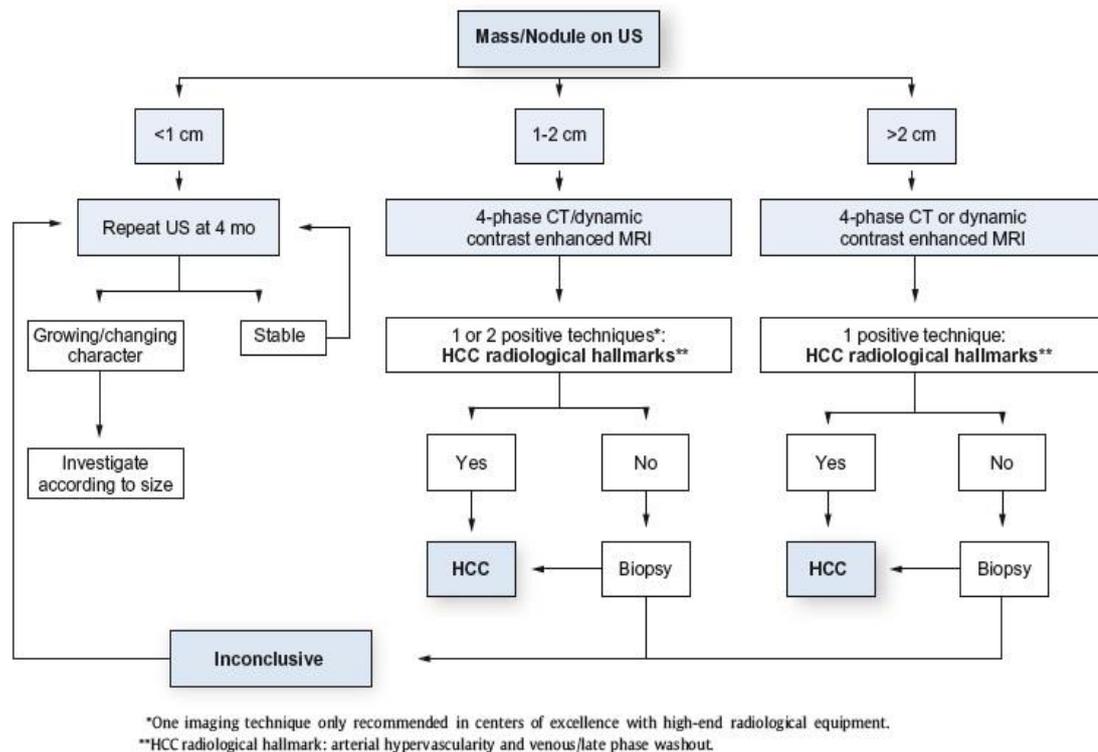


FIGURA 16: Strategie diagnostiche secondo le linee guida dell'EASL 2012. (Da EASL, *J Hepatol* 2012).

Le linee guida orientali riconoscono, invece, un importante ruolo diagnostico alla CEUS, confermato anche nelle indicazioni dell' AISF del 2012.

Il valore della CEUS rimane, pertanto, controverso. Molti studi hanno mostrato che l'accuratezza diagnostica dell'ecografia è simile a quella di TC e RMN (Lencioni R, 2008). Degli studi hanno mostrato una concordanza nella caratterizzazione della vascolarizzazione dei tumori superiore all'80% tra CEUS e TC elicoidale con m.d.c. Il tasso di concordanza non sembra essere correlato alle dimensioni del nodulo (<2 cm vs 2-3 cm) (Bolondi L, 2005; Catala V, 2006). Un recente studio ha, però, mostrato che lesioni diverse dell'epatocarcinoma, quali il colangiocarcinoma, presentano un assorbimento omogeneo del m.d.c. alla CEUS seguito da washout, ovvero un pattern vascolare che riproduce il segno distintivo dell'HCC (Vilana R, 2010). Alcuni agenti di contrasto a microbolle mostrano un accumulo più organo-specifico. Levovist e Sonazoid tendono ad accumularsi nel fegato e mostrano un enhancement parenchimale ritardato. Degli studi hanno mostrato l'elevata accuratezza di alcuni di questi agenti nel differenziare i noduli epatici benigni da quelli maligni (von Herbay A, 2002; von Herbay A, 2004), sebbene la TC sembri essere leggermente più sensibile nell'identificare il flusso arterioso (Pompili M,

2007).

Le lesioni profonde localizzate nel parenchima epatico sottodiaframmatico si trovano in aree di difficile esplorazione ecografica. La loro posizione comporta la soppressione di segnali fondamentali, conducendo ad una bassa qualità d'immagine sulla scala dei grigi, prima della somministrazione del mezzo di contrasto. Inoltre, esse sono solitamente valutate durante un'apnea inspiratoria, che alcuni pazienti non sono in grado di mantenere per più di pochi secondi. Di conseguenza, un imaging continuo privo di artefatti per tutta la durata della fase arteriosa può non essere possibile. Come alcuni autori hanno notato, discrepanze tra TC e CEUS potrebbero essere correlate a differenze nella distribuzione vascolare degli agenti di contrasto dell'ecografia e della TC o riflettere la superiorità dell'imaging continuo, in tempo reale, dell'ecografia nell'identificazione di segnali di flusso molto precoci, di breve durata (Bolondi L, 2005; Catala V, 2006).

Le linee guida giapponesi riconoscono un ruolo importante alla CEUS specificamente eseguita con Sonazoid, quale agente di contrasto. Recentemente, è stata sviluppata una nuova procedura (*defect-reperfusion imaging*) in cui vengono sfruttati congiuntamente l'immagine stabile del parenchima epatico ottenibile nella fase di Kupffer del Sonazoid e l'imaging real-time del flusso sanguigno, allo scopo di facilitare una diagnosi locale accurata dell'HCC (Kudo M, 2011).

Nel corso della CEUS con Sonazoid si possono distinguere due fasi: la fase vascolare e la fase post-vascolare o di Kupffer.

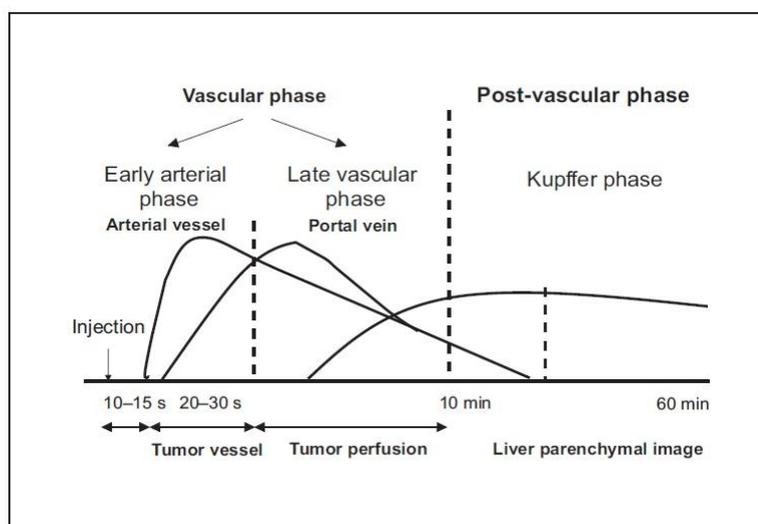


FIGURA 17: Fasi della CEUS con Sonazoid. Da Kudo M, Dig Dis 2011.

Quando si usa il Sonazoid, la fase di Kupffer è molto stabile, diversamente che con altri m.d.c., e, pertanto, l'intero scanning del fegato dovrebbe essere, inizialmente, eseguito in questa fase. Successivamente, il Sonazoid viene nuovamente iniettato endovena in corrispondenza dei siti in cui si osserva un difetto di captazione nella fase di Kupffer (difetto di riperfusione all'imaging), per facilitare l'identificazione della neoplasia (test di re-iniezione del difetto). L'iniezione intravenosa addizionale di Sonazoid in queste aree facilita, infatti, l'identificazione della vascolarità arteriosa laddove vi era il difetto di captazione. Con tale approccio l'epatocarcinoma tipico può essere diagnosticato con un tasso approssimativo del 100% (Kudo M, 2011).

La fase di Kupffer con Sonozoid è molto importante poichè:

- la maggior parte delle lesioni di HCC moderatamente o ben differenziato, in cui il flusso arterioso è abbondante, mostra una ridotta captazione di Sonazoid o un difetto nella fase di Kupffer;
- le lesioni pre-cancerose e gli early HCC presentano una captazione di Sonazoid nella fase di Kupffer simile a quella del circostante parenchima epatico in cui il flusso ematico arterioso è ridotto, con afflusso portale conservato;
- la diagnosi differenziale tra un nodulo displastico ed un early HCC è difficile poichè le due lesioni mostrano la stessa captazione nella fase di Kupffer in molti casi, ma i noduli ipovascolari, in cui la captazione da parte delle cellule di Kupffer in fase post-vascolare è ridotta, possono essere diagnosticati come early HCC.

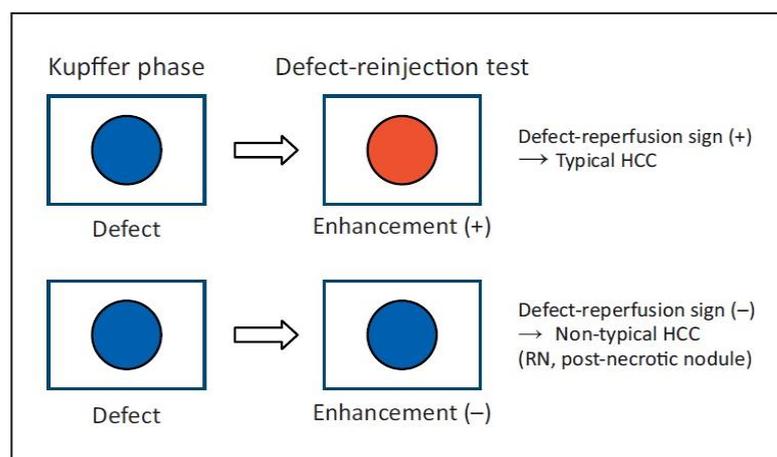


FIGURA 18: Valore del defect reperfusion imaging nei noduli non identificabili all'ecografia B-mode. Da Kudo M, Dig Dis 2011.

È importante ricordare che, in confronto con la TC o la RMN, la performance della CEUS (come quella dell'ecografia standard) è più fortemente influenzata dalla competenza/esperienza dell'operatore e correlata a caratteristiche proprie del paziente (habitus corporeo, collaborazione) ed alla localizzazione del nodulo. Tuttavia, nella valutazione dei noduli singoli individuati all'ecografia standard, la CEUS offre alcuni vantaggi. Primo fra tutti, lo studio con contrasto può essere realizzato appena la lesione focale è identificata all'esame ecografico, fornendo un'indicazione immediata della caratteristiche vascolari del nodulo. In aggiunta, è sicura e ben tollerata in un ampio range di condizioni cliniche ed è un'eccellente alternativa quando vi sono controindicazioni alla TC (allergia al mezzo di contrasto iodato, severa insufficienza renale) o alla RMN (claustrofobia, presenza di pace-maker o altri dispositivi elettromagnetici).

È importante segnalare che il segno radiologico distintivo dell'epatocarcinoma si presenta solo in una piccola proporzione di pazienti con tumori di dimensioni ridotte (1-2 cm) e, pertanto, la biopsia o i biomarcatori tissutali saranno richiesti in molte circostanze (Bolondi L, 2005). Una diagnosi posta oltre i 2 cm conduce ad aumentati livelli di insuccesso dei trattamenti o di recidiva, perchè noduli satelliti ed invasione vascolare microscopica aumentano esponenzialmente oltre questo cut-off di dimensioni (Roskams T, 2011). Pertanto è cruciale fare diagnosi prima del raggiungimento del cut-off dei 2 cm.

Sebbene le raccomandazioni inerenti gli algoritmi diagnostici da seguire innanzi a lesioni epatiche trovate allo screening siano state sviluppate per i pazienti cirrotici, possono essere ugualmente applicate ai pazienti con epatite cronica B che possono non avere pienamente sviluppato cirrosi, essendo in entrambe le situazioni la probabilità pre-test di HCC alta. Per i noduli identificati in un altrimenti fegato normale, la probabilità pre-test è molto più bassa e le linee-guida non sono applicabili.

Molto è stato fatto sull'entità dell'HCC ipovascolare. Tale lesione si evidenzia meno del circostante parenchima sia in fase arteriosa che venosa. Questo è un problema diagnostico solo delle piccole lesioni (<2 cm). Studi istologici hanno mostrato che la ragione dell'apparente ipovascolarità sta nel fatto che le lesioni hanno un doppio apporto ematico (Nakashima Y, 1999). A livello istologico, sono presenti arterie spaiate (senza dotti biliari), ma in piccolo numero, e vi è ancora un apporto portale, sebbene ridotto. Quando il tumore cresce, l'apporto ematico diviene più arterializzato e la lesione acquista le caratteristiche tipiche dell'HCC. Anche i noduli displastici possono mostrare arterie spaiate e apporto portale ridotto. Pertanto, per distinguere i noduli displastici dall'HCC è necessaria la biopsia. Sfortunatamente, anche con la biopsia, la caratteristica distintiva che distingue un

nodulo displastico ad alto grado da un HCC, ossia l'invasione stromale, può non essere identificata.

## 5.2 DIAGNOSI ANATOMO-PATOLOGICA

La diagnosi istologica di epatocarcinoma si basa sulle definizioni dell'International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia (Hepatology 2009) ed è raccomandata per tutti i noduli che compaiono in fegati non cirrotici e per i noduli con aspetto non conclusivo o atipico all'imaging insorti in fegati cirrotici. La sensibilità della biopsia epatica dipende da sede e dimensione della lesione e dalla competenza dell'operatore e può oscillare tra il 70% ed il 90%. Gli aspetti istologici dell'HCC ben differenziato e degli stadi più avanzati dell'epatocarcinoma sono ben conosciuti. Tuttavia, una delle conseguenze dei programmi di sorveglianza è l'identificazione di lesioni sempre più piccole (1-2 cm), per le quali la diagnosi differenziale anatomo-patologica tra noduli displastici ad alto grado ed early HCC è particolarmente complessa. Questo è vero tanto a livello radiologico, quanto istologico.

La complessità della diagnosi anatomo-patologica dipende dalla difficoltà nel distinguere le lesioni displastiche da quelle neoplastiche. Nonostante la recente identificazione dell'entità dell'early cancer, lesione che costituisce il momento di transizione tra la displasia e lo small HCC, l'accuratezza diagnostica della biopsia rimane limitata poiché il segno distintivo della malignità, ovvero l'invasione stromale, non è sempre individuabile. D'altro canto la caratterizzazione delle varie lesioni epatiche è stata eseguita su tessuti provenienti da resezioni epatiche, mentre l'esame biotico viene eseguito su un campione di tessuto limitato e, pertanto, la valutazione istologica risulta più complicata.

In aggiunta alle caratteristiche morfologiche per la distinzione tra noduli displastici ad alto grado (HGDN) e HCC, vi sono diverse colorazioni immunoistochimiche che possono essere d'aiuto. La colorazione per l'endotelio vascolare con CD34 (marker di neovascolarizzazione) è solitamente positiva nell'HCC e fortemente positiva quando le arterie spaiate divengono più chiaramente identificabili, mentre nei tessuti benigni l'epitelio sinusoidale si colora solo debolmente con questo anticorpo. Ulteriori marcatori possono essere presi in considerazione per valutare i potenziali progenitori della cellula di origine (keratin 19, EpCAM) (Roskams T, 2010; Roskams T, 2011). Markers di HCC versus tessuti benigni includono il *glypican 3* (GPC3), la HSP70 e la glutammina-sintetasi (Di Tommaso L, 2007). Un marker promettente è il GPC3, che mostra una sensibilità di

68-72% ed una specificità >92% (Capurro M, 2003; Di Tommaso L, 2007). La combinazione di questi marcatori proteici –HSP70, GPC3, e GS- è stata realizzata in 105 noduli epatocellulari con una sensibilità ed una specificità di 72% e 100%, rispettivamente (Di Tommaso L, 2007), ed è stata validata successivamente in una serie più ampia (Di Tommaso L, 2009). La International Consensus Group of Hepatocellular Neoplasia ha adottato come raccomandazione di definire una diagnosi istologica di epatocarcinoma se almeno due di questi markers sono positivi (Hepatology 2009). Tecnologie diverse, quali il genome-wide DNA microarray, la qRT-PCR, la proteomica, sono state usate nel tentativo di identificare marcatori per la diagnosi precoce di epatocarcinoma. La *signature* di 3 geni (i geni che codificano per GPC3, LYVE1 e survivina) è stata proposta come mezzo molecolare accurato (accuratezza >80%) per discriminare i noduli displastici dai piccoli HCC (<2 cm) (Llovet JM, Gastroenterology 2006). La performance di queste *signature* è stata validata esternamente in un diverso set di campioni (Llovet JM, Gastroenterology 2006).

In uno studio prospettico la prima biopsia è stata riportata risultare positiva in circa il 60% dei casi di tumori <2 cm (Forner A, 2008). Quindi una biopsia positiva per neoplasia è clinicamente utile per porre diagnosi di epatocarcinoma, ma una biopsia negativa non esclude la malignità. I pazienti con noduli epatici che non hanno uno specifico profilo vascolare e biopsia negativa dovrebbero, pertanto, continuare ad essere sottoposti ad un intenso follow-up.

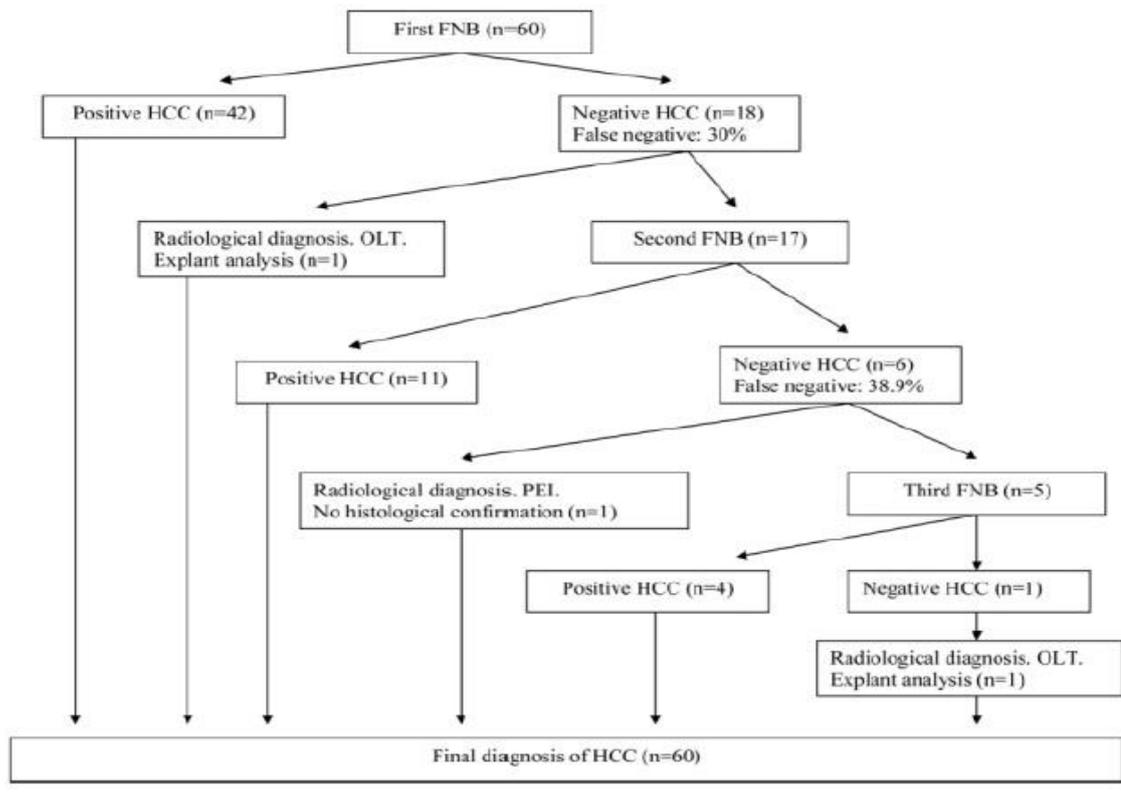


FIGURA 19: Accuratezza della biopsia nella diagnosi di epatocarcinoma. (Da Forner A, *Hepatology* 2008).

Una questione aggiuntiva circa la biopsia è il rischio di sanguinamento e di disseminazione di cellule tumorali lungo il tragitto dell'ago. La maggior parte degli studi che riportano disseminazione non specifica le dimensioni delle lesioni biopsiate (Silva MA, 2008). Il rischio di disseminazione tumorale dopo biopsia epatica è del 2.7% con un intervallo temporale medio tra biopsia e disseminazione di 17 mesi (Silva MA, 2008). Sebbene il tasso di disseminazione dopo biopsia di piccole lesioni (<2 cm) non sia stato accuratamente misurato, è probabile che non sia comune. Il tasso corrente di sanguinamento da biopsia di small HCC non è stato riportato, ma probabilmente non è così differente da quello della biopsia epatica in generale (Stigliano R, 2007; Silva MA, 2008).

Sostanzialmente l'algoritmo diagnostico oggi seguito prevede:

- ✓ Per lesioni <1 cm non sono richieste investigazioni dettagliate perché la maggior parte di queste saranno noduli cirrotici piuttosto che HCC (Roskams T, 2011). Tuttavia è raccomandato uno stretto follow-up ad intervalli di 4 mesi.

- ✓ Per lesioni di 1-2 cm dovrebbero essere usate la TC multidetettore quadrifasica o la RMN dinamica con agente di contrasto. Se gli aspetti sono tipici per HCC alla TC o alla RMN, non sono richieste ulteriori indagini e la diagnosi di HCC è confermata, eccezion fatta per contesti subottimali ove dovrebbero essere impiegate entrambe le tecniche. Se l'aspetto non è tipico dovrebbe essere applicata la metodica contrastografica alternativa. Se, alla seconda tecnica, l'aspetto è tipico la diagnosi è confermata. Alternativamente, in assenza di tipicità, si può optare per la biopsia, il cui esame deve comprendere la valutazione delle colorazioni immunoistochimiche e/o dei profili di espressione genica. Se anche la biopsia fornisce risultati non conclusivi, allora è raccomandato un più stretto follow-up ogni 4 mesi. Una seconda biopsia può essere presa in considerazione in caso di crescita della lesione o modifica del pattern di enhancement.
- ✓ Per lesioni >2 cm è sufficiente la presenza del tipico profilo vascolare ad una sola metodica di imaging per porre diagnosi di HCC. Se la tipicità radiologica è assente si deve ricorrere alla biopsia.

La valutazione dell'estensione tumorale è critica nella definizione dello stadio e della strategia di trattamento. Molti studi con correlazioni istologiche hanno mostrato che la RMN dinamica con mezzo di contrasto e la TC multidetettore quadrifasica sono le più efficaci tecniche di imaging per identificare tumori <2 cm. Tuttavia, una sottostima del 23-30% è attesa anche con le migliori tecnologie esistenti allo stato dell'arte (Colli A, 2006). La scintigrafia ossea può essere usata per la valutazione delle metastasi ossee. La PET non è accurata nella stadiazione dei tumori precoci.

## 6. SISTEMI DI STADIAZIONE

La stadiazione del cancro è finalizzata a stabilire la prognosi ed a consentire la selezione di trattamenti adeguati per i migliori candidati.

La prognosi dei tumori solidi è generalmente correlata allo stadio del tumore alla sua presentazione e pertanto è lo stadio tumorale che guida le decisioni terapeutiche. Tuttavia, nei pazienti affetti da HCC la previsione della prognosi è più complessa poiché la sottostante epatopatia condiziona pure la prognosi (Llovet JM, Lancet 2003). Sulla base di dati inerenti la storia naturale della malattia, i principali fattori clinici prognostici per l'epatocarcinoma sono correlati alle caratteristiche del tumore (numero e dimensione dei

noduli, presenza di invasione vascolare, diffusione extraepatica), alla funzionalità epatica (definita dalla classe di Child-Pugh, bilirubina, albumina, ipertensione portale, ascite) ed allo stato di salute generale (definito dalla classificazione ECOG e la presenza di sintomi) (Okuda K, 1985; CLIP Investigators, 1998; Llovet JM, Hepatology 1999; Cabibbo G, 2010). L'eziologia non è stata identificata come fattore prognostico indipendente.

Biomarcatori sierici e tissutali predittori della prognosi sono stati esplorati poco nei pazienti con epatocarcinoma. Per quel che concerne i marcatori sierici, i livelli di AFP, VEGF e Ang2 hanno mostrato avere un valore prognostico indipendente in ampie coorti di tumori avanzati non trattati (Llovet JM, Hepatology 2008). Nessuno dei biomarcatori tissutali testati finora per l'epatocarcinoma ha soddisfatto pienamente i criteri necessari per entrare nella pratica clinica, ma alcuni richiedono una validazione esterna da gruppi indipendenti: la *signature* di EpCAM, il miR-26 e la sottoclasse di proliferazione G3 (Yamashita T, 2008; Ji J, 2009; Villanueva A, 2011).

Sono stati proposti molti sistemi di stadiazione dell'epatocarcinoma. Ogni sistema di stadiazione dovrebbe classificare i pazienti in sottogruppi con outcomes significativamente differenti e, allo stesso tempo, orientare la terapia, prendendo in considerazione tutte le variabili in grado di influire sulla prognosi.

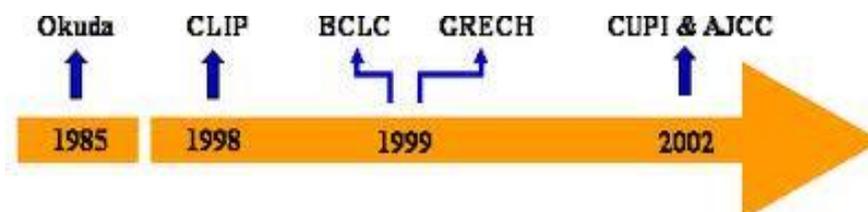


FIGURA 20: Sistemi di classificazione dell'epatocarcinoma.

In ambito oncologico la classificazione standard del cancro è basata sul sistema TNM. Per l'epatocarcinoma, la settima edizione del TNM in accordo con l'AJCC (Edge SB, 2010), redatta sulla base dell'analisi di una serie di pazienti sottoposti a resezione, ha diversi limiti (Llovet JM, Hepatology 1998). In primo luogo, è necessaria l'informazione istologica per valutare l'invasione microvascolare, che è disponibile solo in pazienti trattati chirurgicamente (circa il 20%). In secondo luogo, essa non acquisisce informazioni sulla funzionalità epatica o lo stato di salute del paziente.

T1	Singola lesione senza invasione vascolare
T2	Singola lesione con invasione vascolare, o noduli multipli, tutti <5cm
T3	T3a: Noduli multipli > 5cm T3b: Lesione singola o multipla che coinvolge una branca maggiore della vena porta o della vena epatica
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

Stadio	Tumore (T)	Linfonodi (N)	Metastasi (M)
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3a	N0	M0
IIIB	T3b	N0	M0
IIIC	T4	N0	M0
IVA	Qualsiasi T	N1	M0
IVB	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1

TABELLA 3: Sistema di stadiazione dell'epatocarcinoma secondo TNM.

La classificazione di Okuda, la prima ad essere stata proposta nel 1985, tiene conto della dimensione del tumore e della funzionalità epatica. Ciò consente l'identificazione della malattia terminale, ma non è capace di stratificare adeguatamente i pazienti con malattia in stadio precoce o intermedio. Questa classificazione ha, infatti, 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.

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estensione del tumore &gt;50% del fegato</li> <li>• Ascite +/-</li> <li>• Albumina &lt;3 g/dl</li> <li>• Bilirubina &gt;3 mg/dl</li> </ul>								
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Grado</th> <th>Caratteristiche</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>I</td> <td>Assenza di fattori</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td>Presenza di 1 o 2 fattori</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td>Presenza di 3 o 4 fattori</td> </tr> </tbody> </table>	Grado	Caratteristiche	I	Assenza di fattori	II	Presenza di 1 o 2 fattori	III	Presenza di 3 o 4 fattori
Grado	Caratteristiche							
I	Assenza di fattori							
II	Presenza di 1 o 2 fattori							
III	Presenza di 3 o 4 fattori							

TABELLA 4: Stadiazione di Okuda.

Il sistema di Child-Pugh (Pugh RN, 1973) e il MELD score (Kamath PS, 2001) sono sistemi unidimensionali che considerano solo la funzione epatica, ma non le caratteristiche

del tumore e perciò non possono essere accurati. Inoltre, la classificazione di Child-Pugh ha una scarsa capacità predittiva legata al fatto che non tiene conto della variabilità clinica e biochimica della malattia, spontanea o indotta dall'intervento del medico.

<b>Punteggio</b>	<b>Bilirubina (mg %)</b>	<b>Attività protrombinica</b>	<b>Albumina (g %)</b>	<b>Ascite</b>	<b>Encefalopatia (grado)</b>
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

<b>Stadio</b>	<b>Punteggio</b>
A	5-6
B	7-9
C	≥ 10

TABELLA 5: *Classificazione di Child-Pugh.*

Il MELD score (Model for End-Stage Liver Disease) è una formula logaritmica che tiene conto dei valori della bilirubina totale, della creatinina e dell'INR per valutare la severità dell'epatopatia cronica.

Questo score non è stato disegnato per essere un sistema di stadiazione dell'HCC e non fornisce una buona classificazione prognostica, ad eccezione che nei pazienti che potrebbero ricevere un trapianto di fegato per insufficienza epatica. Esso è infatti utilizzato per stabilire la priorità in lista d'attesa per il trapianto di fegato.

$MELD = 0.957 \times \ln(\text{creatinine mg/dL}) + 0.378 \times \ln(\text{bilirubin mg/dL}) + 1.120 \times \ln(\text{INR}) + 0.643$  (dove Ln indica logaritmo naturale. Il numero trovato deve essere moltiplicato per 10 ed arrotondato ad intero).

Nel 1998 è stato proposto in Italia il Cancer Liver Italian Program score (CLIP) (Hepatology 1998). Questo sistema prende in considerazione quattro variabili: la classe di Child-Pugh, la morfologia della massa neoplastica, i livelli sierici di alfa-fetoproteina e l'eventuale presenza di trombosi della vena porta. La combinazione delle diverse variabili segrega i pazienti in 6 categorie. Il principale limite di questo sistema è rappresentato dall'impossibilità di identificare pazienti in stadio molto precoce che potrebbero beneficiare di trattamenti curativi (resezione, trattamenti percutanei).

	0	1	2
<b>VARIABILI</b>			
Classe di Child-Pugh	A	B	C
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	

TABELLA 6: Sistema di stadiazione dell'epatocarcinoma secondo CLIP.

Il French scoring system è stato proposto da Chevret nel 1999; il sistema consente una stratificazione in tre gruppi sulla base di cinque parametri: il Karnofsky performance index, la trombosi portale, il valore di bilirubina, il valore di fosfatasi alcalina ed il valore di alfa-fetoproteina. Lo score proposto da Chevret et al. (1999) fornisce una semplice classificazione per la valutazione della sopravvivenza in pazienti affetti da epatocarcinoma.

Parametri	Score			
	0	1	2	3
Indice di Karnofsky	≥ 80			< 80
Bilirubina (μmol/L)	< 50			> 50
Fosfatasi alcalina (ULN)	< 2		> 2	
Alfa-fetoproteina (μg/l)	< 35		> 35	
Ostruzione portale (determinata ecograficamente)	no	si		

TABELLA 7: Sistema di stadiazione dell'epatocarcinoma secondo Chevret et al.

Il Chinese University Prognostic Index (CUPI) (Leung TW, 2002), proposto negli anni '90, è basato su sei variabili (TNM, sintomi, ascite, AFP sierica, bilirubina, fosfatasi alcalina) e consente la stratificazione dei pazienti in tre gruppi. Il CUPI è stato considerato superiore al TNM, alla classificazione di Okuda e al CLIP score nella predizione della sopravvivenza dei pazienti, ma non è stato confermato in pazienti occidentali.

<b>Stadio TNM</b>	<b>Score</b>
I e II	- 3
IIIa e IIIb	- 1
IVa e IVb	0
Paziente asintomatico	- 4
Ascite	3
Alfa-fetoproteina $\geq$ 500 ng/ml	2
Bilirubina totale ( $\mu$ mol/l)	
< 34	0
34-51	3
$\geq$ 52	4
Fosfatasi alcalina $\geq$ 200 unità/l	3

<b>Rischio</b>	<b>Punteggio</b>
Basso	< 1
Medio	2-7
Alto	> 8

TABELLA 8: *Sistema di stadiazione dell'epatocarcinoma secondo CUPI.*

Il Japanese Integrated Staging Score è stato proposto nel 2003 (Kudo M, 2003). Il sistema si basa sulle variabili di due ulteriori score (Child-Pugh e TNM), con la possibilità di stratificare i pazienti in sei gruppi. Il JIS è risultato più efficace del CLIP. Il disegno dello score tuttavia sembra adattarsi più alla stratificazione prognostica di pazienti a destino terapeutico non chirurgico visto il valore differenziativo attribuito alle dimensioni del nodulo con un cut-off di 2 cm. Tale sistema è stato recentemente ridefinito includendo i biomarcatori AFP, DCP, AFP-L3 (bmJIS).

	<b>Variabili</b>			
	0	1	2	3
Child-Pugh	A	B	C	
TNM	I	II	III	IV

TABELLA 9: *Sistema di stadiazione dell'epatocarcinoma secondo il Japanese Integrated Staging Score.*

Tra i sistemi di stadiazione più completi ne sono stati ampiamente testati cinque: tre europei (la classificazione francese, il CLIP, il BCLC) e due asiatici (il CUPI score ed il

JIS). Gli scores CUPI e CLIP sottostimano ampiamente i pazienti agli stadi avanzati, con un piccolo numero di pazienti efficacemente trattati. Complessivamente, pochi dei sistemi o scores più usati sono stati validati esternamente (BCLC, CUPI, CLIP, bmJIS), solo due includono tutte le variabili prognostiche (BCLC, CUPI) e solo uno attribuisce una assegnazione di trattamento a specifiche sottoclassi prognostiche (BCLC).

Benché non vi sia consenso unanime sull'uso di qualsivoglia sistema di stadiazione, la gran parte dei maggiori trials sulla terapia dell'HCC hanno scelto il sistema di stadiazione BCLC rendendolo de facto il sistema di riferimento.

Il sistema BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) (Llovet JM, Semin Liver Dis 1999; Llovet JM, Lancet 2003; Llovet JM, J Natl Cancer Inst 2008) è stato sviluppato sulla base della combinazione di dati provenienti da diversi studi indipendenti inerenti i diversi stadi di malattia e/o modalità di trattamento. Esso include variabili correlate allo stadio del tumore, allo stato della funzionalità epatica, allo status fisico ed ai sintomi legati alla neoplasia (Verger E, 1992). Il principale vantaggio della classificazione BCLC è che lega lo stadio alla modalità di trattamento ed alla stima dell'aspettativa di vita che si basa su tassi di risposta ai vari trattamenti pubblicati in letteratura. Esso identifica i pazienti con HCC precoce che possono beneficiare di terapie curative, i pazienti con malattia in stadio intermedio o avanzato che possono beneficiare di trattamenti palliativi, ed i pazienti con malattia terminale con una bassa aspettativa di vita. Marrero J et al. (2005) e Grieco A et al. (2005) hanno comparato tutti i sistemi disponibili e hanno validato il sistema BCLC in USA ed in Italia, rispettivamente.

Inoltre, la classificazione BCLC è un sistema in evoluzione che lega in modo dinamico lo stadio tumorale con strategie di trattamento, consentendo l'incorporazione di nuove acquisizioni sulla prognosi o la gestione dell'epatocarcinoma. A tal proposito, la classificazione riportata nel 1999 (Llovet JM, Semin Liver Dis 1999) è stata aggiornata con l'inclusione dello stadio 0 (very early HCC) e della chemioembolizzazione per l'HCC intermedio nel 2003 (Llovet JM, Lancet 2003), ed ulteriormente modificata nel 2008 per includere il sorafenib come opzione di trattamento di prima linea nei tumori avanzati (Llovet JM, J Natl Cancer Inst 2008). I continui studi di genomica e proteomica consentiranno, negli anni a venire, una caratterizzazione più accurata dell'HCC di modo che i pazienti possano essere stratificati in classi e trattati secondo il loro profilo molecolare e non secondo la grossolana valutazione dell'estensione del tumore e le misure convenzionali della funzionalità epatica.

La classificazione BCLC è stata prima avallata dalle linee-guida dell'EASL e successivamente dell'AASLD per la gestione dell'epatocarcinoma.

<b>Stadio</b>	<b>Caratteristiche del tumore</b>	<b>Parametri epatici</b>
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, minori di 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

TABELLA 10: *Sistema di stadiazione dell'epatocarcinoma secondo BCLC.*

La classificazione BCLC divide i pazienti con HCC in 5 stadi (0, A, B, C e D), in accordo con variabili prognostiche prestabilite, ed assegna le terapie secondo gli stadi medesimi. Quindi fornisce informazioni sia sulla previsione prognostica sia sull'attribuzione del trattamento. La previsione della prognosi è definita da variabili correlate al tumore (dimensioni, numero, invasione vascolare, N1, M1), funzionalità epatica (Child-Pugh) e stato di salute (ECOG). Nella pratica clinica trova ancora ampia applicazione la valutazione del performance status secondo la scala di Karnofsky. La scala di Karnofsky è descritta ad intervalli di 10 punti dove il 100% (nessuna limitazione) rappresenta il punteggio massimo e lo 0% (morte) ne rappresenta il minimo. Lo score ECOG prevede, invece, 5 classi che corrispondono ad uno stato di salute progressivamente peggiore, da 0 a 5.

<b>100 %</b>	ECOG = 0	Nessun disturbo, nessun segno di malattia.
<b>90 %</b>	ECOG = 0	Possibili le normali attività, Sintomatologia molto sfumata.
<b>80 %</b>	ECOG = 1	Normali attività possibili con difficoltà. Sintomi evidenti.
<b>70 %</b>	ECOG = 1	Cura di se stessi. Normali attività e lavoro non possibili.
<b>60 %</b>	ECOG = 2	Necessario qualche aiuto, indipendente nei bisogni personali.
<b>50 %</b>	ECOG = 2	Aiuto spesso necessario, richiede frequenti cure mediche.
<b>40 %</b>	ECOG = 3	Disabile. Necessario un aiuto qualificato.
<b>30 %</b>	ECOG = 3	Severamente disabile. Ospedalizzazione necessaria ma senza rischio di morte.
<b>20 %</b>	ECOG = 4	Estremamente malato. Richieste misure intensive di supporto alla vita.
<b>10 %</b>	ECOG = 4	Moribondo. Processi di malattia fatali rapidamente progressivi.
<b>0 %</b>	ECOG = 5	Morte.

TABELLA 11: *Confronto tra il performance status secondo Karnofsky e lo score ECOG. Da Verger E, Eur J Cancer 1992.*

L'allocazione del trattamento include variabili trattamento-dipendenti, che hanno mostrato di influenzare l'outcome terapeutico, come la bilirubina, l'ipertensione portale o la presenza di sintomi-ECOG.

Gli stadi descritti dalla classificazione BCLC sono:

**Very early HCC** (stadio BCLC 0): è definito come la presenza di un tumore singolo <2 cm di diametro, senza invasione vascolare e/o noduli satelliti, in pazienti con buono stato di salute (ECOG 0) e funzione epatica ben conservata (classe A di Child-Pugh). Questi tumori sono suscettibili di una terapia curativa. Oggi il 5-10% dei pazienti, in Occidente, riceve la diagnosi a questo stadio, mentre in Giappone la cifra ammonta a quasi il 30% per l'esteso miglioramento dei programmi di sorveglianza (Kudo M, 2007). Studi anatomopatologici, tuttavia, hanno identificato due sottoclassi di tumori: il tipo nodulare a margini mal definiti, di dimensioni di circa 12 mm e senza invasività locale, ed il tipo nodulare a margini ben definiti, di dimensioni di 16 mm, che potrebbe mostrare invasività locale. I tumori del primo tipo sono HCC molto ben differenziati contenenti dotti biliari e vene portali, con un aspetto nodulare scarsamente delineato e che, per definizione, non hanno invaso strutture. I tumori del secondo tipo mostrano metastasi locali che circondano il nodulo nel 10% dei casi ed invasione portale microscopica in oltre il 25% dei casi (Roskams T, 2010; Roskams T, 2011). Perciò, alcuni tumori inferiori ai 2 cm sono propensi alla disseminazione locale, mentre altri si comportano come un *carcinoma in situ* e sono definiti come stadio 0. Dati recenti hanno mostrato una sopravvivenza a 5 anni dell'80-90% nei pazienti trattati con resezione e trapianto di fegato e del 70% in quelli trattati con ablazione locale (Takayama T, 1998; Livraghi T, 2008).

**Early HCC** (stadio BCLC A): è definito come la presenza di un tumore singolo >2 cm o 3 noduli  $\leq 3$  cm di diametro, ECOG 0 e classe di Child-Pugh A o B. La sopravvivenza media dei pazienti con early HCC raggiunge il 50-70% a 5 anni dopo resezione, trapianto di fegato o ablazione locale, in candidati selezionati (Llovet JM e Bruix J, J Hepatol 2008). Il naturale outcome di questi casi è mal definito per la scarsità di dati riportati, ma si stima che vi sia una sopravvivenza media intorno ai 36 mesi, che migliora quando si applicano le cosiddette variabili trattamento-dipendenti nella selezione dei candidati.

Lo stato del tumore è definito dalle dimensioni del nodulo principale e dalla multicentricità (nodulo singolo 2-5 cm, 3 noduli  $\leq 3$  cm), ove ciascuna di queste categorie mostra outcomes significativamente differenti.

**HCC intermedio** (stadio BCLC B): pazienti non trattati ad uno stadio intermedio (tumori multinodulari asintomatici senza pattern invasivo) presentano una sopravvivenza media di 16 mesi (Llovet JM e Bruix J, 2003; Llovet JM e Bruix J, Hepatology 2008), o del 49% a 2 anni (Cabibbo G, 2010). La chemioembolizzazione aumenta la sopravvivenza di questi pazienti ad una media di oltre 19-20 mesi (Llovet JM e Bruix J, 2003). Ciononostante, la previsione dell'outcome è eterogenea per i pazienti in classe BCLC B ed è stato riportato un range di 36-45 mesi (Takayasu K, 2006; Varela M, 2007) per i migliori responders al trattamento, e di 11 mesi per i candidati non trattati (braccio del placebo del trial SHARP - pazienti in BCLC B) (Llovet JM, N Eng J Med 2008). Una recente meta-analisi di RCT che valutavano l'outcome dei pazienti nel braccio dei controlli suggerisce che l'ascite, che controindica il trattamento con la TACE, è il peggior fattore prognostico per questa sottoclasse (Cabibbo G, 2010).

**HCC avanzato** (stadio BCLC C): pazienti con sintomatologia correlata al cancro (tumori sintomatici, ECOG 1-2), invasione macrovascolare (segmentale e/o portale) o diffusione extraepatica (coinvolgimento linfonodale o metastasi) hanno una cattiva prognosi, con un tempo medio di sopravvivenza di 6 mesi (Llovet JM, Hepatology 1999; Llovet JM e Bruix J, Hepatology 2008), o del 25% ad 1 anno (Cabibbo G, 2010). Ciononostante, è ovvio che questo outcome varia in relazione allo stato della funzionalità epatica e ad altre variabili. Ad esempio, i pazienti con funzione epatica conservata (classe A di Child-Pugh) hanno una sopravvivenza media di 7 mesi (Llovet JM, N Eng J Med 2008), mentre quelli con severo danno epatico (classe B di Child-Pugh) presentano un'aspettativa di vita media di 5 mesi. Nel 2006, per i pazienti con HCC avanzato, non era disponibile alcun trattamento di prima linea approvato dalla FDA. Questo scenario è stato modificato sulla base di alcuni dati che hanno mostrato i benefici in termini di sopravvivenza per i pazienti che ricevevano il

sorafenib, un inibitore multi-tirosina-chinasi, nei casi di HCC avanzato (Llovet JM, N Eng J Med 2008). I risultati di un RCT condotto su tale farmaco hanno segnato una svolta nella gestione dell'epatocarcinoma. La sopravvivenza media complessiva nel braccio trattato con sorafenib era di 10.7 mesi, oscillante da 14.7 mesi nello stadio BCLC B e 9.5 mesi nello stadio BCLC C.

**HCC terminale:** i pazienti con malattia in stadio terminale presentano una condizione neoplastica che conduce ad un performance status molto scarso (ECOG 3-4), che riflette la severa disabilità legata al tumore. La loro sopravvivenza media è di 3-4 mesi (Llovet JM, Semin Liver Dis 1999), o dell'11% ad 1 anno (Cabibbo G, 2010). Allo stesso modo, i pazienti in classe C di Child-Pugh con tumori oltre la soglia per il trapianto hanno una prognosi molto cattiva.

Una parte di pazienti in ciascuno stadio non soddisfa a pieno i criteri per l'allocazione del trattamento. In questi casi, solitamente si offre al paziente l'opzione terapeutica prossima più adeguata entro lo stesso stadio o il successivo stadio prognostico.

Score	Semplicità	Accuratezza prognostica	Validazione prospettica	Confronto prospettico con altri score	Valutazione funzione epatica
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

TABELLA 12: Sintesi dei vantaggi e svantaggi delle diverse classificazioni.

- *Classificazione molecolare dell'HCC*

La classificazione molecolare del cancro dovrebbe aiutare nella conoscenza delle sottoclassi biologiche e degli elementi chiave della malattia ed ottimizzare i benefici provenienti dalle terapie molecolari. Poche classificazioni molecolari sono state proposte per il cancro.

Per quanto concerne l'epatocarcinoma nessuna sottoclasse molecolare è stata riportata come responsiva ad una specifica *targeted therapy*. Ciononostante, nella scorsa decade, sono stati fatti chiari progressi nella conoscenza della patogenesi e della sottoclassi molecolari della malattia. Da un punto di vista biologico le differenti classi tumorali sono

state caratterizzate includendo una classe Wnt, una classe proliferativa (con due sottoclassi: S1-TGF-beta e S2-EpCAM+) ed una classe infiammatoria (Yamashita T, 2008; Hoshida Y, 2008). Campioni ottenuti da diverse parti di un dato nodulo neoplastico hanno mostrato identica classe di stratificazione nel 95% dei casi (Villanueva A, 2011). Anche il profilo genico del tessuto non tumorale adiacente alla neoplasia sembra avere un valore prognostico, consentendo di definire due sottogruppi di pazienti, con buono e scarso outcome (Hoshida Y, 2008).

## 7. TRATTAMENTO

Oggi vi sono diverse terapie potenzialmente curative ed approcci palliativi per il trattamento dell'epatocarcinoma in grado di aumentare l'aspettativa di vita dei pazienti. La scelta del trattamento è guidata dallo stadio della neoplasia, dalle risorse disponibili e dal livello di competenza dei professionisti. Per ottenere i migliori outcomes è necessaria un'attenta selezione dei candidati a ciascuna delle opzioni terapeutiche. Dal momento che solo pochi trials randomizzati controllati hanno messo a confronto i vari approcci, la maggior parte delle raccomandazioni per i trattamenti staging-guidati poggia sulle scoperte di studi osservazionali o sull'opinione di esperti.

Nella valutazione degli outcomes correlati alle diverse terapie, il parametro che si preferisce utilizzare per l'epatocarcinoma è la sopravvivenza, piuttosto che la sopravvivenza libera da malattia, solitamente impiegata in ambito oncologico. Ciò è legato alla natura stessa di tale parametro che registra due eventi: la morte e la recidiva tumorale. Nel caso specifico dell'HCC, a causa della frequente presenza di una sottostante cirrosi, il rischio di morte può correlare tanto con la cirrosi stessa, quanto con la progressione tumorale e, pertanto, la sopravvivenza libera da malattia non costituisce un parametro adeguato (Llovet JM, J Natl Cancer Inst 2008).

Le terapie potenzialmente curative comprendono la resezione chirurgica, il trapianto di fegato e l'ablazione percutanea. Tra le terapie non curative, quelle che hanno mostrato un impatto positivo sulla sopravvivenza e vengono raccomandate dalle principali associazioni per lo studio delle malattie del fegato sono la chemioembolizzazione transarteriosa e la terapia sistemica con sorafenib. Altre opzioni terapeutiche sono disponibili e vengono correntemente applicate, ma non hanno finora dimostrato la stessa efficacia.

La strategia BCLC combina, in un singolo progetto, stadiazione, trattamento indicato e stima della prognosi, e può essere applicata alla maggior parte dei pazienti esaminati per HCC. I pazienti diagnosticati in stadio precoce sono candidati ottimali per la resezione, il trapianto o l'ablazione percutanea. La resezione è presa in considerazione per pazienti con tumore singolo, assenza di ipertensione portale clinicamente significativa e bilirubina nella norma. La dimensione del tumore non è un fattore limitante, ma non è comune resecare pazienti con tumore >5 cm. Il trapianto è considerato nei pazienti con 3 noduli  $\leq 3$  cm o con tumore singolo  $\leq 5$  cm, con un danno della funzionalità epatica che precluda la resezione. Se è previsto un lungo tempo di attesa (> 6 mesi) sono raccomandati, prima dell'OLT, la resezione o trattamenti percutanei. Il trapianto da donatore vivente dovrebbe anche essere preso in considerazione in questi casi. L'ablazione percutanea è indicata nei pazienti con piccoli HCC non chirurgici. Se queste opzioni non sono praticabili, per tali pazienti dovrebbe essere considerata la palliazione. La TACE è indicata nei pazienti asintomatici con tumore multinodulare, senza invasione vascolare, né diffusione extraepatica. Questi pazienti sono i migliori candidati per questo approccio, in particolare se rientrano ancora nei criteri per la classe A di Child-Pugh. I pazienti trattati che rispondono alla terapia hanno un'augmentata sopravvivenza e perciò questa è l'ultima opzione efficace nella pratica clinica convenzionale. I pazienti con una malattia più avanzata o nei quali la TACE ha fallito sono candidati al sorafenib, se rimangono in classe A ed hanno un buon performance status. I pazienti con insufficienza epatica o deterioramento fisico (PS > 2) non trarranno beneficio da alcun trattamento, neppure da quelli con riconosciuta efficacia negli stadi più precoci (Verger E, 1992).

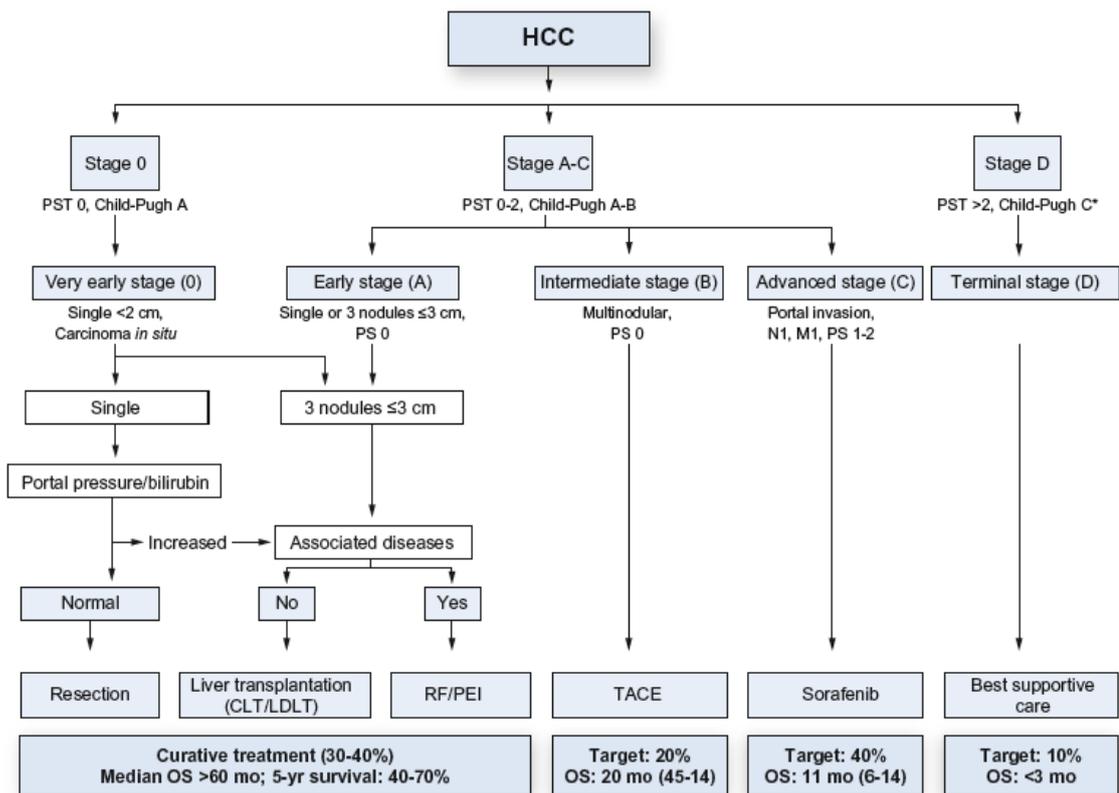


FIGURA 21: Strategie di trattamento dell'HCC secondo il sistema di stadiazione BCLC 2011. Da EASL, J Hepatol 2012.

La chirurgia è il pilastro del trattamento dell'epatocarcinoma. La resezione ed il trapianto raggiungono i migliori outcomes in candidati ben selezionati (sopravvivenza a 5 anni del 60-80%), e competono come prima opzione terapeutica nei pazienti con tumori precoci nella prospettiva intention-to-treat (Llovet JM, Semin Liver Dis 2005; Mazzaferro V, 2011).

### Resezione

La resezione epatica è il trattamento di scelta per l'HCC in pazienti non cirrotici (5% dei casi in occidente, 40% in Asia) (Belghiti J, 2000; Lang H, 2005), ove le resezioni maggiori possono essere eseguite con bassi tassi di morbilità ed outcomes accettabili (sopravvivenza a 5 anni del 30-50%).

Nei pazienti cirrotici la resezione rappresenta il trattamento di prima linea per i pazienti con tumori solitari e funzionalità epatica ben conservata, come definito da bilirubinemia normale in associazione ad un gradiente pressorio venoso transepatico  $\leq 10$  mmHg o ad una conta piastrinica  $\geq 100.000$ . I pazienti con funzionalità epatica compromessa sono, infatti, a

rischio di insufficienza epatica post-operatoria, con aumentato rischio di morte, in modo particolare nel caso di epatectomia destra.

La selezione dei candidati ideali coinvolge un'adeguata valutazione della funzionalità epatica residua e dell'estensione tumorale. Degli studi hanno mostrato che la bilirubinemia normale ed un gradiente di pressione venosa transepatico  $<10$  mmHg sono i migliori predittori di eccellenti outcomes post-resettivi, quasi senza alcun rischio di insufficienza epatica post-operatoria (Llovet JM, Hepatology 1999). La valutazione della funzione epatica è passata dalla grossolana determinazione della classe di Child-Pugh alla più sofisticata misurazione del tasso di ritenzione dell'indocianina verde a 15 minuti, diffusamente impiegata in Giappone, o del gradiente di pressione venosa transepatico  $\geq 10$  mmHg come misurazione diretta di ipertensione portale rilevante, utilizzata nei paesi occidentali. Il concetto dell'ipertensione portale come fattore prognostico nei pazienti sottoposti a resezione è stato recentemente validato in Asia (Ishizawa T, 2008). Misurazioni surrogate dell'ipertensione portale includono due variabili: una conta piastrinica inferiore a  $100.000/\text{mm}^3$  e la splenomegalia. La conta piastrinica è stata recentemente confermata come predittore indipendente della sopravvivenza nei casi di HCC resecati (Cucchetti A, 2009). La dimensione del tumore non è un chiaro fattore limitante. I tumori singoli  $>5$  cm sono ancora considerati come candidati per la resezione chirurgica come prima opzione in quanto il fatto che tumori di grandi dimensioni rimangano singoli e senza coinvolgimento macrovascolare, può riflettere un comportamento biologico più benigno (Llovet JM, Hepatology 1999). Nei pazienti correttamente selezionati secondo lo stato della funzionalità epatica i principali predittori della sopravvivenza sono la dimensione del tumore, il numero di noduli, la presenza di microsatelliti e l'invasione vascolare (Llovet JM, Semin Liver Dis 2005). Il Japanese Nationwide Survey ha mostrato, in una serie di migliaia di pazienti, che un cut-off inferiore a 2 cm è un predittore indipendente di sopravvivenza (Ikai I, 2004). I tassi di sopravvivenza a 5 anni erano del 66% per i pazienti con HCC  $\leq 2$  cm, del 52% per i tumori di 2-5 cm e del 37% per i tumori  $>5$  cm. La multinodularità predice anche la sopravvivenza, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni dopo resezione di tumori singoli del 57% e del 26% per 3 o più noduli, rispettivamente. Recentemente sono stati riportati tassi di sopravvivenza a 5 anni superiori al 50% in pazienti sottoposti a resezione per tumori multipli che rientravano entro i criteri di Milano (più di 3 noduli  $\leq 3$  cm), ma non erano idonei al trapianto (Ishizawa T, 2008). L'invasione vascolare è un noto predittore di recidiva e sopravvivenza, direttamente associata con la differenziazione istologica, il grado e la dimensione del nodulo principale.

Caratteristicamente, l'invasione vascolare microscopica coinvolge il 20% dei tumori di 2 cm, il 30-60% dei noduli di 2-5 cm e più del 60-90% dei noduli >5 cm (Llovet JM, Semin Liver Dis 2005).

La recidiva tumorale complica il 70% dei casi a 5 anni, riflettendo o la presenza di metastasi intraepatiche (recidive vere) o lo sviluppo di tumori de novo (Llovet JM, Hepatology 1999; Ishizawa T, 2008). Solitamente il cut-off di 2 anni viene adottato per classificare grossolanamente recidive precoci e tardive (Llovet JM, J Natl Cancer Inst 2008).

Sono state testate diverse strategie per prevenire e trattare la recidiva, nel contesto di studi randomizzati. L'interferon è il farmaco più frequentemente valutato finora. In un'analisi che includeva 13 studi si è osservato un significativo miglioramento nella sopravvivenza libera da recidiva con interferon (Shen YC, 2010). Altre strategie testate includono la chemioterapia (capecitabina), la chemioembolizzazione, la radiazione interna con <sup>131</sup>I-lipiodol, l'immunoterapia con linfociti autologhi attivati con IL-2 e i retinoidi. Finora, però, non vi sono chiare evidenze circa l'efficacia di tutti questi protocolli adiuvanti e neo-adiuvanti e, pertanto, nessuna di queste strategie è raccomandata nella pratica clinica (Samuel M, 2009).

### Trapianto di fegato

Il trapianto di fegato è il trattamento di prima scelta per i pazienti con tumore solitario  $\leq 5$  cm o con piccoli tumori multinodulari ( $\leq 3$  noduli  $\leq 3$  cm) e disfunzione epatica avanzata, non idonei alla resezione. Teoricamente, il trapianto può curare simultaneamente il tumore e la sottostante cirrosi. Gli ampi criteri di selezione applicati due decenni fa hanno condotto a scarsi risultati in termini di recidiva e sopravvivenza, ma hanno consentito l'identificazione dei migliori candidati per questa procedura. Esperienze condotte in diverse nazioni europee hanno mostrato che potevano essere raggiunti risultati eccellenti in HCC solitari  $< 5$  cm o fino a 3 noduli  $< 3$  cm, con una sopravvivenza a 5 anni del 70% ed un tasso di recidiva inferiore al 15% (Mazzaferro V, 1996; Llovet JM, Hepatology 1998), portando all'elaborazione dei cosiddetti criteri di Milano (Mazzaferro V, 1996). Secondo questi criteri, e seguendo i moderni standards, la mortalità peri-operatoria e la mortalità ad 1 e a 5 anni sono attese al 3%,  $< 10\%$  e  $< 30\%$ , rispettivamente. Una recente revisione sistematica includente 90 studi ha identificato i criteri di Milano come fattore prognostico indipendente per l'outcome dopo trapianto di fegato (Mazzaferro V, 2011). In conseguenza del loro successo i criteri di Milano sono stati integrati nel sistema di stadiazione BCLC e

nella stadiazione pre-trapianto dell'United Network for Organ Sharing (UNOS) per l'allocazione degli organi negli USA (Freeman Jr RB, 2002) e rimangono il punto di riferimento per ogni altro criterio prognostico proposto per estendere le indicazioni per il trapianto di fegato a pazienti cirrotici con HCC. Il maggior problema del trapianto di fegato come trattamento per l'epatocarcinoma è la scarsità di donatori. Gli aumenti del tempo di attesa hanno condotto ad un 20% di candidati che escono dalla lista prima di ricevere la procedura, mettendo così a repentaglio l'outcome, se analizzato secondo l'intento curativo (Llovet JM, Hepatology 1999; Yao FY, 2001).

La gestione delle liste d'attesa è un problema sempre aperto. L'UNOS ha sviluppato un sistema di priorità per la gestione delle liste d'attesa per il trapianto di fegato basato sul MELD score (Freeman Jr RB, 2002), che è stato originariamente creato per predire la sopravvivenza a 3 mesi nei pazienti con epatopatia terminale (Kamath PS, 2001). Dal momento che il MELD score non è in grado di prevedere il tasso di drop-out dei pazienti con HCC, sono stati assegnati diversi punteggi di priorità a questi pazienti oscillanti da 0 (singolo <2 cm) e 22 punti (singolo di 2-5 cm o 3 noduli <3 cm), nell'ultima versione. La principale difficoltà nello stabilire le scelte prioritarie è definire i pazienti a rischio di drop-out. Al contrario, pazienti con tumori singoli e piccoli (< 2 cm) potrebbero ricevere trattamenti alternativi al trapianto fino al verificarsi della recidiva (Pomfret EA, 2010) ed essere eventualmente candidati al cosiddetto "trapianto di salvataggio".

Ci sono anche meno informazioni sulle scelte da prendere circa il de-inserimento. Si raccomanda di eliminare dalla lista d'attesa quei pazienti i cui tumori sono progrediti oltre i criteri di Milano e di esplorare per loro terapie neo-adiuvanti. Si raccomanda, inoltre, di eliminare dalla lista i pazienti che sviluppano invasione macrovascolare o diffusione extraepatica.

L'analisi dell'estensione dei criteri per il trapianto oltre quelli di Milano e la sottostadiazione sono state ampiamente esplorate. Esistono, infatti, evidenze che il trapianto possa fornire ottimi risultati anche nei pazienti che superano i limiti dei criteri di Milano. I tempi di attesa sono spesso così lunghi che l'HCC può progredire oltre tali criteri, ma se la progressione non si è associata ad invasione macrovascolare e diffusione extraepatica, la sopravvivenza di questi pazienti è paragonabile a quella dei pazienti trapiantati entro i limiti dei criteri stabiliti. L'espansione ai criteri dell'University of California, San Francisco (UCSF) (nodulo singolo <6.5 cm o 2-3 noduli <4.5 cm e diametro tumorale totale <8 cm) - che coinvolge circa il 5-10% di tutti i pazienti in lista (Yao FY, 2001; Yao FY, 2007) - è già stata messa alla prova, da un punto di vista

anatomo-patologico, attraverso il criterio del “fino a 7” (la somma della dimensione -in cm- del nodulo maggiore con il numero totale dei noduli deve essere  $\leq 7$ ) (Mazzaferro V, 2009). Il maggior problema relativo alla proposte di estensione è l’assenza di dati specifici sulla sopravvivenza complessiva e sul tasso di drop-out dalla lista d’attesa per i pazienti fuori dai correnti criteri, ma rispondenti ai criteri espansi. Sulla base delle evidenze disponibili non è consentita l’estensione dei criteri per l’eleggibilità al trapianto.

Riguardo alla sottostadiazione non vi sono ampi studi disponibili su pazienti trattati e costantemente seguiti. Piccoli studi prospettici suggeriscono che la sottostadiazione rispetto ai criteri di Milano di pazienti solo con malattia di fegato trattati con RFA o TACE ottiene un outcome di sopravvivenza a 5 anni simile a quello dei pazienti entro i criteri di Milano (Ravaioli M, 2008). Considerando i dati correnti, la sottostadiazione dei pazienti oltre i criteri di Milano non può essere adottata come strumento per affinare la selezione dei pazienti e sono richieste ulteriori ricerche. Nella circostanza in cui pazienti con sola malattia di fegato già in lista d’attesa progrediscono oltre i criteri di Milano, si raccomanda di tenere il candidato in sospenso finché la sottostadiazione mediante ablazione locale o chemioembolizzazione non sia stata ottenuta e mantenuta per un periodo di almeno 3 mesi. L’invasione vascolare e le metastasi costituiscono controindicazioni assolute al trapianto, anche per i criteri allargati o il down-staging, associandosi ad un rischio elevatissimo di mortalità per recidiva tumorale (D’Amico F, 2009).

Le terapie neo-adiuvanti per i pazienti entro i criteri di Milano in lista d’attesa sono usate nella maggior parte dei centri per ritardare la progressione del tumore. I principali studi di valutazione dei trattamenti neo-adiuvanti hanno mostrato che la RFA ottiene più alti tassi di necrosi completa (Mazzaferro V, 2004) rispetto alla TACE (Decaens, 2005). L’impatto di questi trattamenti sul tasso di drop-out, di recidiva e sopravvivenza è stato stimato da studi non randomizzati. Alcuni studi suggeriscono un impatto favorevole del trattamento nel ridurre i tassi di drop-out ad un range tra 0 e 25% (Mazzaferro V, 2004; Pomfret EA, 2010). Analisi costo-efficacia, al contrario, hanno evidenziato benefici per i trattamenti neo-adiuvanti solo quando i tempi di attesa superano i 6 mesi (Llovet JM, Gut 2002). Pertanto, sulla base delle evidenze disponibili si raccomanda di trattare i pazienti in lista d’attesa per il trapianto con ablazione locale, e con TACE come seconda scelta, quando il tempo d’attesa è stimato essere più di 6 mesi.

### Trapianto da donatore vivente

Il trapianto da donatore vivente (living donor liver transplantation, LDLT), che usa il lobo epatico destro di un donatore sano, è emerso come un'alternativa al trapianto di fegato da cadavere (Trotter JF, 2002). Nel 2000 c'è stato grande entusiasmo per il LDLT e si stimava che potesse costituire una quota significativa di pazienti trapiantati con HCC. Sfortunatamente, il rischio di morte ad esso associato (stimato in 0.3-0.5%) e di complicazioni (20-40%) per il donatore sano hanno diminuito l'interesse per questo tipo di trapianto (Trotter JF, 2002). I risultati dell'outcome con LDLT in confronto al LT da cadavere sono controversi (Gondolesi GE, 2004; Fisher RA, 2007). Studi costo-efficacia hanno suggerito che il LDLT può essere offerto a pazienti con carcinoma epatocellulare se la lista d'attesa supera i 7 mesi (Sarasin FP, 2001). Alcuni autori raccomandano un periodo di osservazione di 3 mesi prima del trapianto per evitare di trapiantare tumori potenzialmente aggressivi (Fisher RA, 2007).

### Ablazione locale

L'ablazione locale è considerata l'opzione terapeutica di prima linea per i pazienti agli stadi precoci (BCLC 0-A) non idonei alle terapie chirurgiche. Negli anni passati sono stati sviluppati e clinicamente testati diversi metodi per la distruzione chimica e termica del tumore (Lencioni R, Hepatology 2010). Una importante tecnica impiegata è l'iniezione percutanea di etanolo (percutaneous ethanol injection, PEI), che induce necrosi coagulativa della lesione come risultato della disidratazione cellulare, della denaturazione proteica e dell'occlusione chimica dei piccoli vasi tumorali. Successivamente, sono emerse terapie ablativie termiche e sono state classificate come trattamenti ipertermici (riscaldamento tissutale a 60-100°) – incluse l'ablazione a radiofrequenze (radiofrequency ablation, RFA), l'ablazione a microonde e l'ablazione laser – e crioablazione (raffreddamento tissutale a -20 e -60 gradi). La maggior parte delle procedure sono realizzate con approccio percutaneo. Anche l'ablazione con approccio video-laparoscopico è sicura ed efficace ed andrebbe presa in considerazione in pazienti con lesioni localizzate in sedi di scarsa visibilità ecografica o in contiguità di visceri cavi in cui l'approccio percutaneo non è fattibile.

La PEI è una tecnica ben stabilita per il trattamento dell'HCC di tipo nodulare che ottiene necrosi completa nel 90% dei tumori <2 cm, nel 70% di quelli di 2-3 cm e nel 50% di quelli di 3-5 cm (Livraghi T, 1992; Lencioni R, Hepatology 2010). Si è ipotizzato che la diffusione dell'etanolo sia bloccata dai setti fibrotici intratumorali e/o dalla capsula

tumorale. Ciò indebolisce la capacità curativa della tecnica, in particolare nei tumori > 2 cm. Alcuni autori, al fine di distruggere tali setti e favorire la diffusione dell'etanolo, hanno proposto di eseguire l'embolizzazione prima della PEI nei tumori di grandi dimensioni (Lencioni R, 1994). Nei pazienti con cirrosi in classe A secondo Child-Pugh e tumori in stadio precoce, il trattamento con PEI ha mostrato di risultare in tassi di sopravvivenza a 5 anni del 47-53% (Lencioni R, Hepatology 2010). La maggiore limitazione della PEI è l'alto tasso di recidiva locale, che può raggiungere il 43% in lesioni che superano i 3 cm (Khan KN, 2000). Altre tecniche di ablazione chimica, come l'iniezione percutanea di acido acetico (percutaneous acetic acid injection, PAI), non hanno offerto sostanziali vantaggi rispetto alla PEI (Huo TI, 2003).

La RFA è stata l'alternativa alla PEI più ampiamente valutata per l'ablazione locale dell'epatocarcinoma. L'energia generata dall'ablazione a RF induce la necrosi coagulativa del tumore producendo un 'anello di sicurezza' nel tessuto peritumorale, che potrebbe eliminare piccoli noduli satelliti non individuati. La RFA richiede poche sessioni di trattamento per ottenere effetti antitumorali comparabili a quelli della PEI. Alcuni RCT hanno confrontato RFA versus PEI per il trattamento dell'HCC in stadio precoce. Questi studi hanno costantemente mostrato che la RFA ha un effetto antitumorale più alto della PEI, conducendo ad un miglior controllo locale della malattia (Lencioni R, Hepatology 2010). Una meta-analisi ha confermato che il trattamento con RFA offre un beneficio in termini di sopravvivenza rispetto alla PEI nei tumori >2 cm (Cho YK, 2009). La RFA mantiene una buona efficacia necrotizzante anche nei confronti di lesioni fino a 3 cm. Necrosi tumorale completa inferiore al 50% è stata, invece, riportata in tumori >3 cm a causa della perdita di calore per il raffreddamento tissutale dovuto alla perfusione entro l'area sottoposta alla procedura (Lu DS, Radiology 2005). Inoltre, i tumori in sede sottocapsulare o adiacenti alla colecisti hanno un più alto rischio di ablazione incompleta e progressione tumorale locale o di complicazioni maggiori (Komorizono Y, 2003; Imamura J, 2008). Il principale inconveniente della RFA è il più alto tasso di complicazioni maggiori rispetto alla PEI (Imamura J, 2008). Considerando i dati riportati, i migliori risultati ottenuti in serie di pazienti con epatocarcinoma trattati con RFA forniscono tassi di sopravvivenza a 5 anni del 51-64% (Lencioni R, Hepatology 2010). Il miglior outcome è stato riportato in pazienti con tumori singoli e piccoli, solitamente <2 cm (Livraghi T, 2008). Predittori indipendenti di sopravvivenza sono la risposta iniziale completa, lo score di Child-Pugh, il numero e la dimensione dei noduli, e i livelli basali di AFP. Pertanto, i pazienti in classe A di Child-Pugh con piccoli tumori non chirurgici – che sono attesi per

una risposta completa – sono i candidati ideali per la RFA. Circa il 10-15% dei tumori con localizzazione difficile da trattare può essere approcciato con la PEI (Lencioni R e Llovet JM, 2005). Il trattamento di pazienti con tumori più grandi (3-5 cm), tumori multipli (3 noduli <3 cm) ed insufficienza epatica avanzata (classe B di Child-Pugh) potrebbe prendere in considerazione l'impiego di trattamenti combinati/sequenziali (TACE + RFA/PEI/microonde). Sebbene forniscano buoni risultati, questi trattamenti non sono in grado di ottenere tassi di risposta ed outcomes paragonabili ai trattamenti chirurgici, anche quando applicati come prima opzione (Ikai I, 2004).

L'ablazione a microonde, l'ablazione laser e la crioablazione sono state proposte per l'ablazione locale dell'HCC. L'ablazione a microonde ha un importante vantaggio rispetto alla RFA che consiste nel fatto che l'efficacia del trattamento è meno influenzata dai vasi localizzati in prossimità del tumore. L'ablazione a microonde ha mostrato un'equivalenza terapeutica rispetto alla RFA, ottenuta, però, con un maggior numero di sessioni di trattamento. L'ablazione laser ha riportato una sopravvivenza complessiva a 5 anni del 34%, in pazienti con HCC precoce. La crioablazione ha applicazioni limitate nel carcinoma epatocellulare. Il tasso di complicazioni è non trascurabile, in particolare a causa del rischio di 'crioshock', una condizione di minaccia per la vita risultante in insufficienza multi-organo, severa coagulopatia e CID, che segue la procedura (Lencioni R, Hepatology 2010).

### Chemioembolizzazione e terapie transcaterismo

La chemioembolizzazione (transcatheter arterial chemoembolization, TACE) è il trattamento di più ampio uso per gli HCC non resecabili (Takayasu K, 2006) e la terapia di prima linea raccomandata per i pazienti ad uno stadio intermedio di malattia (BCLC B) (Llovet JM et Bruix J, Hepatology 2003; Llovet JM, J Natl Cancer Inst 2008; Bruix J e Sherman M, 2011). L'epatocarcinoma mostra un'intensa attività neoangiogenetica durante la sua progressione. La logica dell'impiego della TACE è che l'infusione intra-arteriosa di un agente citotossico, seguita dall'embolizzazione dei vasi sanguigni che irrorano il tumore, dovrebbe indurre un forte effetto citotossico ed ischemico. La TACE va distinta dalla chemio-lipiodolizzazione (infusione di un'emulsione di chemioterapico misto a lipiodol) e dalla blanda embolizzazione transcaterete (transcatheter embolization, TAE), ove nessun agente chemioterapico è somministrato.

La TACE è una procedura che combina la somministrazione transcaterete di chemioterapico emulsionato con lipiodol e l'occlusione vascolare ottenuta con agenti

embolizzanti. La TACE ottiene risposte parziali nel 15-55% dei pazienti e ritarda significativamente la progressione tumorale e l'invasione macrovascolare. Il beneficio in termini di sopravvivenza della TAE e della TACE sono stati soggetti a pochi RCT che hanno fornito risultati contraddittori (GRETCH, 1995; Llovet JM, Lancet 2002). Complessivamente, la sopravvivenza media degli HCC intermedi è attesa essere intorno a 16 mesi, mentre dopo TACE è di circa 20 mesi. Come risultato di questi studi la TACE è stata stabilita come cura standard per i pazienti in stadio intermedio secondo la classificazione BCLC. I benefici della combinazione della TACE con procedure di ablazione locale sono in corso di valutazione.

I benefici della TACE non dovrebbero essere controbilanciati dall'insufficienza epatica indotta dal trattamento. Morti legate al trattamento sono attese in meno del 2% dei casi, se i pazienti sono correttamente selezionati. I migliori candidati sono pazienti con funzionalità epatica conservata e tumori multinodulari asintomatici, senza invasione vascolare, nè diffusione extraepatica (Llovet JM, Lancet 2002). L'invasione vascolare macroscopica e la diffusione extraepatica sono, infatti, controindicazioni maggiori per la TACE. La riserva funzionale epatica è anche una componente critica da valutare per un'attenta selezione. I pazienti dovrebbero presentare una funzione epatica relativamente ben conservata (solitamente classe di Child-Pugh A o B7 senza ascite), mentre quelli con scompenso epatico o più avanzata insufficienza epatica dovrebbero essere esclusi, dato che l'insulto ischemico può portare ad eventi avversi severi (GRETCH, 1995). La principale controindicazione alla TACE è l'assenza di flusso portale (per trombosi, anastomosi porto-sistemiche o flusso epatofugo) per il rischio di necrosi ischemica del fegato vitale ed aumento del rischio di morte trattamento-correlata per l'insufficienza epatica indotta. I pazienti con epatopatia avanzata (classe di Child-Pugh B e C) e/o sintomi correlati al cancro non sono candidati a questo trattamento per l'aumentato rischio di insufficienza epatica e di morte. In oltre il 50% dei pazienti si verifica la cosiddetta "sindrome post-embolizzazione" che si presenta con febbre, dolore addominale ed un moderato grado di ileo, ma solitamente è autolimitantesi nell'arco di 48 ore.

Non vi sono solide evidenze su quale sia il miglior agente chemioterapico e la più adatta strategia di ri-trattamento, anche se è raccomandato di applicare la procedura 3-4 volte l'anno e di usare la doxorubicina o il cisplatino come chemioterapici standard. Regimi più intensi, quali sessioni ogni 2 mesi, potrebbero indurre insufficienza epatica in un'inaccettabile percentuale di pazienti (GRETCH, 1995). La tecnica selettiva/superselettiva ottimizza i risultati della TACE (Golfieri R, 2011) e minimizza l'insulto ischemico al tessuto non tumorale.

La DEB-TACE (chemoembolization with drug-eluting beads), grazie al rilascio controllato e prolungato del farmaco da parte delle microsfere pre-caricate, riduce la frequenza e la severità della sindrome post-embolizzazione e degli effetti avversi sistemici del chemioterapico, incrementandone la concentrazione locale a livello del tumore. Inoltre, l'effetto embolizzante delle microsfere calibrate è maggiormente prevedibile rispetto a quello degli agenti embolizzanti impiegati per le TACE (Varela M, 2007).

### Radioembolizzazione e radiazione esterna

La radioembolizzazione (transcatheter arterial radioembolization, TARE) è definita come l'infusione nell'arteria epatica di sostanze radioattive, quali lo Iodio-131 ( $^{131}\text{I}$ ) marcato con lipiodol o microsfere contenenti Yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), o agenti simili. Data l'ipervascolarità dell'epatocarcinoma, le microsfere iniettate per via intra-arteriosa raggiungeranno preferenzialmente l'area di localizzazione del tumore ed emetteranno selettivamente alta energia, in forma di radiazione a basso potere di penetrazione, nel tumore. Correntemente, la più impiegata tecnica di radioembolizzazione usa microsfere rivestite di  $^{90}\text{Y}$ , un isotopo emittente radiazioni beta. Tenuto conto del minimo effetto embolico delle microsfere di  $^{90}\text{Y}$  il trattamento può essere usato con sicurezza anche in pazienti con trombosi portale (Kulik L, 2008).

L'uso della radioterapia convenzionale, con fascio esterno di radiazione, nel trattamento dell'epatocarcinoma è stata limitata dalla bassa tolleranza alle radiazioni del fegato cirrotico, che spesso comporta un'epatopatia radiazioni-indotta.

### Terapie sistemiche

Recentemente un inibitore multichinasi, il sorafenib, ha mostrato benefici in termini di sopravvivenza nei pazienti con HCC in stadio avanzato (Llovet JM, N Eng J Med 2008). Tale molecola è stata riportata avere attività contro Raf-1, B-Raf, VEGFR, c-kit receptors, tra gli altri recettori tirosina-chinasi e serina-treonina-chinasi (Wilhelm S, 2006). Tale progresso ha rappresentato una svolta nel trattamento di questa complessa malattia e prova che le terapie molecolari possono essere efficaci nel cancro.

Il carcinoma epatocellulare è riconosciuto tra i tipi di tumore più chemio-resistenti e fino al 2007 nessun farmaco sistemico era raccomandato per i pazienti con tumore avanzato, una situazione senza pari in oncologia. Il sorafenib è emerso come il primo trattamento sistemico efficace nell'HCC dopo 30 anni di ricerca ed è correntemente lo standard della cura per i pazienti con tumori avanzati (Llovet JM, N Eng J Med 2008). Dopo questa

scoperta, circa 56 agenti molecolari sono in corso di valutazione in trials clinici di fase II e III, i risultati finali dei quali potrebbero condurre ad aggiornamenti nelle raccomandazioni sul trattamento. L'epatocarcinogenesi è, infatti, un complesso processo multisteps nel quale diversi pathways di segnale sono implicati nella progressione e nella disseminazione tumorale: VEGF, EGF, Ras MAPK, il pathway PI3K/PTEN/Akt/mTOR, HGF/c-MET, IGFR, Wnt/beta-catenina. Altri pathways ed il loro ruolo sono oggetto di studio.

Il sorafenib, un inibitore orale multi-tirosina-chinasi, è stato il primo e rimane il solo farmaco che ha mostrato benefici in termini di sopravvivenza nei pazienti con epatocarcinoma avanzato. Seguendo un iniziale studio di fase II che mostrava un segno di efficacia (Abou-Alfa GK, 2006), è stata condotta un'ampia ricerca di fase III controllata in doppio cieco con placebo, che ha condotto a risultati positivi in termini di sopravvivenza (Llovet JM, N Eng J Med 2008). In questo trial il beneficio del sorafenib era di incrementare la sopravvivenza media da 7.9 mesi nel gruppo del placebo a 10.7 mesi nel gruppo con sorafenib, che rappresenta una riduzione del 31% nel rischio relativo di morte. Inoltre, il sorafenib ha mostrato un significativo beneficio in termini di tempo alla progressione (TTP) valutato da revisioni radiologiche indipendenti con un TTP medio di 5.5 mesi per il sorafenib e 2.8 mesi per il placebo. La rilevanza del beneficio in termini di sopravvivenza è stata simile a quella mostrata in un parallelo trial di fase III condotto nella popolazione asiatica del Pacifico, in cui l'epatite B era la principale causa di epatocarcinoma (Cheng AL, 2009). In quest'ultimo trial, la sopravvivenza media complessiva è stata di 6.5 mesi nel gruppo con sorafenib versus 4.2 mesi nel gruppo con placebo. Il peggior outcome dei pazienti inclusi in questo studio, indipendentemente dall'allocatione di trattamento, in confronto con lo studio SHARP, è dovuta al fatto che i pazienti avevano una malattia più avanzata. Da questi trials il sorafenib è emerso essere ben tollerato; i più comuni eventi avversi farmaco-correlati di grado 3 osservati in questi studi sono stati diarrea e reazioni cutanee a mani e piedi, che si verificano nell'8-9% e nell'8-16% dei pazienti, rispettivamente. La discontinuità nell'assunzione del farmaco dovuta ad eventi avversi è stata del 15% nel braccio con sorafenib e del 7% nel braccio con placebo. Gli eventi avversi farmaco-correlati sono stati considerati gestibili e non è stata descritta nessuna morte correlata a tossicità. Come risultato, il sorafenib ha ricevuto l'autorizzazione della European Medicines Agency (EMA) nell'ottobre 2007 ed è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) nel novembre 2007.

L'uso del sorafenib è raccomandato come terapia sistemica standard per il carcinoma epatocellulare. È indicato per pazienti con funzionalità epatica ben conservata (classe A di Child-Pugh) e con tumori avanzati (BCLC C) o per quei tumori che progrediscono

nonostante le terapie loco-regionali. Nessuna raccomandazione chiara è stata fatta per i pazienti in classe B di Child-Pugh, sebbene sia stato riportato un simile profilo di sicurezza nei pazienti in questa classe senza scompenso (Hollebecque A, 2011). È raccomandato di continuare il trattamento con sorafenib almeno fino alla progressione.

Altre forme di terapie sistemiche, incluse la chemioterapia, i composti ormonali e l'immunoterapia, hanno mostrato risultati non conclusivi o negativi e pertanto non sono raccomandate.

I pazienti (non trapiantabili) con malattia terminale (BCLC D), con insufficienza epatica o notevole compromissione dello stato clinico generale (PS>2), non traggono beneficio da alcun trattamento e dovrebbero ricevere solo una terapia sintomatica volta ad evitare o alleviare le sofferenze, comprendente la terapia del dolore, la nutrizione ed il supporto psicologico.

## 8. PARTE SPERIMENTALE

### **Introduzione**

Nella diagnosi di cirrosi epatica e delle sue complicanze l'ecografia ha un ruolo ormai consolidato (Bolondi L, 1982; Saverymuttu SH, 1986; Gaiani S, 1997; Colli A, 2003); anche per diagnosi dell'epatocarcinoma su cirrosi, le linee guida internazionali propongono questa metodica come indagine di primo livello per i programmi di sorveglianza da eseguire a cadenza semestrale (EASL 2001, AASLD 2005, AASLD 2010, EASL 2012, AISF 2012).

La diagnosi di very early HCC, vale a dire del nodulo neoplastico <2 cm, è sempre difficile ed è possibile trovare, anche in soggetti sottoposti a screening, neoplasie >2 cm, perchè la sensibilità diagnostica di questa metodica di indagine nel very early liver cancer non supera il 60% (Bolondi L, 2003; Singal A, 2009).

Per questo motivo sarebbe utile selezionare, tra i soggetti cirrotici, sottopopolazioni che abbiano un rischio maggiore di sviluppare il tumore al fine di sottoporli a sorveglianza più stretta e migliorare la diagnosi, senza però aumentare troppo i costi.

In letteratura, alcuni studi ecografici retrospettivi segnalano da tempo che il coarse nodular pattern, specialmente il coarse large nodular pattern, è un fattore di rischio per l'evoluzione in HCC (Mikami N, 1990; Tarao K, 1995; Kitamura S, 1995; Caturelli E, 2003; Azzaroli F, 2006).

Il coarse pattern è l'ecostruttura di più frequente riscontro nel fegato cirrotico (Caturelli E, 2003); quando nel suo contesto si rilevano multiple immagini nodulari ipoecogene di piccole dimensioni (<1 cm) si ha il coarse nodular pattern. Questo aspetto ecografico è stato definito, in relazione alla presenza di immagini nodulari di dimensioni superiori o inferiori a 6 mm, rispettivamente come coarse large nodular pattern (CLNP) e coarse small nodular pattern (CSNP). Anche studi istologici hanno dimostrato il rischio di evoluzione in HCC dei macronoduli in un fegato cirrotico (Hytioglou P, 1995).

Le linee guida sono molto dettagliate nel definire il comportamento da assumere nel caso di riscontro di un nodulo <1 cm, ritenendo di ridurre i tempi di sorveglianza a 3 mesi, ma non consigliano un follow-up più abbreviato in pazienti con coarse nodular pattern (Bruix J e Sherman M, 2005).

Noi abbiamo condotto uno studio longitudinale su una coorte di pazienti con cirrosi epatica con l'obiettivo di sottoporre a sorveglianza una coorte di soggetti affetti da cirrosi epatica, al fine di valutare:

- a) Se vi sono echopatterns a rischio di evoluzione in HCC;
- b) Se possano esserci echopatterns nei quali è utile un follow-up più ristretto.
- c) Se vi sono marker sierici che correlano con particolari echopatterns e/o con un maggiore rischio di sviluppo di HCC

**Tale ultimo obiettivo non è ancora possibile esporlo poiché sono in corso di dosaggio i marcatori previsti**

## **Materiali e Metodi**

### **Pazienti arruolati**

I pazienti arruolati erano soggetti con cirrosi epatica a varia eziologia, selezionati per essere sottoposti a sorveglianza secondo le linee guida AASLD 2011 (AASLD 2011).

Venivano esclusi i pazienti:

- con anamnesi positiva per neoplasia maligna
- con noduli epatici sospetti per neoplasia
- con età  $\geq 80$  anni
- con classe Child-Pugh  $\geq B9$

Dal gennaio del 2010 al Dicembre 2016 sono stati arruolati 425 pazienti, ma 65 (15.5%) sono stati esclusi. 360 sono stati inclusi nello studio, con un'età media di  $64.8 \pm 9.4$  anni. La mediana di follow-up è stata di 53 mesi (12-89 mesi). Sessantuno dei 360 pazienti sono stati persi a causa del decesso e dell'abbandono del follow up. Comunque tutti i 61 pazienti avevano raggiunto la soglia minima di almeno 12 mesi di follow up e quindi sono stati inclusi nello studio.

Tutti i pazienti acconsentivano ad aderire allo studio secondo la dichiarazione di Helsinki. Ai pazienti, all'ingresso in studio, veniva somministrato un questionario che aveva lo scopo di valutare eventuali comorbidità, la data d'inizio della patologia epatica e la sua eziologia, l'anamnesi farmacologica. I pazienti sono stati sottoposti ad esame obiettivo e a test di laboratorio per la valutazione della funzionalità epatica: dosaggio di transaminasi, fosfatasi alcalina, bilirubinemia, elettroforesi proteica, INR, emocromo, alfafetoproteina.

Qualora non fosse già documentata, veniva ricercata l'eziologia dell'epatopatia tramite dosaggio di HBsAg, antiHBs, antiHBc, antiHCV, ferritina, sideremia, transferrina. Nei pazienti risultati negativi è stato eseguito il dosaggio degli autoanticorpi ANA, AMA, ASMA, anti-LKM1.

E' stato calcolato lo score di Child-Pugh (Pugh RN, 1973).

### **Ecografie**

Le ecografie sono state eseguite al mattino, dopo un digiuno notturno di almeno 10 ore, con apparecchio Philips 5000 HDI, con sonda convex da 2-5 MHz a larga banda.

L'ecostruttura epatica veniva classificata nei seguenti echopattern:

1. Omogeneo (O): piccoli echi regolarmente ed omogeneamente distribuiti.
2. Brillante (B): echi fini, iperluminosi e fittamente stipati con un aumento dell'ecogenicità del parenchima epatico rispetto alla corticale renale, ben evidente in scansioni longitudinali che coinvolgono entrambi gli organi (Saverymuttu SH, 1986).
3. Coarse Pattern (C): echi di grosse dimensioni e di forte luminosità distribuiti in maniera disomogenea ed irregolare su tutto il parenchima epatico, specie negli strati superiori e medi (Saverymuttu SH, 1986).
4. Coarse small nodular pattern (CSNP): echi di grosse dimensioni con immagini ipoecogene di dimensioni < 6 mm disseminate in tutto il parenchima (Kitamura S, 1995).
5. Coarse large nodular pattern (CLNP): echi di grosse dimensioni con immagini ipoecogene di dimensioni comprese tra 6 mm e 1 cm disseminate in tutto il parenchima (Kitamura S, 1995).

Le ecografie venivano eseguite da 2 ecografisti con esperienza decennale. Il K di concordanza per i vari echopattern era di 0.8 (0.75-0.86).

Nella tabella 13 è riportato il K di concordanza per singolo echopattern.

In relazione allo score di Landis, la concordanza totale, cioè per tutti gli echopattern complessivamente, era ottimale; quella per ogni singolo echopattern oscillava tra buona e ottimale (Landis JR e Koch GG, 1977). Nessuna discordanza è stata riscontrata per il pattern O. La concordanza per i pattern B e C veniva valutata con confronto istologico, come già riportato (Soresi M, 2009; Soresi M, 2012). Per i pattern CSNP, CLNP e CHNP, tutte le immagini venivano conservate su CD e rivalutate dai due ecografisti e, se dopo tale rivalutazione il parere rimaneva discordante, veniva accettata la decisione di un terzo operatore esperto.

**Omogeneo**



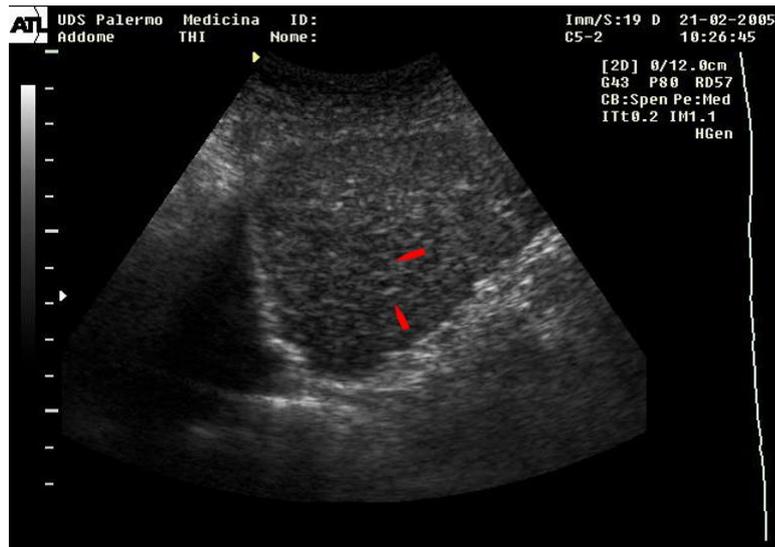
**Brillante**



**Coarse**



**Coarse small  
nodular pattern**



**Coarse large  
nodular pattern**



### **Elastografia**

L'elastografia era eseguita da un singolo operatore usando il Fibroscan (Echosense France), come precedentemente descritto (Li Vecchi, 2010). La *liver stiffness* era espressa in KPa ed il valore veniva considerato diagnostico di cirrosi epatica se  $>12$  KPa (Castera L, 2009).

### **Diagnosi di cirrosi**

La diagnosi di cirrosi epatica in 31 pazienti era istologica; in 60 era eseguita con elastografia (Fibroscan) (valore di  $>12$  KPa) (Castera L, 2009); nei rimanenti casi si fondava sulla scorta di parametri clinici (presenza di spider nevi, eritema palmare, ascite),

endoscopici (varici esofagee o gastropatia congestizia), ecografici (margini irregolari, ipertrofia dei segmenti di sinistra, ascite, segni d'ipertensione portale) (Bolondi L, 1982; Gaiani S, 1997; Colli A, 2003; Facciorusso D, 2005), anomalie di laboratorio (allungamento dell'INR, ipoalbuminemia, aumento delle gammaglobuline, piastrinopenia). Le caratteristiche demografiche e cliniche, l'eziologia ed il grado di compenso epatico sono riportate in tabella 14.

Segni ecografici d'ipertensione portale

Abbiamo valutato in conformità alle linee guida EFSUMB

- Il diametro della vena porta ,
- il diametro longitudinale della milza
- la riduzione delle variazioni respiratorie dei diametri della vena splenica e mesenterica sono stati misurati.

Valori normali sono quelli consigliati (riduzione delle variazioni respiratorie dei diametri della vena splenica e mesenterica ) da parte delle stesse linee guida (Berzigotti A, 2011).

- E' stato anche valutato il rapporto piastrine/milza è stato calcolato come descritto in precedenza da Giannini e colleghi come rapporto tra il numero di piastrine / mm<sup>3</sup> e il diametro bipolare della milza in millimetri (cut - off 909 ) (Giannini E, 2003).

I pazienti sono stati considerati avere ipertensione portale se presentavano:

- 1) i segni endoscopici di ipertensione portale, vale a dire: la presenza di varici esofagee, varici gastriche, gastropatia ipertensiva portale, ectasia vascolare gastrica antrale;
- 2) ascite e / o circoli collaterali;
- 3) Almeno 2 di questi segni: Diametro portale > 1,2 centimetri, variazioni respiratorie <40%, rapporto piastrine/milza <909.

Secondo l'assenza / presenza di ipertensione portale, i pazienti sono stati etichettati come 0/1 rispettivamente.

### **Follow-up**

I pazienti venivano sottoposti a visita medica e dosaggio dell'AFP ed ecografia a cadenza semestrale. I soggetti con CLNP o CHNP all'inizio della sorveglianza o che acquisivano questi echopattern durante la sorveglianza venivano sottoposti a follow-up trimestrale. I pazienti con un incremento volumetrico delle lesioni o comparsa di lesioni focali > 1 cm, in conformità alle linee guida, venivano considerati potenziali HCC ed avviati agli esami radiologici o alla biopsia, secondo le indicazioni previste (Bruix J e Sherman M, 2011).

Il follow-up minimo perchè il paziente fosse valutabile era di 6 mesi.

## **Diagnosi di epatocarcinoma**

La diagnosi TC o RMN dell'HCC "tipico" veniva posta quando il nodulo presentava ipervascolarizzazione precoce con wash-out venoso, secondo le linee guida AASLD 2005 e, successivamente, secondo le linee guida AASLD 2010 (Bruix J e Sherman M, 2005; Bruix J e Sherman M, 2010).

Quando necessario, veniva eseguita la biopsia epatica eco-guidata.

## **Stadiazione**

I pazienti con epatocarcinoma sono stati stadiati secondo la classificazione BCLC di Barcellona (Llovet JM, Semin Liver Dis 1999; Llovet JM, Lancet 2003; Llovet JM, J Natl Cancer Inst 2008). I pazienti con cirrosi epatica venivano stadiati secondo la classificazione clinica di Child-Pugh (Pugh RN, 1973).

## **Analisi statistica**

I dati sono stati espressi come media  $\pm$  DS se la distribuzione era normale; altrimenti come mediana e range (min-max). Quando la distribuzione dei dati era gaussiana, la differenza tra le medie di due gruppi è stata calcolata con il t di Student, mentre tra diversi gruppi con ANOVA, se questa era significativa con il test di Scheffè. Quando la distribuzione non era gaussiana, la differenza tra due gruppi è stata valutata con il Mann-Whitney U test; quando erano più di due gruppi con il Kruskal-Wallis e, se questo risultava significativo, con il Mann-Whitney U test. La differenza tra le frequenze è stata calcolata con il Fisher exact test, con il test del  $\chi^2$  e del  $\chi^2$  di Mantel Haenszel ( $\chi^2$ MH), quando appropriati.

Per determinare quali variabili al base-line erano predittive di degenerazione in HCC, è stato usato il modello di rischio proporzionale di Cox (regressione di Cox). Tutte le variabili che risultavano con  $P < 0.05$  venivano inserite in un'analisi multivariata per valutare quali erano fattori di rischio indipendenti.

Il metodo di Kaplan Mayer è stato usato per stimare il rischio cumulativo di HCC in rapporto all'echopattern del fegato al momento dell'arruolamento e della presenza d'ipertensione portale. Il periodo di osservazione usato nel calcolo del rischio è stato dal momento dell'inserimento dei pazienti in studio alla data della morte, della diagnosi della neoplasia o dell'ultimo controllo. I dati sono stati analizzati con SPSS ver.16.0. I risultati sono stati considerati significativi se  $P < 0.05$ .

## **Risultati**

La tabella 14 riporta le caratteristiche demografiche, di laboratorio, eziologiche e cliniche della popolazione in studio.

Come si evince dalla tabella, l'eziologia più frequente nella nostra casistica è quella virale 297/360 (82,5%). Circa un quarto dei pazienti, 100/360 (27.7%), avevano il diabete mellito; in 28 pazienti era impossibile risalire all'insorgenza del diabete; in coloro nei quali era possibile, 70/101 (69%), il diabete era insorto dopo la diagnosi di cirrosi epatica. La maggior parte dei pazienti era in classe A di Child-Pugh (88%). Dei 360 pazienti, 209 (58 %) presentavano segni endoscopici ed ecografici di ipertensione portale

L'echopattern più frequente è risultato il C, 245/360 (68%), mentre sostanzialmente sovrapponibili sono risultati gli altri aspetti ecografici: il BL era presente nel 12.2% dei casi, il CSNP nel 10%, il CLNP nel 7.5% ed infine l'H solo nell'2.2% dei casi (tabella 15).

Nella tabella 15 sono riportate le frequenze dei vari echopattern al base line in relazione all'evoluzione della corte in HCC. L'echopattern più frequente è stato il coarse, seguito dal BL. Nei pazienti con degenerazione neoplastica, il più frequente era il C seguito dal CLNP e dal CSNP.

Con il modello di Cox, (tabella 16), all'analisi univariata, tra le variabili saggiate, sono risultate statisticamente associate all'insorgenza di HCC: l'età,  $P=0.02$ ; il CLNP,  $P=0.02$ ; l'AFP,  $P=0.0001$ ; l'AST,  $0.03$ ; l'ALT,  $P=0.0001$ ; valori più bassi di albumina,  $P=0.005$ , la presenza di ipertensione portale  $P=0.02$ . All'analisi multivariata, con il modello di regressione di Cox, aggiustato per età, abbiamo trovato che le uniche variabili statisticamente associate al rischio di evoluzione in HCC erano: l'AFP,  $Hr=1.1$  (IC 95%:1.06-1.2) ( $P=0.02$ ); il CLNP,  $Hr=3.4$  (IC 95%= 1.6-6.6) ( $P=0.01$ ); l'età  $Hr=1.05$  (IC 95% 1.02-1.9) ( $P=0.03$ ) e l'ipertensione portale  $Hr= 2.1$ (IC95%= 2.1-4.1) ( $P=0.03$ ).

La figura 22 mostra le curve del rischio cumulativo per insorgenza di HCC in relazione alla presenza/assenza di ipertensione portale. Il rischio di HCC nel tempo è maggiore nei pazienti con ipertensione portale (log rank test=6.45,  $P<0.02$ ).

La Figura 23 mostra il rischio cumulativo per l'insorgenza di HCC in relazione a due echopattern CLNP e Coarse. Il Log rank test delle due curve mostra una differenza significativa (Log rank test =4.1 P=0.042).

**Non è ancora possibile valutare il ruolo di marcatori di laboratorio poiché sono in corso di dosaggio i marcatori previsti**

## **Discussione**

L'epatocarcinoma è uno dei tumori più frequenti al mondo e con un alto tasso di mortalità; è associato a diversi fattori di rischio, il più importante dei quali è la cirrosi (Fattovich G, 2004). Per questo motivo, le linee guida internazionali propongono dei programmi di sorveglianza ecografica semestrale nei pazienti affetti da tale malattia.

L'obiettivo di porre diagnosi in una fase precoce è correlato al fatto che l'efficacia dei trattamenti dipende molto dallo stadio della neoplasia al momento della diagnosi. Tuttavia è possibile trovare, anche nei pazienti in sorveglianza, neoplasie di dimensioni superiori ai 2 cm. Infatti, mentre la sensibilità dell'ecografia nella diagnosi di HCC è del 94%, nella diagnosi di very early cancer si riduce al 50-60% (Bolondi L, 2003; Singal A, 2009). Questa riduzione di affidabilità nelle neoplasie di più piccole dimensioni ha molteplici cause:

- l'ampia variabilità interosservatore dell'ecografia (Singal A, 2009);
- la presenza di obesità, ascite, meteorismo che riducono la qualità della metodica;
- la difficoltà di esaminare accuratamente i segmenti sottodiaframmatici dove l'attenuazione degli echi, evidente soprattutto nel fegato fibrotico, crea dei segmenti di difficile valutazione, in particolare nel caso di noduli di piccole dimensioni;
- l'epatocarcinoma infiltrante, che costituisce solo l'8% delle casistiche, ma che sfugge ad una diagnosi precoce ed ha un'evoluzione rapida (Stroffolini T, 1998; Borzio M, 2007; Soresi M, Eur J Intern Med 2010).

Non tutti i pazienti con cirrosi epatica hanno un uguale rischio d'insorgenza di HCC ed è per questo che si cerca, sempre più, di selezionare delle sottopopolazioni a maggior rischio, al fine di mirare meglio il programma di sorveglianza e ridurre i costi (Sherman M, 2004).

A questo proposito, va sottolineato come gli screening trimestrali siano risultati poco utili perché hanno aumentato il numero dei falsi positivi (noduli rigenerativi), senza ottenere un aumento della diagnosi di early HCC, comportando un incremento dei costi (Trinchet JC, 2011).

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare, se è possibile individuare dei fattori di rischio di HCC inserendo sia aspetti ecografici che sierologici che endoscopici.

In letteratura, alcuni studi hanno proposto il coarse nodular pattern come un fattore di rischio indipendente per l'insorgenza dell'epatocarcinoma (Mikami N, 1990; Tarao K, 1995; Kitamura S, 1995; Caturelli E, 2003; Azzaroli F, 2006). Tuttavia, questi lavori hanno, in gran parte, il limite di essere retrospettivi e di essere stati condotti con apparecchiature ecografiche di vecchia generazione.

Il coarse pattern, caratterizzato da echi grossolani disomogeneamente distribuiti nel parenchima epatico, è il più frequente aspetto con cui si presenta il fegato cirrotico (Romano M, 2007). Il coarse nodular pattern è caratterizzato dalla presenza di noduli multipli distribuiti in tutto il parenchima e che hanno dimensioni inferiori al centimetro (Kitamura S, 1995). Tali noduli, solitamente, sono ipoecogeni, a morfologia ovalare e a profili non ben differenziati; in questo si distinguono dal nodulo di HCC che, generalmente, è rotondeggiante e a profili ben definiti.

A seconda delle dimensioni dei noduli, sono stati distinti il coarse small nodular pattern se  $< 6$  mm e il coarse large nodular pattern se di dimensioni comprese tra 6 mm ed 1 cm (Mikami N, 1990; Tarao K, 1995; Kitamura S, 1995; Caturelli E, 2003; Azzaroli F, 2006). A volte la nodularità può essere iperecogena, condizione che noi abbiamo definito coarse nodular hyperechoic pattern.

Noi abbiamo condotto uno studio longitudinale, nel quale abbiamo seguito una coorte di 360 pazienti con cirrosi epatica per un tempo di di 53 mesi (12-89 mesi). Cinquanta di questi soggetti (13.9 %) avevano un'evoluzione in epatocarcinoma. Sono stati inseriti in studio solo i casi in cui l'epatocarcinoma insorgeva dopo 6 mesi dall'arruolamento. Questa scelta deriva dal fatto che la coesistenza di macronoduli ecografici al momento della diagnosi di HCC poteva essere dovuta a noduli neoplastici.

Tra le variabili considerate come fattori di rischio per l'insorgenza di HCC, con la regressione di Cox, all'analisi univariata, si rivelano statisticamente significative: l'età, il CLNP, l'AFP, le ALT e, in maniera inversa, l'albuminemia e l'ipertensione

portale. Tuttavia all'analisi multivariata, aggiustata per la variabile confondente età, si confermavano solo l'AFP, il CLNP, l'età e l'ipertensione portale.

Il CLNP si conferma, pertanto, come pattern ecografico di maggior rischio di evoluzione verso l'epatocarcinoma. Studi istologici hanno rilevato che, in questi soggetti, l'indice di proliferazione epatica, valutato con tecniche di immunoreattività per la DNA polimerasi- $\alpha$  (Kitamura S, 1995), con la bromouridina (Tarao K, 1995) e con le *nucleolar organizer regions* (NORs) (Azzaroli F, 2006), è aumentato. L'aumento dell'indice di proliferazione, inoltre, si accompagna ad un aumento della presenza di macronoduli di rigenerazione o di noduli di rigenerazione che all'ecografia producono il CLNP. Inoltre, è noto dall'istologia come la presenza di una macronodularità coesiste spesso con l'HCC (Kew MC, 1981; Patterson AC, 1984; Nakamura Y, 1989). Noi conosciamo da tempo che il meccanismo dell'epatocarcinogenesi nella cirrosi è il "multiple steps" con il passaggio dal nodulo cirrotico, al nodulo di rigenerazione, al displastico, all'HCC; probabilmente il fegato macronodulare ha un maggior rischio poiché in diverse aree dell'organo questo meccanismo è attivato ed è potenzialmente cancerogenico. D'altro canto, che l'evoluzione del fegato cirrotico tenda alla nodularità nel tempo, è confermato, nel nostro studio, dalle modificazioni dei pattern ecografici. Infatti, noi abbiamo riscontrato una tendenza statisticamente significativa all'aumento dei pattern nodulari nel corso della sorveglianza e, tra questi, quello che più degli altri aumenta, a fine follow-up, è il macronodulare.

Nel nostro studio, l'AFP si conferma come un fattore di rischio indipendente per l'evoluzione in epatocarcinoma. Una recente meta-analisi chiarisce il vero ruolo dell'AFP. Questa molecola può essere considerata un fattore di rischio per HCC, ma il suo dosaggio nei programmi di sorveglianza ecografici è poco utile perché, in aggiunta all'ecografia, migliora di poco la sensibilità diagnostica dell'early cancer di questa metodica, portandola dal 64% al 70% (Singal A, 2009).

L'ipertensione portale è stata segnalata essere associata ad un più alto rischio di carcinoma epatocellulare nei pazienti con cirrosi compensata (Ripoll C, 2009; Tarantino G, 2009). È noto, tuttavia, che i segni endoscopici sono specifici ma poco sensibili per identificare i pazienti che già hanno ipertensione portale. Dati recenti suggeriscono che i parametri non invasivi possono indicare in modo affidabile la presenza o assenza di ipertensione portale clinicamente significativa in pazienti con cirrosi compensata (Berzigotti A, 2013). Nel nostro studio abbiamo utilizzato altri parametri non invasivi di ipertensione portale, come il diametro della vena porta e le modificazioni respiratorie, e quelli già noti in letteratura,

come ad esempio il rapporto milza / piastrine (Giannini E, 2003). L'Analisi cox uni e soprattutto multivariata mostra che l'ipertensione portale è un fattore di rischio indipendente di degenerazione neoplastica. Siamo consapevoli che questi dati devono essere confermati ed un grande limite del nostro studio è la mancanza di misure HVPG. Tuttavia, i nostri risultati sono supportati da studio di Ripoll, che ha trovato che i valori di HVPG > 10 mm Hg, con bassi livelli di albumina e eziologia virale, sono indicativi della degenerazione neoplastica in pazienti cirrotici. Anche se è difficile spiegare le ragioni di una tale associazione, alcune vie metaboliche del paziente cirrotico possono eventualmente stimolare ipertensione portale ed epatocarcinogenesi, come suggerito dal recente riscontro di incremento di heat shock protein nell' ipertensione portale (Buck M, 2014).

In conclusione, nel nostro studio, il CLNP e l'AFP si confermano fattori di rischio per l'epatocarcinoma, tuttavia a nostro parere il dato più interessante riguarda l'ipertensione portale non invasiva.

L'uso dell'AFP è limitato dal fatto che migliora di poco la sensibilità diagnostica dell'ecografia ed, al contrario, aumenta i costi dello screening.

Il nostro risultato sul CLNP, sia pur limitato dal piccolo numero di casi, conferma ancora una volta che questo echopattern è un fattore di rischio di evoluzione in HCC. Peraltro va ricordato che, malgrado il numero dei pazienti con CLNP sia piccolo nel nostro studio, tale dato è in accordo con i dati della letteratura, che riportano valori del 5.5% (Kitamura S, 1995), e va considerato che spesso, proprio questi pazienti, per la disomogeneità all'ecografia, suscitano maggior allarme e fanno ricorrere a frequenti e ripetuti esami radiologici diagnostici costosi. In particolare, dai nostri risultati emerge che l'associazione CLNP-HBV definisce una popolazione di pazienti a maggior rischio.

Tuttavia la sua associazione con l'ipertensione portale apre le porte a nuove prospettive e ulteriori studi sono necessari per l'analisi di un marker istologico o molecolare che consenta la selezione delle categorie a più alto rischio. In questo caso il quesito che potrebbe essere sollevato è se sia opportuno modificare il tempo di follow - up in una determinata sottopopolazione di pazienti.

TABELLA 13: Coefficiente di concordanza (K) dei due ecografisti per singolo echopattern classificato secondo lo score di Landis.

	K di concordanza	IC 95 %	Score di Landis
H	1	-	ottima
BL	0.85	0.80-0.90	ottima
C	0.90	0.85-0.95	ottima
CSNP	0.80	0.75-0.90	buona
CLNP	0.85	0.80-0.90	ottima
VP Ø cm	0.9	0.85-0.94	ottima
DL Milza	0.85	0.8-0.92	buona
VS e VM (Δ resp)	0.75	0.70-0.80	buona
Circoli collaterali	0.9	0.85-0.95	buona
Ascite	0.95	0.92-0.98	ottima

H, Homogeneous; BL, Bright liver; C, Coarse pattern; CSNP, Coarse Small Nodular Pattern; CLNP, Coarse Large Nodular Pattern; VP, Vena porta; DL, Diametro longitudinale; VS, Vena splenica; VM, vena mesenterica superiore.

TABELLA 14: Caratteristiche dei pazienti al baseline in relazione alla degenerazione neoplastica

Caratteristiche	Non evoluti in HCC N= 310	Evoluti in HCC N= 50	Totale N= 360
Età	64.3 ± 9.6	68.1 ± 7.8	64.8± 9.4
Maschi/Femmine	152/158	26/34	178/192
Virali/non virali	249/61	48/2	297/63
Albumina, g/L	3.9± 0.6	3.7± 0.6	3.9 ± 0.6
Bilirubina, mg/dL	0.9 (0.17 -1.9 )	1.02 (0.4 – 2.54)	0.9
AST, IU	52 (12 – 443)	74.5 (23 – 443)	56
ALT, IU	51 (8-477)	74 (15 – 477)	53
Piastrine x10 <sup>9</sup> /L	120 (26 – 280)	99 (35 – 227)	100
Child-Pugh classe, A/B	271/39	46/4	317/43
Child-Pugh score	5.5±0.9	5.3±0.6	5.4 ±0.7
Ascite	30	2	32
Encefalopatia	0	0	0
Ittero	18	4	25
Malattia cardiovascolare	52	7	59
Diabete	87	13	100
Ipertensione portale <sup>^</sup>	189	20	209

<sup>^</sup>Endoscopica + ecografica

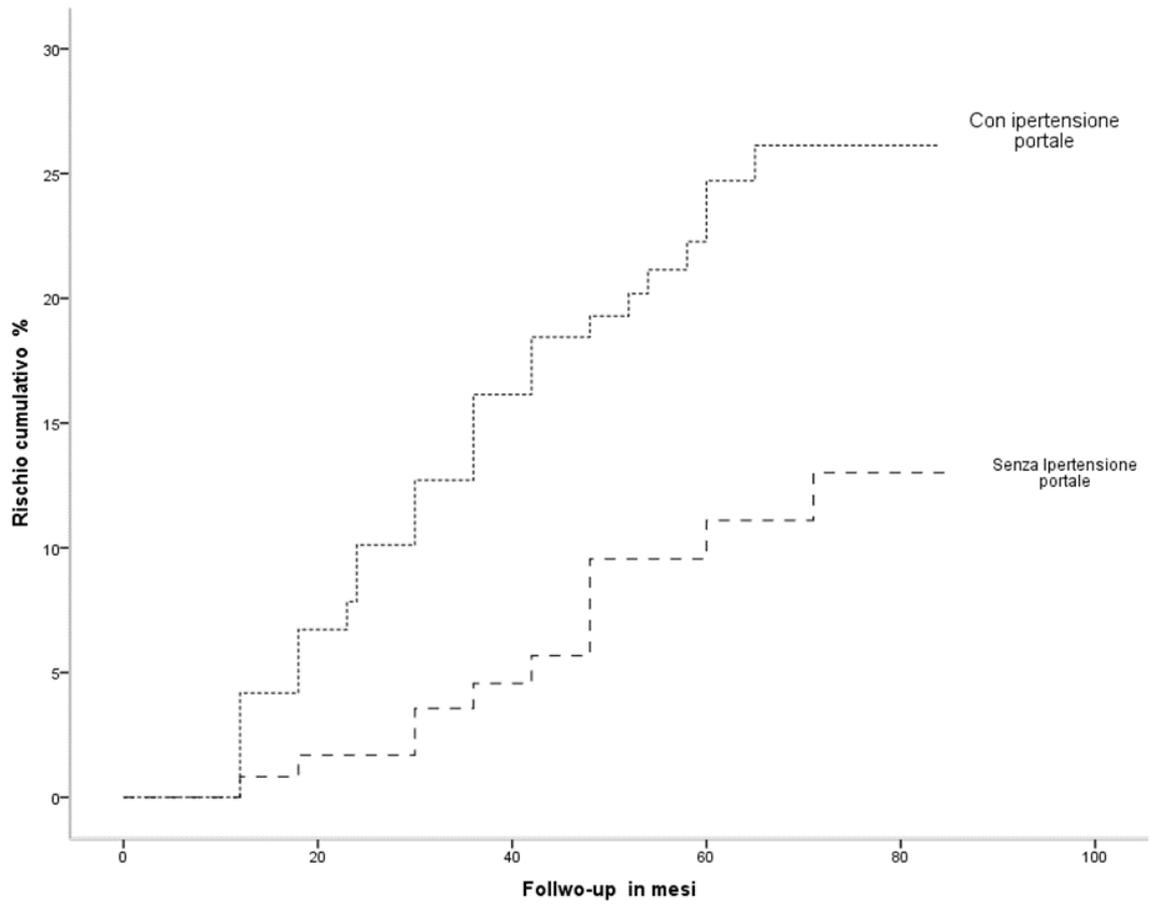
TABELLA 15. Caratteristiche ecografiche al baseline dei pazienti in relazione alla degenerazione neoplastica

Ecopatterns	Non evoluti in HCC N= 310	Evoluti in HCC N= 50	Totale N= 360
H	8	0	8
BL	44	0	44
C	210	35	245
CSNP	32	4	36
CLNP	16	11	27

TABELLA 16: Fattori di rischio per la progression ad HCC in accordo col modello di Cox all'analisi uni e multivariata

	HR univariata	95% CI	P<	HR multivariata	95% CI	P<
Età	1.05	1.02-1.08	0.02	1.05	1.02-1.9	0.03
Sesso	1.14	0.6-1.9	ns	-	-	
Eziologia virale	4.7	1.1-17.4	0.04	-	-	-
C	1.02	0.55-1.90	ns	-	-	
CSNP	1.02	0.36-2.84	ns	-	-	
CLNP	3.84	1.9-7.51	0.02	3.4	1.6-6.6	0.01
AFP ng/ml	1.1	1.06-1.2	0.0001	1.1	1.05-1.2	0.02
AST IU/L	1.04	1.01-1.07	0.03	-	-	-
ALT IU/L	1.1	1.03-1.2	0.0001	-	-	-
Albumina g/dl	0.51	0.31-0.81	0.005	-	-	-
Trattamento antivirale	0.9	0.7-2	ns	-	-	-
Child-Pugh score (A5-B8)	0.9	0.65-1.21	ns	-	-	-
Diabete Mellito	1.12	0.8-2.15	ns	-	-	
Ipertensione portale endoscopica	1.78	0.75-4.25	ns	-	-	-
Ipertensione portale	2.3	1.18-4.5	0.02	2.1	1.1-4.1	0.03

FIGURA 22: Curve di rischio cumulative per presenza/assenza d'ipertensione portale. Il log-rank test mostrava una differenza significativa (log-rank test =6.45; P <0.02).



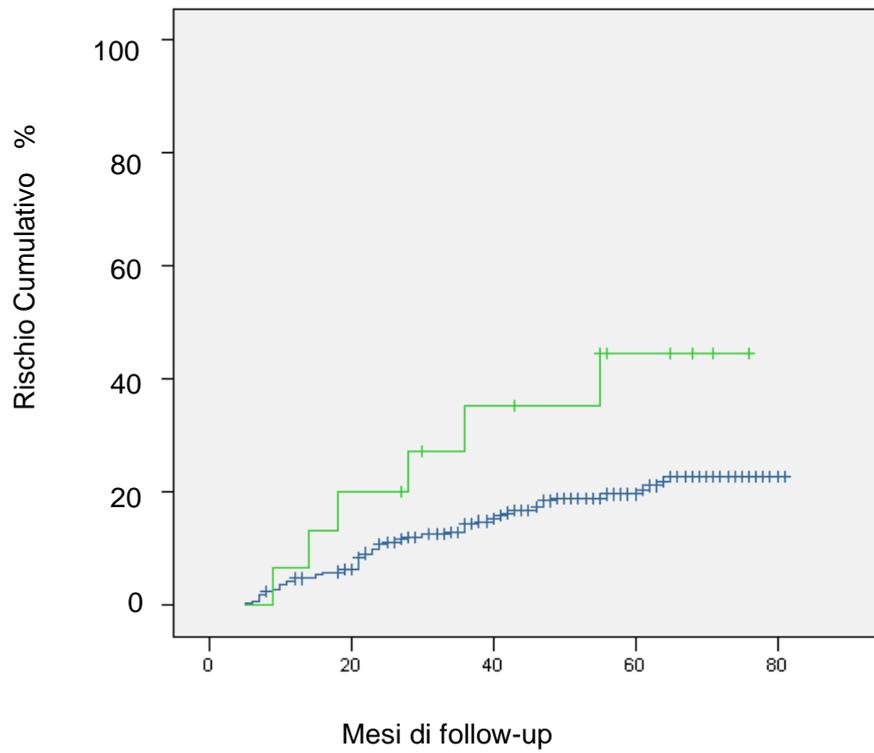


Fig 23 La figura mostra il rischio cumulativo per l'insorgenza di HCC in relazione a due echopattern CLNP  e Coarse . Il Log rank test delle due curve mostra una differenza significativa (Log rank test =4.1 P=0.042).

## BIBLIOGRAFIA

- Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4293–4300.
- Adachi Y, Tsuchihashi J, Shiraiishi N, Yasuda K, Etoh T, Kitano S. AFP-producing gastric carcinoma: multivariate analysis of prognostic factors in 270 patients. *Oncology* 2003;65:95–101.
- Adami HO, Chow WH, Nyren O, Berne C, Linet MS, Ekobom A, Wolk A, et al. Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1472–1477.
- AIRTUM. < <http://www.registri-tumori.it/cms/>>
- Andersson KL, Salomon JA, Goldie SJ, Chung RT. Cost effectiveness of alternative surveillance strategies for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1418–1424.
- Azzaroli F, Colecchia A, Lodato F, Trerè D, Bacchi Reggiani ML, Festi D, et al. A statistical model predicting high hepatocyte proliferation index and the risk of developing hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Jul 1;24(1):129-36.
- Barbara L, Benzi G, Gaiani S, Fusconi F, Zironi G, Siringo S, et al. Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a multi-variate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology* 1992;16:132–137.
- Beasley R. Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma.. *Hepatology* 1982;2:21S–26S.
- Befrits R, Hedman M, Blomquist L, Allander T, Grillner L, Kinnman N, Rubio C, et al. Chronic hepatitis C in alcoholic patients: prevalence, genotypes, and correlation to liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:1113–1118.
- Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, Massault P, Sauvanet A, Farges O. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg* 2000;191:38–46.
- Benvegnù L, Alberti A. Patterns of hepatocellular carcinoma development in hepatitis B virus and hepatitis C virus related cirrhosis. *Antiviral Research* 2001; 52: 199-207.
- Berzigotti A, Piscaglia F. Ultrasound in portal hypertension--part 1. *Ultraschall Med* 2011; 32: 548-68.
- Berzigotti A, Seijo S, Arena U, et al. Elastography, spleen size, and platelet count identify portal hypertension in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2013; 144: 102-11.

- Bolondi L, Gandolfi L, Arienti V, Caletti GC, Corcioni E, Gasbarrini G, Labo G. Ultrasonography in the diagnosis of portal hypertension: diminished response of portal vessels to respiration. *Radiology*. 1982;142:167-72.
- 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. Screening for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol* 2003;39:1076–1084.
- Bolondi L, Gaiani S, Celli N, Golfieri R, Grigioni WF, Leoni S, et al. Characterization of small nodules in cirrhosis by assessment of vascularity: the problem of hypovascular hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:27–34.
- Borzio, M, Bruno, S, Roncalli, M, Mels, GC, Ramella, G, Borzio, F, Leandro, G, Servida, E, Podda, M, 1995. Liver cell dysplasia is a major risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study. *Gastroenterology* 1995; 108: 812–817.
- Borzio M, Fargion S, Borzio F, Fracanzani AL, Croce AM, Stroffolini T, et al. Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 2003;39:208–214.
- Borzio M, Colloredo G, Pioltelli P, Quagliuolo M; Gruppo Epatologico Lombardo (GEL). Epidemiology and outcome of hepatocellular carcinoma in Lombardy. *Dig Liver Dis*. 2007 Nov;39(11):1011-1017.
- Bosetti C, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980–2004. *Hepatology* 2008;48:137–145.
- Bosetti C, Bianchi C, Negri E, et al. Estimates of the incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in Italy in 2002 and projections for the years 2007 and 2012. *Tumori* 2009; 95: 23-27.
- Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. 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;35:421–430.
- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:1208–1236.
- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020–2.
- Brunello F. Tumori primitivi maligni del fegato. Da *Manuale Italiano di Ecografia Internistica*. Delfino editore 2007; 129-140.
- Buck M, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ, et al. Novel inflammatory biomarkers of portal pressure in compensated cirrhosis patients. *Hepatology* 2014; 59: 1052-9.

- Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steato-hepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002;123:134–140.
- Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxì A, Cammà C. A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;51:1274–1283.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625–38.
- Callewaert N, Van Vlierberghe H, Van Hecke A, Laroy W, Delanghe J, Contreras R. Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics. *Nat Med* 2004;10: 429–434.
- Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003;125:89–97.
- Castera L. Transient elastography and other noninvasive tests to assess hepatic fibrosis in patients with viral hepatitis. *J Viral Hepat.* 2009 May;16(5):300-14.
- Catala V, Nicolau C, Vilana R, Pages M, Bianchi L, Sanchez M, et al. Characterization of focal liver lesions: comparative study of contrast enhanced ultrasound versus spiral computer tomography. *Eur Radiol* 2007 Apr;17(4):1066-73.
- Caturelli E, Bartolucci F, Biasini E, Vigliotti ML, Andriulli A, Siena DA, et al. Diagnosis of liver nodules observed in chronic liver disease patients during ultrasound screening for early detection of hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1-9
- Caturelli E, Castellano L, Fusilli S et al: Coarse nodular US pattern in hepatic cirrhosis risk for hepatocellular carcinoma. *Radiology* 2003; 226 :691-7
- Chalasani N, Horlander JC Sr, Said A, et al. Screening for hepatocellular carcinoma in patients with advanced cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2988-93.
- Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lee CM, Lin SM, et al. Taiwan Hepatoma Study Group. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 1348–1355.
- Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65–73.
- Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, You SL, Lu SN, Wang LY, Su J, et al. Carriers of Inactive Hepatitis B Virus Are Still at Risk Hepatocellular Carcinoma and Liver-Related Death. *Gastroenterology* 2010;135:1747–1754.
- Chen JG, Parkin DM, Chen QG, Lu JH, Shen QJ, Zhang BC, et al. Screening for liver

- cancer: results of a randomised controlled trial in Qidong, China. *J Med Screen* 2003;10:204–209.
- Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009;10:25–34.
  - Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire. *J Hepatol* 1999;31:133–141.
  - Cho YK, Kim JK, Kim MY, Rhim H, Han JK. Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies. *Hepatology* 2009;49:453–459.
  - Choi BI. Hepatocarcinogenesis in liver cirrhosis: Imaging Diagnosis. *J Korean Med Sci* 1998;13:103-116.
  - Clifford RJ, Zhang J, Meerzaman DM, Lyu MS, Hu Y, Cultraro CM, et al. Genetic variations at loci involved in the immune response are risk factors for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;52:2034–2043.
  - Colli A, Fraquelli M, Andreoletti M, Marino B, Zuccoli E, Conte D. Severe liver fibrosis or cirrhosis: accuracy of US for detection--analysis of 300 cases. *Radiology*. 2003; 227: 89-94
  - Colli A, Fraquelli M, Casazza G, Massironi S, Colucci A, Conte D, et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2006;101:513–523.
  - Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, Donato MF, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991;325: 675–680.
  - Cox DR. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc*. 1972;34:187-220.
  - Craxì A, Cammà C. Prevention of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2005;9:329–346.
  - Cucchetti A, Piscaglia F, Caturelli E, Benvegnù L, Vivarelli M, Ercolani G, et al. Comparison of recurrence of hepatocellular carcinoma after resection in patients with cirrhosis to its occurrence in a surveilled cirrhotic population. *Ann Surg Oncol* 2009;16:413–422.
  - D'Amico F, Schwartz M, Vitale A, et al. Predicting recurrence after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma exceeding the up-to-seven criteria. *Liver Transpl* 2009; 15:1278-1287.
  - de Franchis R, Meucci G, Vecchi M, Tatarella M, Colombo M, Del Ninno E, Rumi MG, et al. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med* 1993;118:191–194.

- Decaens T, Roudot-Thoraval F, Bresson-Hadni S, Meyer C, Gugenheim J, Durand F, et al. Impact of pretransplantation transarterial chemoembolization on survival and recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2005;11:767–775.
- Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, Farmachidi JP, Degott C, Guettier C, Trinchet JC, et al. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut* 2000;47: 131–136.
- Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, Everhart JE, Dienstag JL, Bonkovsky HL, et al. HALT-C Trial Group. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol* 2005;43:434–441.
- Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, Fiamengo B, Destro A, Moren-ghi E, Montorsi M, et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:725–734.
- Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, Ballardore E, Terracciano L, Sangiovanni A, et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2009;50:746–754.
- EASL-EORTC. Clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012 Apr; 56:908-43.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Handbook*. 7th ed. New York: Springer; 2010.
- Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 18,900 necropsies. *Cancer* 1987; 60:810-819
- El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745–750.
- El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med* 2000;160: 3227–3230.
- El-Serag HB, Richardson PA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2462–2467.
- El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:369-80.
- El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:1118–1127.
- Facciorusso D, Niro G, Conoscitore P, Adriulli A. Ultrasonographic and biochemical parameters in the non-invasive evaluation of liver fibrosis in hepatitis C virus chronic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 22: 769-74, 2005.
- Fattovich G, Brollo L, Giustina G, Noventa F, Pontisso P, Alberti A, Realdi G, et al. Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B. *Gut* 1991;32:294–298.

- Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997;112:463–472.
- Fattovich G, Giustina G, Realdi G, Corrocher R, Schalm SW. Long-term outcome of hepatitis B e antigen-positive patients with compensated cirrhosis treated with interferon alfa. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). *Hepatology* 1997;26: 1338–1342.
- Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127:Suppl 1:S35-S50.
- Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol* 2008;48:335–352.
- Fisher RA, Kulik LM, Freise CE, Lok AS, Shearon TH, Brown Jr RS, et al. A2ALL Study Group. Hepatocellular carcinoma recurrence and death following living and deceased donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:1601–1608.
- Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Sole M, Ayuso JR, Boix L, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;47:97–104.
- Freeman Jr RB, Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, et al. UNOS/OPTN Liver Disease Severity Score, UNOS/OPTN Liver and Intestine, and UNOS/OPTN Pediatric Transplantation Committees. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl* 2002;8:851–858.
- Gaiani S, Gramantieri L, Venturoli N, Piscaglia F, Siringo S, D'Errico A, Zironi G, Grigioni W, Bolondi L. What is the criterion for differentiating chronic hepatitis from compensated cirrhosis? A prospective study comparing ultrasonography and percutaneous liver biopsy. *J Hepatol* 1997; 27:979–985.
- Gambarin-Gelwan M, Wolf DC, Shapiro R, et al. Sensitivity of commonly available screening tests in detecting hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients undergoing liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1535-8.
- Giannini E, Botta F, Borro P, et al. Platelet count/spleen diameter ratio: proposal and validation of a non-invasive parameter to predict the presence of oesophageal varices in patients with liver cirrhosis. *Gut* 2003; 52:1200
- Giordano TP, Kramer JR, Soucek J, Richardson P, El-Serag HB. Cirrhosis and hepatocellular carcinoma in HIV-infected veterans with and without the hepatitis C virus: a cohort study, 1992-2001. *Arch Intern Med* 2004;164:2349–2354.
- Golfieri R, Cappelli A, Cucchetti A, et al. Efficacy of selective transarterial chemoembolization in inducing tumor necrosis in small (<5 cm) hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011; 53: 1580-1589.

- Gondolesi GE, Roayaie S, Munoz L, Kim-Schluger L, Schiano T, Fishbein TM, Emre S, et al. Adult living donor liver transplantation for patients with hepatocellular carcinoma: extending UNOS priority criteria. *Ann Surg* 2004;239:142–149.
- Grieco A, Pompili M, Caminiti G, Miele L, Covino M, Alfei B, et al. Prognostic factors for survival in patients with early-intermediate hepatocellular carcinoma undergoing non-surgical therapy: comparison of Okuda, CLIP, and BCLC staging systems in a single Italian centre. *Gut* 2005;54:411–418.
- Group d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire (GRETCH). A comparison of lipiodol chemoembolization and conservative treatment for unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1995;332: 1256–1261.
- Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36:1206–1213.
- Hollebecque A, Cattan S, Romano O, Sergent G, Mourad A, Louvet A, et al. Safety and efficacy of sorafenib in hepatocellular carcinoma: the impact of the Child–Pugh score. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:1193–1201.
- Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:1995–2004.
- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991;350:427–428.
- Huo TI, Huang YH, Wu JC, Lee PC, Chang FY, Lee SD, et al. Comparison of percutaneous acetic acid injection and percutaneous ethanol injection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a prospective study. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:770–778.
- Hytioglou P, Theise ND, Schwartz M, Mor E, Miller C, Thung SN. Macroregenerative nodules in a series of adult cirrhotic liver explants: issues of classification and nomenclature. *Hepatology* 1995;21: 703–708.
- IARC. <<http://www-dep.iarc.fr/>>
- Ikai I, Arai S, Kojiro M, Ichida T, Makuuchi M, Matsuyama Y, et al. Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey. *Cancer* 2004;101:796–802.
- Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Risk Evaluation of Viral Load Elevation and Associated Liver Disease/Cancer–In HBV (the REVEAL–HBV) Study Group. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006;130:678–686.
- Imamura J, Tateishi R, Shiina S, Goto E, Sato T, Ohki T, et al. Neoplastic seeding after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2008;103:3057–

3062.

- International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009;49:658–664.
- Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, Imamura H, et al. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;134:1908–1916.
- Izzo F, Cremona F, Delrio P, et al. Soluble interleukin-2 receptor levels in hepatocellular cancer: A more sensitive marker than alfa fetoprotein. *Ann Surg Oncol* 1999;6:178-85.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71–96.
- Ji J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med* 2009;361:1437–1447.
- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464–470.
- Kew MC. Clinical, pathologic and etiologic heterogeneity in hepatocellular carcinoma: evidence from Southern Africa. *Hepatology* 1981; 1:366–369.
- Kew MC, Macerollo P. Effect of age on the etiologic role of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma in blacks. *Gastroenterology* 1988;94:439–442.
- Khalili K KT, Jang HJ, Haider MA, Guindi M, Sherman M. Implementation of AASLD hepatocellular carcinoma practice guideline in north america: two years of experience. *Hepatology* 2008;48:362A.
- Khan KN, Yatsuhashi H, Yamasaki K, Yamasaki M, Inoue O, Koga M, et al. Prospective analysis of risk factors for early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma following ethanol injection. *J Hepatol* 2000;32:269–278.
- Kim CK, Lim JH, Lee WJ. Detection of hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules in cirrhotic liver: accuracy of ultrasonography in transplant patients. *J Ultrasound Med* 2001;20:99–104.
- Kitamura S, Iishi I, Masaharu T et al. Liver with hypocoic nodular pattern as a risk factor for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1995;108:1778-1784.
- Koike Y, Shiratori Y, Sato S, Obi S, Teratani T, Imamura M, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer* 2001;91:561–569.
- Kojiro M. Focus on dysplastic nodules and early hepatocellular carcinoma: an Eastern point of view. *Liver Transpl* 2004;10:S3–8.

- Komorizono Y, Oketani M, Sako K, Yamasaki N, Shibatou T, Maeda M, et al. Risk factors for local recurrence of small hepatocellular carcinoma tumors after a single session, single application of percutaneous radiofrequency ablation. *Cancer* 2003;97:1253–1262.
- Kudo M, Chung H, Osaki Y. Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (JIS score). *J Gastroenterol.* 2003;38(3):207-15.
- Kudo M. Review of 4th Single Topic Conference on HCC. Hepatocellular carcinoma: international consensus and controversies. *Hepatol Res* 2007;37:S83–S87.
- Kudo M. Multistep human hepatocarcinogenesis: correlation of imaging with pathology. *J Gastroenterol.* 2009;44 Suppl 19:112-118.
- Kudo M, Izumi n, Nokudo N, et al. Management of hepatocellular carcinoma in Japan: Consensus-Based Clinical Practice guidelines proposed by the Japan Society of Hepatology (JSH) 2010 update version. *Dig Dis* 2011; 29: 339-364.
- Kulik LM, Carr BI, Mulcahy MF, Lewandowski RJ, Atassi B, Ryu RK, et al. Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *Hepatology* 2008;47:71–81.
- Landis JR, Koch GG. Landis JR, Koch GG The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* (1977); 33:159–174
- Lang H, Sotiropoulos GC, Dömland M, Frühaufr NR, Paul A, Hüsing J, et al. Liver resection for hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver without underlying viral hepatitis. *Br J Surg* 2005;92:198–202.
- Laupacis A, Feeny D, Detsky AS, Tugwell PX. How attractive does a new technology have to be to warrant adoption and utilization? Tentative guidelines for using clinical and economic evaluations. *Cmaj* 1992;146:473–481.
- Lencioni R, Vignali C, Caramella D, Cioni R, Mazzeo S, Bartolozzi C. Transcatheter arterial embolization followed by percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1994;17:70–75.
- Lencioni R, Llovet JM. Percutaneous ethanol injection in hepatocellular carcinoma: alive or dead. *J Hepatol* 2005;43:377–380.
- Lencioni R, Piscaglia F, Bolondi L. Contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:848–857.
- Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2010;30:52–60.
- Lencioni R. Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;52:762–773.
- Leung TW, Tang AM, Zee B, Lau WY, Lai PB, Leung KL, et al. Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the

TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients. *Cancer* 2002;94:1760–1769.

- Li Vecchi V, Soresi M, Colomba C, Mazzola G, Colletti P, Mineo M, Di Carlo P, La Spada E, Vizzini G, Montalto G. Transient elastography: a non-invasive tool for assessing liver fibrosis in HIV/HCV patients. *World J Gastroenterol*. 2010 Nov 7;16(41):5225-32.
- Lin OS, Keeffe EB, Sanders GD, Owens DK. Cost-effectiveness of screening for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:1159–1172.
- Livraghi T, Bolondi L, Lazzaroni S, Marin G, Morabito A, Rapaccini GL, et al. Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A study on 207 patients. *Cancer* 1992;15:925–929.
- Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, Rolle E, Solbiati L, Tinelli C, et al. Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: is resection still the treatment of choice? *Hepatology* 2008;47:82–89.
- Llovet JM, Bruix J, Fuster J, Castells A, García-Valdecasas JC, Grande L, et al. Liver transplantation for treatment of small hepatocellular carcinoma: the TNM classification does not have prognostic power. *Hepatology* 1998;27:1572–1577.
- Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999;19:329–338.
- Llovet JM, Bustamante J, Castells A, Vilana R, Ayuso Mdel C, Sala M, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999;29:62–67.
- Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* 1999;30:1434–1440.
- Llovet JM, Mas X, Aponte JJ, Fuster J, Navasa M, Christensen E, et al. Cost effectiveness of adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma during the waiting list for liver transplantation. *Gut* 2002;50:123–128.
- 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, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003;37:429–442.
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907–1917.
- Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005;25:181–200.
- Llovet JM, Chen Y, Wurmbach E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, et al. A molecular

signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology* 2006;131:1758–1767.

- Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;48:1312–1327.
- Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 2008;48:S20–S37.
- Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:698–711.
- Llovet JM, Peña C, Shan M, Lathia C, Bruix J. Biomarkers predicting outcome of patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) randomized in the phase III SHARP trial. Presidential plenary session, AASLD 59th annual meeting, San Francisco. *Hepatology* 2008;48:372A.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–390.
- Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, Di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology* 2009;136:138–148.
- Lu DS, Yu NC, Raman SS, Limanond P, Lassman C, Murray K, et al. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: treatment success as defined by histologic examination of the explanted liver. *Radiology* 2005;234:954–960.
- Makuuchi M, Kokudo N, Arai S, Futagawa S, Kaneko S, Kawasaki S, et al. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res* 2008;38:37–51.
- Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in American patients. *Hepatology* 2003;37:1114–1121.
- Marrero J, Fontana R, Fu S, Conjeevaram H, Su G, Lok A. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005;42:218–224.
- Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology* 2005;41:707–716.
- Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sato T, Ohki T. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology* 2009;49:1954–1961.
- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver

transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334:693–699.

- Mazzaferro V, Battiston C, Perrone S, Pulvirenti A, Regalia E, Romito R, et al. Radiofrequency ablation of small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients awaiting liver transplantation: a prospective study. *Ann Surg* 2004;240:900–909.
- Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Metroticket Investigator Study Group. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol* 2009;10:35–43.
- Mazzaferro V, Bhoori S, Sposito C, Bongini M, Langer M, Miceli R, et al. Milan criteria in liver transplantation for HCC: an evidence-based analysis on 15 years of experience. *Liver Transpl* 2011;17:S44–S57.
- Mikami N, Ebara M, Yoshikawa M, Ohto M. Relationship between ultrasound-findings of low-echoic nodule of hepatic parenchyma in liver cirrhosis and development of hepatocellular carcinoma. *Jpn J Gastroenterol* 1990;87:1010-1019.
- Moriyama M, Matsumura H, Aoki H, Shimizu T, Nakai K, Saito T, Yamagami H, et al. Long-term outcome, with monitoring of platelet counts, in patients with chronic hepatitis C and liver cirrhosis after interferon therapy. *Intervirol* 2003;46:296–307.
- Nakamura Y, Kanel GC, Doishita K, Ohta G, Peters RL. Risk lesions in cirrhosis and development of hepatocellular carcinoma: an autopsy study. *Biomed Pharmacother.* 1989; 43:127–133.
- Nakashima Y, Nakashima O, Hsia CC, Kojiro M, Tabor E. Vascularization of small hepatocellular carcinomas: correlation with differentiation. *Liver* 1999;19:12–18.
- Nakashima Y, Nakashima O, Tanaka M, Okuda K, Nakashima M, Kojiro M. Portal vein invasion and intrahepatic micrometastasis in small hepatocellular carcinoma by gross type. *Hepatol Res* 2003;26: 142–147.
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-19.
- 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.
- Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985;56:918–928.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74–108.
- Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international

- consensus group for hepatocellular neoplasia (ICGHN). *Hepatology* 2009;49:658-664.
- Patterson AC, Kew MC, Herman AB, Becker PJ, Hadkinson J, Isaacson C. Liver morphology in Southern Africa blacks with hepatocellular carcinoma: a study within the urban environment. *Hepatology* 1984; 5:72–78.
  - Pomfret EA, Washburn K, Wald C, Nalesnik MA, Douglas D, Russo M, et al. Report of a national conference on liver allocation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Liver Transpl* 2010;16:262–278.
  - Pompili M, Riccardi L, Semeraro S, Orefice R, Elia F, Barbaro B, et al. Contrast-enhanced ultrasound assessment of arterial vascularization of small nodules arising in the cirrhotic liver. *Digestive and Liver Disease* 2008; 40: 206-215.
  - Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646-649.
  - Puoti M, Bruno R, Soriano V, Donato F, Gaeta GB, Quinzan GP, Precone D, et al. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: epidemiological features, clinical presentation and outcome. *Aids* 2004;18:2285–2293.
  - Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol* 2009;50:1142–1154.
  - Ravaioli M, Grazi GL, Piscaglia F, Trevisani F, Cescon M, Ercolani G, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: results of down-staging in patients initially outside the Milan selection criteria. *Am J Transplant* 2008;8:2547–2557.
  - Rimola J, Forner A, Reig M, Vilana R, de Lope CR, Ayuso C, Bruix J. Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;50:791–798.
  - Ripoll C, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace N, Burroughs A, et al. Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J Hepatol* 2009;50:923–928.
  - Romano M, Soresi M, Malaguarnera M, Romano G, Schiavone C, Montalto G. Le Epatopatie diffuse. *Da Manuale Italiano di Ecografia Internistica*. Delfino editore 2007; 75-93
  - 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.
  - Roskams T, Kojiro M. Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis* 2010;30:17–25.
  - Roskams T. Anatomic pathology impact on prognosis and response to therapy. *Clin Liver Dis* 2011;15:245–259.

- Sakamoto M, Hirohashi S. Natural history and prognosis of adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma: multi-institutional analysis of 53 nodules followed up for more than 6 months and 141 patients with single early hepatocellular carcinoma treated by surgical resection or percutaneous ethanol injection. *Jpn J Clin Oncol* 1998;28:604–608.
- Sakuma K, Saitoh N, Kasai M, Jitsukawa H, Yoshino I, Yamaguchi M, Nobutomo K, et al. Relative risks of death due to liver disease among Japanese male adults having various statuses for hepatitis B s and e antigen/antibody in serum: a prospective study. *Hepatology* 1988;8:1642–1646.
- Samuel M, Chow PK, Chan Shih-Yen E, Machin D, Soo KC. Neoadjuvant and adjuvant therapy for surgical resection of hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;21:CD001199.
- Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848–1856.
- Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: a 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology* 2006;43:1303–1310.
- Sangiovanni A, Manini MA, Iavarone M, Romeo R, Forzenigo LV, Fraquelli M, et al. The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Gut* 2010;59:638–644.
- Santagostino E, Colombo M, Rivi M, Rumi MG, Rocino A, Linari S, et al. A 6-month versus a 12-month surveillance for hepatocellular carcinoma in 559 hemophiliacs infected with the hepatitis C virus. *Blood* 2003;102: 78–82.
- Santi V, Trevisani F, Gramenzi A, Grignaschi A, Mirici-Cappa F, Del Poggio P, et al. Italian Liver Cancer (ITA.LI.CA) Group. Semiannual surveillance is superior to annual surveillance for the detection of early hepatocellular carcinoma and patient survival. *J Hepatol* 2010;53:291–297.
- Santi V, Buccione D, Di Micoli A, et al. The changing scenario of hepatocellular carcinoma over the last two decades in Italy. *J Hepatol* 2012; 56: 397-405.
- Sarasin FP, Giostra E, Hadengue A. Cost-effectiveness of screening for detection of small hepatocellular carcinoma in western patients with Child-Pugh class A cirrhosis. *Am J Med* 1996;101:422–434.
- Sarasin FP, Majno PE, Llovet JM, Bruix J, Mentha G, Hadengue A. Living donor liver transplantation for early hepatocellular carcinoma: a life-expectancy and cost-effectiveness perspective. *Hepatology* 2001;33:1073–1079.
- Sato T, Tateishi R, Yoshida H, Ohki T, Masuzaki R, Imamura J, et al. Ultrasound surveillance for early detection of hepatocellular carcinoma among patients with chronic

hepatitis C. *Hepatol Int* 2009;3:544–550.

- Sato Y, Sekine T, Ohwada S. Alpha-fetoprotein-producing rectal cancer: calculated tumor marker doubling time. *J Surg Oncol* 1994;55: 265–268.
- Saverymuttu SH, Joseph AE, Maxwell JD. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *Br Med J*; 1986 ;292: 13-15.
- Sersté T, Barrau V, Ozenne V, Vullierme MP, Bedossa P, Farges O, et al. Accuracy and disagreement of CT and MRI for the diagnosis of small hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules: role of biopsy. *Hepatology* 2012 Mar;55(3):800-6.
- Shen YC, Hsu C, Chen LT, Cheng CC, Hu FC, Cheng AL. Adjuvant interferon therapy after curative therapy for hepatocellular carcinoma (HCC): a meta-regression approach. *J Hepatol* 2010;52:889–894.
- Sherman M, Peltekian KM, Lee C. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: Incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* 1995;22:432-8.
- Sherman M, Klein A. AASLD single-topic research conference on hepatocellular carcinoma: Conference proceedings. *Hepatology*. 2004 Dec;40(6):1465-73.
- Shibata M, Morizane T, Uchida T, Yamagami T, Onozuka Y, Nakano M, Mitamura K, et al. Irregular regeneration of hepatocytes and risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis and cirrhosis with hepatitis-C-virus infection. *Lancet* 1998;351:1773–1777.
- Silva MA, Hegab B, Hyde C, Guo B, Buckels JA, Mirza DF. Needle track seeding following biopsy of liver lesions in the diagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2008;57:1592–1596.
- Singal A, Volk ML, Waljee A, Salgia R, Higgins P, Rogers MA, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30: 37–47.
- Soresi M, Giannitrapani L, Florena AM, La Spada E, Di Gesaro V, Rappa F, Alessandri A, Tripi S, Romano M, Montalto G. Reliability of the bright liver echo pattern in diagnosing steatosis in patients with cryptogenic and HCV-related hypertransaminasaemia. *Clin Radiol*. 2009 Dec;64(12):1181-7.
- 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.
- Soresi M, Noto D, Cefalù AB, Martini S, Vigna GB, Fonda M, Manzato E, Cattin L, Fellin R, Averna MR, Notarbartolo A. Nonalcoholic fatty liver and metabolic syndrome in Italy: results from a multicentric study of the Italian Arteriosclerosis society. *Acta Diabetol*. 2012 Jun 9.

- Sterling RK, Jeffers L, Gordon F, Sherman M, Venook AP, Reddy KR, et al. Clinical utility of AFP-L3% measurement in North American patients with HCV-related cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2196–2205.
- Stigliano R, Marelli L, Yu D, Davies N, Patch D, Burroughs AK. Seeding following percutaneous diagnostic and therapeutic approaches for hepatocellular carcinoma. What is the risk and the outcome? Seeding risk for percutaneous approach of HCC. *Cancer Treat Rev* 2007;33:437–447.
- Stroffolini T, Andreone P, Andriulli A, Ascione A, Craxi A, Chiaramonte M, Galante D, Manghisi OG, Mazzanti R, Medaglia C, Pilleri G, Rapaccini GL, Simonetti RG, Taliani G, Tosti ME, Villa E, Gasbarrini G. Characteristics of hepatocellular carcinoma in Italy. *J Hepatol*. 1998 Dec;29(6):944-52.
- Sun CA, Wu DM, Lin CC, Lu SN, You SL, Wang LY, Wu MH, et al. Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan. *Am J Epidemiol* 2003;157:674–682.
- Sung JJ, Tsoi KK, Wong VW, Li KC, Chan HL. Meta-analysis: treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:1067–1077.
- Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, Sakamoto M, Okazaki N, Takayasu K, Kosuge T, et al. Malignant transformation of adenomatous hyperplasia to hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1990;336: 1150–1153.
- Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, Sakamoto M, Yamamoto J, Shimada K, et al. Early hepatocellular carcinoma as an entity with a high rate of surgical cure. *Hepatology* 1998;28:1241–1246.
- Takayasu K, Arii S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, et al. Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology* 2006;131:461–469.
- Tanabe KK, Lemoine A, Finkelstein DM, Kawasaki H, Fujii T, Chung RT, et al. Epidermal growth factor gene functional polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *JAMA* 2008;299:53–60.
- Tanaka H, Imai Y, Hiramatsu N, Ito Y, Imanaka K, Oshita M, et al. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan from 1990 to 2003. *Ann Intern Med* 2008;148:820–826.
- Tanaka Y, Kurbanov F, Mano S, et al. Molecular tracing of the global hepatitis C virus epidemic predicts regional patterns of hepatocellular carcinoma mortality. *Gastroenterology* 2006;130:703-14.
- Tarantino G, Citro V, Conca P, Riccio A, Tarantino M, Capone D, Cirillo M, Lobello R, Iaccarino V. What are the implications of the spontaneous spleno-

renal shunts in live cirrhosis? *BMJ Gastroenterology* 2009; 9-89.

- 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.
- Teefey SA, Hildeboldt CC, Dehdashti F, et al. Detection of primary hepatic malignancy in liver transplant candidates: Prospective comparison of CT, MR imaging, US, and PET. *Radiology* 2003;226:533-42.
- Terminology of nodular hepatocellular lesion. International Working Party (IWP). *Hepatology* 1995;22:983-993.
- The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients. *Hepatology* 1998;28:751–755.
- Tong MJ, Blatt LM, Kao VW. Surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis in the United States of America. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:553-559.
- Trevisani F, Cantarini MC, Morselli Labate AM, De Notariis S, Rapaccini G, Farinati F, et al. Surveillance for hepatocellular carcinoma in elderly Italian patients with cirrhosis. Effects on cancer staging and patients survival. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1470–1476.
- Trevisani F, Santi V, Gramenzi A, Di Nolfo MA, Poggio PD, Benvegnù L. For the Italian Liver Cancer (ITA.LI.CA.) group. Surveillance for early diagnosis of hepatocellular carcinoma: is it effective in intermediate/advanced cirrhosis? *Am J Gastroenterol* 2007;102:2448–2457.
- Trichopoulos D, Bamia C, Lagiou P, Fedirko V, Trepo E, Jenab M, et al. Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case–control study. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1686–1695.
- Trinchet JC, Chaffaut C, Bourcier V, Degos F, Henrion J, Fontaine H, et al. Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatology* 2011;54:1987–1997.
- Trotter JF, Wachs M, Everson GT, Kam I. Adult-to-adult transplantation of the right hepatic lobe from a living donor. *N Engl J Med* 2002;346:1074–1082.
- Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993;328:1797–1801.
- Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 2007;46:474–481.
- Velazquez RF, Rodriguez M, Navascues CA, Linares A, Perez R, Sotorrios NG, Martinez I,

- et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2003;37:520–527.
- Verger E, Salameró M, Conill C. Can Karnofsky performance status be transformed to the Eastern Cooperative Oncology Group scoring scale and vice versa? *Eur J Cancer* 1992;28A:1328–1330.
  - Vilana R, Forner A, Bianchi L, Garcia-Criado A, Rimola J, Rodríguez de Lope C, et al. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma in cirrhosis patients may display a vascular pattern similar to hepatocellular carcinoma on contrast-enhanced ultrasound. *Hepatology* 2010;51: 2020–2029.
  - Villanueva A, Hoshida Y, Battiston C, Tovar V, Sia D, Alsinet C, et al. Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011;140:1501–1512.
  - von Herbay A, Vogt C, Häussinger D. Late-phase pulse-inversion sonography using the contrast agent levovist: Differentiation between benign and malignant focal lesions of the liver. *AJR* 2002;179:1273-9.
  - Von Herbay A, Vogt C, Willers R, et al. Real-time imaging with the sonographic contrast agent SonoVue: Differentiation between benign and malignant hepatic lesions. *J Ultrasound Med* 2004;23:1557-68.
  - Welch HG, Schwartz LM, Woloshin S. Are increasing 5-year survival rates evidence of success against cancer? *Jama* 2000;283:2975–2978.
  - Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5: 835–844.
  - Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:1451–1461.
  - Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, et al. Taiwan Community-Based Cancer Screening Project Group. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002;347:168–174.
  - Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008;100: 1134–1143.
  - Yang HI, Sherman M, Su J, Chen PJ, Liaw YF, Iloeje UH, Chen CJ. Nomograms for Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J Clin Oncol*. 2010;28: 2437–2444.
  - Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, Ascher NL, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not

adversely impact survival. *Hepatology* 2001;33:1394-1403.

- Yao FY, Xiao L, Bass NM, Kerlan R, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: validation of the UCSF-expanded criteria based on preoperative imaging. *Am J Transplant* 2007;7:2587–2596.
- Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, Arakawa Y, Ide T, Sata M, et al. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of hepatocarcinogenesis by interferon therapy. *Ann Intern Med* 1999;131:174–181.
- Yu JS, Kim KW, Kim EK, Lee JT, Yoo HS. Contrast enhancement of small hepatocellular carcinoma: usefulness of three successive early image acquisitions during multiphase dynamic MR imaging. *AJR Am J Roentgenol* 1999;173:597–604.
- Yu MW, Chang HC, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Liu CJ, Chen PJ, et al. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* 2000;92: 1159–1164.
- Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:265–272.
- Yu NC, Chaudhari V, Raman SS, Lassman C, Tong MJ, Busuttill RW, et al. CT and MRI improve detection of hepatocellular carcinoma, compared with ultrasound alone, in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:161–167.
- Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Tse E, Ng IO, Yuan HJ, Siu CW, et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology* 2004;39: 1694–1701.
- Yuen MF, Tanaka Y, Fong DY, Fung J, Wong DK, Yuen JC, But DY, et al. Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009;50:80–88.
- Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:417–422.