

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
IN FISIOPATOLOGIA SISTEMICA**

XXII CICLO

DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA E MEDICINA DI LABORATORIO

SEZIONE DI ANATOMIA ED ISTOLOGIA PATOLOGICA

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA SISTEMICA

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E
CORRELAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE DI
EPATOCARCINOMI**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Ezio MUSSO

Tutore

Chiar.mo Prof. Enrico Maria SILINI

Candidata:

Dott.ssa Elisa TAMBURINI

ANNO ACCADEMICO 2010 2011

INDICE

<u>ABBREVIAZIONI</u>	pag. 1
<u>SUMMARY</u>	pag. 4
<u>RIASSUNTO</u>	pag. 6
1 Introduzione	pag. 8
1.1 Dati epidemiologici	pag. 9
1.2 Eziologia e fattori di rischio	pag. 10
1.3 Sistemi di stadiazione	pag. 13
1.4 Caratteristiche e classificazione istologica	pag. 16
1.5 Genetica dei tumori	pag. 18
1.6 Epatocarcinogenesi	pag. 19
1.6.1 Cirrosi e stadi preneoplastici	pag. 20
1.6.2 Carcinoma epatocellulare	pag. 23
1.6.3 Principali pathway molecolari	pag. 26
1.6.4 Alterazioni CTNNB1 associate	pag. 30
1.6.5 Correlazione tra parametri clinico-patologici ed espressione immunoistochimica di CTNNB1/Glutamina sintetasi (GS)	pag. 31
1.7 Direzioni future	pag. 34
2 Scopo del lavoro	pag. 38
3 Materiali e metodi	pag. 39

3.1	Pazienti	pag.	40
3.2	Studio istopatologico ed immunoistochimico	pag.	41
3.3	Estrazione del DNA	pag.	42
3.4	Sequenziamento del gene CTNNB1	pag.	43
3.5	Microsatelliti ed analisi di LOH	pag.	45
3.6	Analisi statistica	pag.	47
4	Risultati	pag.	48
4.1	Caratterizzazione immunoistochimica	pag.	49
4.2	Correlazione fra variabili clinico-patologiche e reattività immunoistochimica	pag.	49
4.3	Analisi delle mutazioni del gene CTNNB1	pag.	50
4.4	Analisi di perdita allelica	pag.	51
4.4.1	Correlazioni di LOH e FAL con le caratteristiche cliniche, patologiche e mutazionali	pag.	52
4.5	Pattern di LOH durante la progressione tumorale	pag.	54
5	Discussione	pag.	56
6	Bibliografia	pag.	68
	<u>TABELLE</u>	pag.	84
	<u>FIGURE</u>	pag.	104
	<i>Ringraziamenti</i>	pag.	117

ABBREVIAZIONI

- **HCC:** HepatoCellular Carcinoma
- **CTNNB1:** Catenin (cadherin-associated protein) - Beta 1
- **GS:** Glutamina Sintetasi
- **HBV:** Hepatitis B Virus
- **HCV:** Hepatitis C Virus
- **TNM:** Tumor Node Methastasis
- **RFTA:** Radio-Frequency Thermal Ablation
- **GLUT-1:** Glucose Transporter-1
- **GLUL:** Glutamate-ammonia ligase
- **WNT:** Wingless pathway
- **APC:** Adenomatous Poliposis Cancer
- **GSK-3B:** Glycogen Synthase 3- β
- **CK-1 α :** Casein Kinase 1- α
- **RAS:** Rat Sarcoma
- **MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase
- **ERK:** Extracellular signal-regulated kinases
- **TCF:** T-Cell Factor
- **LEF:** Lymphoid Enhancer Factor
- **PI3K:** Fosfoinositide 3-chinasi
- **TKR:** Tyrosine Kinase Receptor
- **m-TOR:** mammalian Target Of Rapamycin

- **EGF:** Epidermal Growth Factor
- **HGF:** Hepatocyte Growth Factor
- **VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor
- **PDGF:** Platelet-Derived Growth Factor
- **ERK:** Extracellular signal-Regulated Kinases
- **PTEN:** Phosphatase and Tensin homolog
- **SOCS:** Suppressors Of Cytokine Signalling
- **NASH:** NonAlcoholic SteatoHepatitis
- **BCLC:** Barcelona Clinic Liver Cancer
- **AASLD:** American Association for the Study of Liver Diseases
- **EASL:** European Association for the Study of the Liver
- **e-HCC:** early-HCC
- **HSP-70:** Heat shock proteins
- **TERT:** Telomerase reverse transcriptase
- **CK-17:** Cytokeratin- 17
- **CK-19:** Cytokeratin- 19
- **CD34:** Hematopoietic progenitor cell antigen
- **HBx:** nonstructural protein of hepatitis B virus
- **TGF- β :** Tumor Grow Factor- β
- **LOH:** Loss Of Heterozygosity (perdita di eterozigosità)
- **LOH-a:** LOH - acquisita
- **MSA:** Microsatellite Analysis
- **MSI:** Instabilità dei microsatelliti
- **MSI-H:** High-frequency MSI

- **MSI-L:** Low-frequency MSI
- **MSS:** MSI-stabile
- **a-CGH:** array Comparative Genomic Hybridization
- **WNT4:** Wingless-type 4
- **FZD3:** Frizzled 3
- **SFRP1:** Secreted frizzled-related protein 1
- **PRLTS:** PDGF-Receptor beta-Like Tumor Suppressor
- **CYP2E1:** Cytochrome P450 2E1
- **ROS:** Reactive oxygen species
- **HNSCC:** Head and neck Squamous Cell Carcinomas
- **EDTA:** Acido EtilenDiamminoTetraacetico
- **DAB:** 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro
- **INK4:** Inhibitor cyclin-dependent Kinase 4
- **LPR5:** Lipoprotein Receptor-related protein-5

SUMMARY

Introduction and purpose:

The molecular basis of hepatocellular carcinoma (HCC) are complex and determined by the interaction of genetic and environmental factors specific to individual patients, characterizing each tumor as a distinct clinical-pathological entity. Subtypes of HCC can be defined integrating clinical and pathological parameters, mutation analysis and gene profiling.

It has recently been shown that HCCs with activation of the Wnt pathway have distinct morphology and improved survival. These tumors are characterized by mutations and / or nuclear immunoreactivity for β -catenin (CTNNB1), by overexpression of glutamine synthetase (GS) and are associated with specific gene expression profiles.

We evaluated the clinico-pathological and molecular correlations in a series of HCCs characterized by activation of the Wnt signaling pathway.

Materials and Methods

Surgical resection of 84 HCCs from 77 patients were investigated by immunohistochemical expression of GS and/or CTNNB1, mutational analysis of the CTNNB1 gene, and allelic losses (LOH) in chromosome arms 1p, 8p, 16p, 17p and 19q using a panel of eighteen microsatellite markers. In tumors showing distinct areas of neoplastic progression, the analysis was performed in all components to assess the timing of LOH acquisition .

Results

The tumors were divided two groups based on tissue immunoreactivity for GS and/or CTNNB1, 56 cases (GS +) and 28 controls (GS-).

HCC GS+ were characterized by viral etiology ($p = 0.05$), larger size (> 3 cm) ($p = 0.05$), expansive growth pattern (0.003), and peritumoral capsule ($p > 0.001$). Further stratification of cases into GS+/CTNNB1+, GS+/CTNNB1- indicated that most of the contribution to statistical significance was related to the first subgroup.

13 mutations of the CTNNB1 gene were identified, 1 single nucleotidic deletion and 12 missense mutations, mainly involving codons 32, 33, 37 and 45. Eight mutations occurred in HCC GS+/CTNNB1+, four in GS+/CTNNB1-, and 1 in GS-/CTNNB1- ($p = 0.023$).

The frequency of LOH was high at all chromosome arms, 8p (58%), 16p (52%), 1p (50%), 17p (48%), and 19q (32%).

Significant differences were observed in relation to a series of clinicopathological and molecular parameters. LOH in D8S136 and D17S520 correlated with patients' age. Allelic losses in 16p and 19q were frequent in patients with cirrhosis. Features of tumor aggressiveness, such as vascular invasion and histologic grade, correlated with 17p LOH. LOH in 1p, 8p and 19q were observed in larger nodules (>3 cm).

Some LOH segregate, differently according to the Wnt status (CTNNB1 immunoreactivity and / or mutations): D17S1358, D17S520, D8S1477 in positive cases; D1S255, D8S136 and D16S753 in negative cases.

The pattern of LOH in relation to tumor progression showed that the majority of allelic losses were acquired in advanced stages.

Conclusions

Based on morphological features, immunohistochemical expression of GS and / or CTNNB1, and CTNNB1 gene mutation status, a subtype of Wnt-activated HCCs can be defined.

LOH patterns point to chromosomal regions relevant to hepatocarcinogenesis and/or tumor progression and can help to identify putative tumor suppressor genes.

RIASSUNTO

Introduzione e scopo

Le basi molecolari dell'epatocarcinoma sono complesse e determinate dall'interazione di fattori ambientali e genetici specifici per ogni singolo paziente, caratterizzando ogni tumore come un'entità clinico-patologico-genetica unica e complessa. Distinti sottotipi di HCC sono stati definiti attraverso l'integrazione di parametri clinico-patologici, analisi di mutazione e gene profiling. È stato recentemente dimostrato come HCC con attivazione del pathway Wnt mostrino una distinta morfologia e migliore sopravvivenza. Tali HCC sono inoltre caratterizzati da mutazioni e/o immunoreattività nucleare di β -catenina (CTNNB1), da iperespressione di glutamina sintetasi (GS) ed associati a specifici profili di espressione genica.

Nel presente lavoro sono state valutate le correlazioni clinico-patologiche e molecolari di una serie di epatocarcinomi caratterizzati da attivazione del pathway di segnale Wnt.

Materiali e Metodi

Resezioni chirurgiche di 84 epatocarcinomi provenienti da 77 pazienti sono state indagate per espressione immunoistochimica di CTNNB1 e GS, analisi mutazionale del gene CTNNB1 e la presenza di perdite alleliche nei bracci cromosomici 1p, 8p, 16p, 17p e 19q utilizzando un pannello di diciotto markers microsatellitari.

L'analisi di perdita allelica (LOH) è stata condotta sia in noduli di HCC a stadio neoplastico avanzato sia in più componenti di una stessa neoplasia a diverso grado di progressione.

Risultati

L'immunoreattività del tessuto tumorale per GS e/o CTNNB1 ha reso possibile la suddivisione dei pazienti in due gruppi; 56 casi (GS+) e 28 controlli (GS-). HCC GS+ sono risultati significativamente caratterizzati da un'etiologia di tipo virale ($p=0.05$), dimensioni dei noduli ($>3\text{cm}$) ($p=0.05$), pattern di crescita di tipo espansivo (0.003), presenza di capsula peritumorale ($p>0.001$). L'ulteriore classificazione dei casi in GS+/CTNNB1+, GS+/CTNNB1- ha dimostrato come solamente i primi raggiungessero la significatività statistica. Sono state identificate 13 mutazioni di cui 1 delezione mononucleotodica e 12

mutazioni missenso coinvolgenti prevalentemente i codoni 32, 33, 37 e 45. Otto mutazioni risultavano in HCC GS+/CTNNB1+, quattro in HCC GS+/CTNNB1-, una in HCC GS/CTNNB1- (p=0.023). Sono state trovate frequenti perdite alleliche a livello dei bracci cromosomici 8p (58%), 16p (52%), 1p (50%), 17p (48%) e 19q (32%).

Sono emerse significative differenze in relazione ad una serie di variabili clinico-patologiche e molecolari. LOH in D8S136 e D17S520 correlavano con l'età del paziente. Perdite alleliche in 16p e 19q erano frequenti in pazienti con cirrosi. Caratteristiche di aggressività tumorale quali invasione e grado correlavano con LOH in 17p. Perdite in 1p, 8p e 19q erano tipiche di noduli con dimensioni maggiori (>3 cm). Alcune LOH segregavano in relazione all'attivazione o meno di Wnt (immunoreattività e/o mutazioni di CTNNB1): D17S1358, D17S520, D8S1477 in casi positivi; D1S255, D8S136 e D16S753 in casi negativi.

Il pattern di LOH in relazione alla progressione neoplastica ha dimostrato come la maggior parte delle perdite alleliche occorra negli stadi neoplastici più avanzati.

Conclusioni

Sulla base delle caratteristiche morfologiche, l'espressione immunoistochimica di GS e/o CTNNB1 e le mutazioni del gene CTNNB1, è possibile definire un sottotipo di HCC predittivo dell'attivazione della via di segnale Wnt.

Patterns di LOH si associano a specifiche regioni cromosomiche rilevanti per l'epatocarcinogenesi e / o la progressione del tumore; ciò può aiutare ad individuare presunti geni soppressori tumorali.

1. Introduzione

1.1 Dati epidemiologici

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è la forma più frequente di neoplasia maligna primitiva di fegato [1] di cui rappresenta circa l'80-95% dei casi, è la quinta neoplasia per frequenza e la terza causa per morte nel mondo [2-4].

Questi dati non si sono modificati nelle ultime decadi nonostante siano state introdotte nuove strategie di screening ed opzioni terapeutiche [5, 6]. L'HCC ha una incidenza differente nelle varie aree geografiche, variazione che è ascrivibile ad una differente esposizione a precise variabili, quali razza, etnia, sesso, livello socio-economico e di istruzione, maggiore prevalenza dell'infezione da HBV (*Hepatitis B Virus*) o contaminazione dei cibi con aflatossina. Tali fattori giocano un ruolo carcinogenetico diretto che promuove lo sviluppo di neoplasia causando malattia cronica di fegato [3].

Più dell'80% degli HCC si riscontrano nell'Africa Sub-Sahariana ed in Asia orientale, in particolare, la Cina è responsabile da sola del 50% di casi a livello mondiale. Altre regioni ad elevata incidenza sono Senegal, Gambia e Sud Corea; nel Nord e Sud America, Europa ed Oceania, l'incidenza risulta invece inferiore a 5 casi su 100000 abitanti.

L'incidenza dell'HCC è più elevata nel sesso maschile che in quello femminile con un rapporto variabile da 2:1 a 5:1, probabilmente a causa di una maggiore esposizione a fattori di rischio quali l'epatite virale, l'alcolismo ed il tabacco [3]. Anche l'età di insorgenza varia in funzione dell'area geografica considerata: nei paesi del Sud-Est Asiatico dove il principale fattore di rischio è l'infezione da HBV alla nascita o nei primi anni di vita, il picco d'incidenza è intorno ai 50 anni, ma non raramente la malattia può manifestarsi prima dei 30 anni. Nei paesi occidentali dove l'epatite virale si contrae in età giovanile o adulta tramite i rapporti sessuali o le trasfusioni di emoderivati, l'HCC si manifesta prevalentemente nella sesta e

settima decade [7]. Negli Stati Uniti, l'incidenza di HCC è attesa raddoppiare nei prossimi 10-20 anni a causa della diffusione epidemica di infezioni da HCV (*Hepatitis C Virus*) in coorti di età avanzata legata ad emoderivati contaminati ed all'abuso endovenoso di stupefacenti [3].

1.2 Eziologia e fattori di rischio

L'HCC insorge nell'80-90% dei casi in un contesto di cirrosi epatica, e nel restante 10-20% di epatopatia cronica. La cirrosi è quindi il singolo fattore di rischio più importante per lo sviluppo di questo tumore [8]. Studi prospettici di coorte hanno dimostrato che nei pazienti con cirrosi, l'HCC insorge con un tasso annuale del 3% [9] e rappresenta la più importante causa di morte [10].

La proliferazione epatocellulare sembra essere il fattore più importante nello sviluppo neoplastico che vede la progressione da cirrosi ad epatocarcinoma. Nei pazienti con cirrosi compensata il tasso annuale di neoplasia è del 5% in presenza di elevata proliferazione epatocellulare, mentre è dell'1% in pazienti con basso indice proliferativo [10].

Dal punto di vista istologico, la combinazione di alterazione della struttura epatica e di displasia a grandi cellule sembra avere il maggior potere predittivo di evoluzione in neoplasia, con un'incidenza cumulativa di HCC a 3 anni del 72% rispetto al 17% dei pazienti privi di queste alterazioni [11].

I principali fattori eziologici dell'HCC sono rappresentati da: epatite cronica da HCV e da HBV, abuso di alcool, esposizione ad aflatossine, malattie metaboliche del fegato come emocromatosi ereditaria, malattia di Wilson e deficit di α 1-antitripsina [12].

L'infezione cronica da HBV è la principale causa di HCC a livello mondiale, con circa 300 milioni di persone infette. Studi caso-controllo hanno dimostrato che i portatori cronici hanno

un rischio di circa 5-15 volte maggiore di sviluppare HCC, evento che si manifesta in particolare nelle aree in cui l'infezione da HBV è endemica e trasmessa in modo verticale dalla madre al neonato, con conseguente decorso cronico in più del 90% dei casi. Al contrario, nei paesi a bassa incidenza di HBV, la trasmissione è di tipo orizzontale e l'infezione predilige l'età adulta, con percentuali di risoluzione spontanea del 90% [13, 14]. Inoltre alcuni studi hanno riportato una maggiore severità della malattia epatica in caso di infezione da genotipo C [15].

L'infezione cronica da HCV è il fattore eziologico più importante nei paesi sviluppati, con una stima della prevalenza per l'Italia tra l'1 e l'1,9% [16]. Diversi studi hanno dimostrato un aumento del rischio di HCC circa 17 volte rispetto a controlli HCV-negativi [17]. Negli Stati Uniti, è stato evidenziato un progressivo aumento dell'incidenza di HCC, soprattutto nei maschi di razza bianca tra i 45 e i 55 anni, conseguenza dell'acquisizione dell'infezione negli anni '60-70 per trasfusioni di sangue, utilizzo di aghi contaminati nelle campagne di vaccinazione per la tubercolosi o per l'iniezione di farmaci o droghe [17, 18]. Vari studi hanno anche messo in evidenza l'azione sinergica della coinfezione HBV/HCV [19]. In particolare il genotipo 1b è associato ad un elevato rischio, statisticamente significativo, di sviluppare HCC. Per questo motivo pazienti con cirrosi con infezione da HCV di tipo 1b dovrebbero essere sottoposti ad una sorveglianza più intensiva, in modo da permettere un' identificazione precoce ed un trattamento più aggressivo della neoplasia [20].

Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato un'alta prevalenza di markers di HBV (16-70%) e di HCV (10-20%) negli alcolisti, con valori superiori nei pazienti che sviluppano HCC [21]. L'alcool agisce in modo sinergico con l'infezione da virus epatici e diabete mellito [22]. Nei paesi occidentali, l'alcool è infatti tuttora una rilevante causa di malattia epatica cronica e di cirrosi; l'ingestione di quantità di alcool superiore a 50-70 g/die è associata allo sviluppo di

cirrosi [23], anche se non vi è evidenza di un effetto carcinogenetico diretto dell'alcool che probabilmente è implicato in meccanismi non genotossici come l'induzione della via di biotrasformazione microsomiale P450-dipendente, che comporta la produzione di specie reattive dell'ossigeno che possono determinare un danno al DNA.

Le aflatossine sono uno dei più potenti agenti cancerogeni epatici negli animali e sono prodotte da funghi della famiglia *Aspergillus*, che trovano il loro ambiente ideale in mais o arachidi conservati in ambienti umidi. Vi sono alcune evidenze su una possibile suscettibilità genetica correlata a differenze individuali nel metabolismo delle aflatossine. Anche in questo caso si ipotizza un effetto sinergico delle aflatossine con l'HBV [24], mentre una interazione con HCV non è stata documentata [25]. L'emocromatosi, condizione che provoca un aumentato assorbimento del ferro alimentare determinandone un progressivo accumulo nell'organismo, è una malattia ereditaria frequente e rappresenta una delle poche patologie epatiche in cui l'HCC si sviluppa anche in assenza cirrosi. In questi soggetti l'HCC è la principale causa di morte prematura [26].

Altri fattori di rischio che richiedono un ulteriore approfondimento sono rappresentati dal fumo, dai contraccettivi orali, da fattori di tipo dietetico e dalla steatoepatite non alcolica (NASH). Molti componenti chimici del fumo di sigaretta sono cancerogeni epatici negli animali. Ma i risultati nell'uomo non sono univoci, infatti spesso è associato ad alcool, HBV ed HCV ed altri fattori di rischio [14, 27].

Per quanto concerne i contraccettivi orali, sia gli estrogeni che il progesterone agiscono da induttori e promotori di tumori epatici negli animali, ma ulteriori studi sono necessari per stabilire una franca correlazione nella specie umana [14].

La steatoepatite non alcolica (NASH) ha un ruolo eziologico di crescente rilevanza. Molti autori ritengono che questa patologia sia alla base di molte forme di cirrosi

criptogenetica e ciò è avvalorato dal riscontro delle stesse caratteristiche demografiche, quali obesità, diabete e sesso femminile [28].

Probabilmente anche fattori dietetici influiscono, infatti alcuni antiossidanti come i retinoidi ed il selenio hanno un'azione inibitoria sui tumori epatici indotti chimicamente negli animali. Alcuni studi hanno evidenziato un'attenuazione degli effetti dell'esposizione chimica e virale sullo sviluppo dell'HCC, mediato dagli antiossidanti presenti nella dieta [29]. Infine, uno studio di coorte ha dimostrato un aumento del rischio in soggetti fumatori e portatori di HBV con scarsa introduzione di vegetali [30]. La conoscenza dei fattori eziologici è al giorno d'oggi importante per l'identificazione precoce dei soggetti a rischio per HCC, i quali possono essere sottoposti a procedure di screening per la diagnosi precoce [31].

1.3 Sistemi di stadiazione

I criteri per la diagnosi di HCC sono stati definiti nel corso della Conferenza Monotematica di Barcellona del 2000 [32]. Non altrettanto definiti sono i criteri di stadiazione. A differenza della maggior parte delle altre neoplasie, per le quali i sistemi di stadiazione sono ben codificati ed universalmente accettati, nell'HCC i sistemi di stadiazione proposti non sono universalmente condivisi. Una delle ragioni che ne rendono difficile la stadiazione è legata al fatto che nella quasi totalità dei casi, l'HCC insorge in pazienti affetti da cirrosi e pertanto, la stadiazione non può non tener conto della severità della sottostante malattia epatica, spesso elemento condizionante la prognosi del paziente. Diversi sistemi di stadiazione sono stati proposti, ma attualmente la classificazione standard per il management clinico dell'HCC è quella proposta dalla BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) [33] e convalidata da AASLD ed EASL [32, 34]. Questo sistema include caratteristiche

macroscopiche del tumore (dimensioni, invasione vascolare, diffusione extraepatica) e variabili cliniche, quali la funzione epatica (classe di Child-Pugh) e lo stato fisico (Performance Status) [35]. Il principale vantaggio di questa classificazione è la correlazione tra stadio e modalità di trattamento. In base ai parametri precedentemente descritti, si identificano 5 stadi:

- **stadio molto precoce (stadio 0):** pazienti con singolo nodulo inferiore a 2 cm in cirrosi ben compensata e in assenza di ipertensione portale. Per questi casi, il trattamento indicato è la resezione chirurgica e la prognosi è eccellente con tassi di sopravvivenza a 5 anni superiori al 90%;
- **stadio precoce (stadio A):** pazienti con funzione epatica preservata (Child-Pugh A o B), con HCC singolo o multiplo, fino a 3 noduli, di dimensioni < 3 cm. Questi pazienti beneficiano di trattamenti curativi, quali resezione, trapianto epatico e procedure percutanee con radiofrequenze o iniezione di etanolo; i tassi di sopravvivenza sono del 50-70% a 5 anni;
- **stadio intermedio (stadio B):** pazienti asintomatici con classe Child-Pugh A e B con HCC > 5 cm o multifocale, in assenza di invasione vascolare o diffusione extraepatica; questi pazienti sono candidati ottimali alla chemioembolizzazione, che migliora l'outcome fino ad una mediana di 20 mesi [36];
- **stadio avanzato (stadio C):** pazienti con sintomi tumore-correlati e/o invasione vascolare o diffusione extraepatica, per cui i trattamenti sono principalmente palliativi e prevedono trials clinici con nuovi agenti terapeutici, tra i quali il più studiato è il Sorafenib, un inibitore multichinasico; le percentuali di sopravvivenza ad un anno sono del 50% [37, 38];

• **stadio terminale (stadio D):** pazienti con deterioramento fisico severo (PST>2) e/o Child-Pugh C; i trattamenti sono esclusivamente di tipo sintomatico e l'aspettativa di vita è di circa 3 mesi [34, 38-40].

La prognosi dell'HCC anche dopo resezione radicale è sconsigliata con meno del 20% di pazienti vivi a 10 anni. Quando un HCC è diagnosticato, per quanto di piccole dimensioni e clinicamente iniziale, in genere esso corrisponde ad una lesione biologicamente evoluta. Così oltre il 40% dei tumori di meno di 2 cm presentano già invasione vascolare ed anche le varianti più favorevoli recidivano a 3 anni in oltre il 50% dei casi.

La stadiazione TNM che si basa su parametri di tipo patologico, ha un limitato ruolo predittivo. Analogamente non è predittivo il *Child-Pugh score* che con un range da 1 a 3, basa la sua valutazione su 5 parametri clinici (livelli di bilirubina totale, albumina sierica, presenza o assenza di attività protrombotica, di ascite e grado di encefalopatia) non tenendo conto della variabilità clinica e biochimica della malattia, spontanea o indotta dall'intervento del medico. Proprio per questi motivi, l'unico sistema di stadiazione ampiamente validato è quello proposto dalla BCLC, il quale possiede, principalmente, delle implicazioni di carattere terapeutico, ma è anche in grado di fornire una stratificazione prognostica. Attualmente, nessun marcatore è in grado di riflettere i meccanismi biologici che governano la proliferazione e la disseminazione della neoplasia. Per questo ulteriori indagini sono necessarie per poter tradurre nella pratica clinica i dati genomici e proteomici e cambiare significativamente la predizione prognostica e le indicazioni al trattamento [41].

1.4 Caratteristiche e classificazione istologica

Nelle attuali strategie di diagnosi e gestione dell'HCC, l'istologia ha scarso rilievo. Secondo i recenti criteri di Barcellona, la diagnosi di HCC per noduli di dimensioni maggiori a 2 cm può essere formulata in base all'imaging (RMN, TC e CEUS, con concordanza di 2 metodiche) ed alla determinazione dell' α -fetoproteina sierica, senza prelievo tissutale e diagnosi istologica [42].

Un'ampia gamma di proliferazioni epatocellulari sono responsabili di lesioni nodulari epatiche, che vanno dai noduli di rigenerazione, ai noduli displastici di basso ed alto grado fino a forme di HCC precoce o avanzato. I principali criteri istopatologici che permettono di differenziare tali lesioni sono stati recentemente codificati e comprendono pattern di crescita, invasione stromale o dei tratti portali, densità cellulare e caratteristiche prettamente citologiche, quali le dimensioni cellulari, il grado di atipia nucleare e di cromasia, la regolarità o meno della membrana nucleare, la presenza o meno di nucleoli prominenti, il rapporto nucleo/citoplasmatico, la presenza di figure mitotiche [40].

La graduazione istologica degli HCC è insoddisfacente in quanto basata essenzialmente su criteri morfologici non validati, formulati negli anni '50. Quella comunemente usata è la classificazione di Edmondson che qualifica il grado di differenziazione della neoplasia in relazione al grado di atipia nucleare [43]. Il pattern architetturale, microtrabecolare, macrotrabecolare, acinare o solido, viene talora riportato nella diagnosi istologica, ma non costituisce criterio di classificazione.

Recentemente, sulla base dell'espressione delle citocheratine di tipo biliare (citocheratina-7 e citocheratina-19) sono stati individuati HCC a fenotipo intermedio (epatocolangiocarcinomi), con prognosi peggiore [44], ma tale classificazione non è ancora stata introdotta nella pratica

diagnostica.

Sulla base dei dati disponibili in letteratura, tra i parametri istologici, solo grado, pattern di crescita ed invasione vascolare si associano indipendentemente alla sopravvivenza [45] ma possono essere valutati in modo affidabile solo nella minoranza dei tumori resecabili e non su agobiopsie diagnostiche definendo come la biopsia dell'HCC sia attualmente indicata per dirimere la diagnosi differenziale tra macronoduli rigenerativi, noduli displastici e tumori precoci [46].

Nell'ultima decade, inoltre grazie all'affinamento delle metodiche di diagnosi precoce e sorveglianza dei soggetti con cirrosi, è stato anche possibile descrivere gli aspetti istopatologici dell'epatocarcinogenesi iniziale e codificare una forma di HCC precoce (*early*, e-HCC). Si tratta in genere di noduli inferiori a 2cm, che presentano un pattern di crescita vagamente nodulare o con margini indistinti, molto ben differenziati e privi di capsula fibrosa. Le cellule tipicamente sono di piccole dimensioni ed organizzate in sottili ed irregolari trabecole o in strutture pseudoghiandolari, con una densità cellulare almeno doppia ed un pattern di crescita di tipo permeativo rispetto al tessuto circostante [46, 47].

La diagnosi differenziale tra macronoduli di rigenerazione, noduli displastici e tumori precoci rappresenta ancora una questione aperta [46]. Studi di gene-profiling hanno tentato di identificare markers per e-HCC come HSP-70, Glipicano-3 [48], TERT ed altri, che rimangono ad oggi ancora da validare [33]. In particolare, HSP-70 e Glipicano-3, sono stati applicati in ambito immunostochimico in modo da poter confermare tali dati, ma allo stato attuale non vi è una trasposizione a livello diagnostico [49]. Altro ruolo importante che potrebbero avere le tecniche molecolari consiste nell'identificazione di marcatori

immunoistochimici determinanti per la diagnosi differenziale e per la stratificazione in specifici sottogruppi che presentano differente andamento clinico.

1.5 Genetica dei tumori

Negli ultimi decenni sono progressivamente aumentate le conoscenze sui meccanismi molecolari dei tumori umani. È emerso, pertanto, che il cancro è una malattia genetica, conseguente a mutazioni ereditate e/o somatiche acquisite in differenti loci genetici e che la tumorigenesi è un processo multi-step, in cui si possono individuare almeno tre momenti principali: induzione, promozione e progressione ognuno dei quali caratterizzato da un accumulo di mutazioni in almeno tre classi principali di geni: proto-oncogeni (geni che promuovono la proliferazione cellulare o inibiscono l'apoptosi), geni soppressori tumorali (geni che inibiscono la proliferazione cellulare o promuovono l'apoptosi), geni di riparazione del DNA (geni coinvolti nel mantenimento della stabilità genomica). In condizioni normali, gli oncogeni stimolano una crescita cellulare appropriata, mentre in seguito a mutazioni che determinano la loro amplificazione e/o sovraespressione si verifica un aumento di funzione ("gain of function"), che induce le cellule a proliferare anche in assenza di segnali. I geni soppressori tumorali normalmente agiscono inibendo la proliferazione cellulare oppure promuovendo l'apoptosi e in conseguenza di mutazioni o delezioni che determinano l'assenza della loro espressione e/o inattivazione, si verifica la perdita del controllo inibitorio sulla proliferazione cellulare, favorendo abnormi proliferazioni incontrollate tipiche dei tumori. I geni di riparazione del DNA sono coinvolti nel controllo del tasso di mutazioni che si verificano a carico degli altri geni, pertanto quando sono mutati sono incapaci di riparare gli errori con un conseguente accumulo di alterazioni geniche soprattutto a carico di oncogeni e

geni soppressori tumorali [50, 51]. Sebbene sia emerso che per l'insorgenza di un tumore siano necessari in una cellula più eventi mutazionali la probabilità che questo avvenga non è trascurabile dal momento che il materiale genetico nelle cellule delle lesioni pre-maligne e maligne è intrinsecamente instabile, facilmente mutabile, caratteristica nota come instabilità genetica [52].

1.6 Epatocarcinogenesi

I meccanismi molecolari dell'epatocarcinogenesi sono solo parzialmente noti [75]: lo sviluppo e la progressione degli HCC si associano ad eventi genetici differenti, quali perdita di eterozigosi (LOH, *Loss of heterozygosity*), perdita o guadagno di regioni cromosomiche, instabilità microsatellitare, mutazioni geniche e profili di trascrizione aberranti [53, 54]. Alcune vie di trasformazione, quali quelle relative ai circuiti di p53 e Wnt, sono state indagate ed hanno portato ad identificare varianti genetiche di HCC, ma il loro significato clinico non è ancora del tutto chiaro [55]. L'ipotesi di cancerogenesi più accreditata prevede un processo multistadio, in cui concorrono differenti eventi molecolari, responsabili della progressione di cellule staminali o epatociti maturi a noduli displastici, HCC precoce, HCC franco ed, infine, malattia neoplastica disseminata [54, 56]. Per quanto riguarda l'istogenesi esistono infatti due ipotesi principali; la prima, recentemente validata da uno studio che valutava l'espressione della citocheratina 19 (CK19), considerata un marker di staminalità, in ratti [57], focalizza l'attenzione sulla trasformazione maligna di una cellula staminale epatica, e la seconda, sostiene che siano proprio gli epatociti maturi, attraverso un processo di dedifferenziazione, a trasformarsi in cellula maligna con caratteristiche di cellula staminale facoltativa [47].

I noduli con displasia di grado elevato rappresentano vere e proprie lesioni pre-neoplastiche che evolvono in HCC con una frequenza del 30% in 1-5 anni [58]. L'acquisizione di un fenotipo maligno si accompagna alla neovascolarizzazione del nodulo con vasi neoformati di derivazione dai rami dell'arteria epatica. A questo stadio, i noduli di HCC sono ben differenziati, presentano un alto indice di proliferazione, che prevale nettamente sull'apoptosi compensatoria [59] e tendono a divenire meno differenziati e a presentare segni di invasione vascolare quando raggiungono le dimensioni di 1-1,5 cm [60]. In circa il 40% degli HCC la presenza di cellule poco differenziate che esprimono marcatori propri delle cellule progenitrici epatiche (CK-7, CK-19, CD34) si associa ad una prognosi peggiore e ad una maggiore frequenza di recidive [61]. L'analisi morfologica delle lesioni pre-neoplastiche e della progressione tumorale favorisce l'ipotesi di un progressivo de-differenziamento di epatociti maturi piuttosto che un blocco differenziativo di precursori epatici (cellule progenitore residenti), come invece ben dimostrato in alcuni modelli di carcinogenesi sperimentale epatica [62].

1.6.1 Cirrosi e stadi preneoplastici

Un aspetto fondamentale per la comprensione della patogenesi dell' HCC é quello di definire se e come, oltre che attraverso l'induzione del danno epatico cronico immunomediato che porta allo sviluppo della cirrosi, i virus epatitici HBV ed HCV contribuiscano direttamente alla trasformazione neoplastica dell'epatocita [63-65]. A lungo si è ipotizzato che il potenziale oncogenico di HBV fosse legato all'integrazione del DNA virale nel genoma delle cellule infettate con meccanismi analoghi ai retrovirus trasformanti. Recentemente l'utilizzo di nuove tecniche (Alu-PCR) ha permesso l'analisi di molte giunzioni tra DNA virale e cellulare

dimostrando un coinvolgimento di geni importanti sia per il controllo della crescita che per il differenziamento cellulare (recettore per i retinoidi, ciclina A, survivina, EGF) [66], ma fenomeni di mutagenesi inserzionale non sembrano rappresentare il prevalente meccanismo di trasformazione nell'HCC [63, 64]. Vi sono ormai molteplici evidenze epidemiologiche, studi di biologia molecolare e studi condotti su modello animale che dimostrano un ruolo diretto del virus dell'epatite B nell'epatocarcinogenesi. L'HBV è un virus a DNA in grado di integrarsi nel genoma dell'ospite ed alterare l'espressione di geni che controllano la crescita, come Ras, Raf, MAPK, ERK ed altri, in modo da offrire un vantaggio selettivo per la crescita degli epatociti. Inoltre, HBV è in grado di produrre varie proteine, tra cui la proteina *x* (HBx) che influenza la biologia della cellula infettata attraverso la modulazione di pathway intracellulari di trasduzione di segnali proliferativi, antiproliferativi e metabolici [63, 64]. HBx può agire da transattivatore per vari geni implicati nella regolazione della crescita, è infatti in grado di legarsi al gene oncosoppressore p53 bloccandone l'entrata nel nucleo ed interferendo sulla sua attività proliferativa [67].

Un altro meccanismo importante è rappresentato dalla risposta infiammatoria mediata dai linfociti T, responsabili del circolo vizioso fondato su necrosi, infiammazione e rigenerazione. Infine può contribuire al processo cancerogenetico l'evidenza di un'interazione tra il virus ed il reticolo endoplasmatico con conseguente sviluppo di stress ossidativo [53]. Anche il virus dell'epatite C (HCV), essendo causa di epatite cronica e cirrosi, interviene nella fase di promozione dell'epatocarcinogenesi stimolando indirettamente la proliferazione epatocellulare. E' possibile inoltre che l' HCV possa stimolare direttamente la proliferazione cellulare, essendo infatti in grado di evadere la risposta immunitaria dell'ospite, causa infezioni persistenti e malattia progressiva di fegato con maggiore frequenza di HBV [53]. Questo probabilmente è il risultato della fibrogenesi mediata dal TGF- β , in corso di

infiammazione cronica da HCV, che comporta un'accelerazione della fibrosi epatica ed un aumentato rischio di sviluppare cirrosi ed HCC [68].

Non vi sono invece ancora dati sufficienti a dimostrare che l'HCV possa avere un ruolo diretto in quella che è la fase di induzione, quale agente in grado di trasformare gli epatociti in cellule neoplastiche. In effetti negli ultimi anni diversi autori hanno riportato dati sperimentali che suggeriscono una diretta partecipazione dell'HCV nel processo oncogenetico attraverso proprie proteine strutturali e non strutturali. Esperimenti in vitro hanno dimostrato che la proteina *core* dell'HCV è in grado di trasformare fibroblasti interagendo con l'oncogene RAS [63, 65], di sopprimere l'espressione di alcuni geni, ed infine di modificare la suscettibilità delle cellule in coltura ai mediatori dell'apoptosi [69].

L'alcool rappresenta un altro fattore eziologico responsabile dell'induzione di alcuni particolari citocromi, tra cui il più importante, implicato nel metabolismo dell'etanolo, è il CYP2E1, con conseguente aumentata produzione di acetaldeide e di ROS, i quali compromettono l'integrità cellulare attraverso la formazione di addotti con lipidi, proteine e DNA. Inoltre questo citocromo è responsabile della trasformazione di composti precancerogeni in cancerogeni [70].

Le aflatossine costituenti principali implicati nella cancerogenesi epatica sono attivate all'interno degli epatociti ed il loro prodotto si inserisce nel DNA andando a formare un addotto mutageno con la guanosina. Particolarmente suscettibile all'azione delle aflatossine è la guanosina presente a livello del codone 249 sul gene p53 che viene mutata da G a T. Questa specifica mutazione risulta frequente negli HCC insorti in Cina e nelle regioni sub-sahariane dell'Africa; pazienti con HCC residenti in tale zone presentano infatti una forma mutata degli enzimi deputati alla detossificazione delle aflatossine, quali epossido idrolasi microsomiale e glutatione s transferasi, con risultato assente di tale attività detossificante [71].

È stato inoltre dimostrato come un eccesso di accumulo di ferro rappresenti probabilmente un ulteriore meccanismo implicato nella cancerogenesi in corso di emocromatosi. Il ferro ha un effetto sulla proliferazione cellulare, anche se i meccanismi attraverso i quali promuove la cancerogenesi sono molteplici. Molti di questi sono mediati dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno responsabili del danno perossidativo delle membrane lipidiche, con alterazione della permeabilità cellulare e disregolazione di processi metabolici e di danno cromosomico.

1.6.2 Carcinoma epatocellulare

Nonostante l'incredibile complessità di alterazioni genetiche, il genotipo della cellula cancerosa si palesa in una serie limitata di difetti nella fisiologia cellulare, comuni a diverse neoplasie, che Hanahan e Weinberg hanno raggruppati in sei principali alterazioni: autosufficienza in segnali di crescita, insensibilità ai segnali di inibizione della crescita, evasione dalla morte cellulare programmata (apoptosi), potenziale replicativo illimitato, angiogenesi protratta, capacità di invasione tissutale e di formare metastasi [72].

Essendo l'epatocarcinogenesi un processo patologico genetico continuo che definisce come perdite o guadagni di specifiche regioni cromosomiche non avvengano in modo casuale, ma a stadi diversi della progressione tumorale correlando con eziologia, grado ed evoluzione clinica [53] è proprio grazie all'integrazione di parametri clinico-patologici, di analisi di mutazione e di gene profiling che si sono potuti definire i due principali meccanismi della epatocarcinogenesi [55] (Figura 1.1):

- Il primo meccanismo caratterizzato dal punto di vista genetico da elevata instabilità cromosomica, alterazioni della regolazione del ciclo cellulare derivanti da mutazioni di p53 ed AXINA1, e da frequenti perdite alleliche sui cromosomi 1p,

4q, 6q, 13q, 16p, q, 17p, attivazione della via di segnale AKT, associato ad infezione da HBV, scarsa differenziazione tumorale e prognosi sfavorevole;

- Il secondo caratterizzato da stabilità cromosomica, mutazioni del gene CTNNB1 ed attivazione della via di segnale Wnt/Wingless, estesa metilazione del genoma, associato ad eziologia non virale o ad infezione da HCV, con prognosi più favorevole.

Il modello di cancerogenesi epatocellulare è stato recentemente rivisto ed aggiornato con la compilazione di una classificazione molecolare che include 6 diversi sottogruppi di HCC, che rispecchiano più efficacemente l'ampio spettro della malattia [73].

Secondo questa classificazione, le neoplasie epatocellulari possono essere stratificate in base ad una gerarchia di fattori determinanti che comprendono l'infezione da HBV, il tipo di instabilità genetica, lo spettro mutazionale (p53 e CTNNB1) ed imprinting parentale.

Il notevole progresso delle conoscenze e degli strumenti tecnologici nel campo della genetica molecolare e della citogenetica ha portato nella seconda metà degli anni '90 ad un notevole aumento delle informazioni disponibili circa le alterazioni genetiche presenti negli HCC. Gli studi di biologia molecolare, di analisi dei "microsatelliti" (ripetizioni di piccole sequenze polimorfiche - cioè possibilmente variabili da individuo ad individuo - di 2-6 nucleotidi sparse in tutto il genoma) mediante MSA (*PCR-based Microsatellite Marker Analysis*) e di citogenetica molecolare (CGH, *Comparative Genomic Hybridization*), hanno messo in evidenza un'ampia varietà di alterazioni cromosomiche, che vanno dai riarrangiamenti genomici legati all'integrazione dell' HBV-DNA, alla perdita di eterozigosi (LOH, *Loss Of Hetherozygosity*) in numerosi loci su un ampio numero di cromosomi, ad amplificazioni geniche [74, 75].

Nell'insieme, l'analisi molecolare ha dimostrato molteplici alterazioni genetiche ed epigenetiche, mutazioni puntiformi di singoli geni ed acquisizioni o perdite di interi loci cromosomici. Tra i geni possibilmente coinvolti nell'epatocarcinogenesi, vi sono c-myc (8q), ciclina A2 (4q), ciclina D1(11q), Rb1 (13q), AXINA1 (16p), p53 (17p), IGFR-II/M6PR (6q), p16 (9p), E-caderina (16q), SOCS (16p) PTEN (10q).

Studi di Comparative Genomic Hybridization (CGH), che permettono di valutare su una scala genomica ad alta risoluzione anomalie del corredo genetico quali, riarrangiamenti inter- ed intracromosomici, regioni di amplificazione genica e di delezioni attraverso un processo di ibridazione competitiva, hanno permesso di evidenziare alterazioni genomiche ricorrenti, come amplificazioni o aumenti del contenuto di DNA, in particolare nelle regioni in 1q, 6p, 8q, 11q, 17q [38, 53, 76].

Nell'HCC le alterazioni cromosomiche comprendono inoltre numerose perdite alleliche a carico dei cromosomi 1p, 4q, 8p, 13q, 16q, 17p ed 1q, 8q e 17q. LOH in 1p è stata riscontrata essere un evento più frequente in HCC di piccole dimensioni e ben differenziati mentre LOH in 16p e 17q sono più frequenti in tumori avanzati e metastatici. L'amplificazione della regione distale a 8q24 è risultata essere fortemente in relazione alla sovraespressione del proto-oncogene c-myc [53, 77].

Negli HCC, sono state ampiamente descritte mutazioni somatiche il cui livello mutazionale varia in relazione alla loro eziologia, ed i geni più frequentemente coinvolti sono p53, PIK3KA, AXINA1 e CTNNB1.

Sono stati descritti eventi epigenetici, quali anomalie di metilazione a livello del promotore di diversi geni, che pur non modificando la loro sequenza nucleotidica, ne determinano l'assenza di espressione, in particolare è stata identificata ipermetilazione dei geni p16/INK4A, E-caderina e COX2 [53, 77]. Il processo di metilazione è infatti un

fenomeno comune negli HCC che si verifica frequentemente in fegati adulti ed aumenta progressivamente con l'avanzare della gravità di epatite cronica accelerata dall'infezione da HCV [78].

L'enorme apporto di dati sopra citati, e ricavati da studi di danni strutturali e da profili di espressione genica, non ha tuttavia ad oggi permesso di definire in maniera esaustiva il processo che porta le cellule normali al cancro vero e proprio. Pertanto una comprensione della complessità dei pathway di trasduzione del segnale potrebbe identificare la chiave regolatoria del cancro e del potenziale sviluppo di terapie molecolari mirate.

1.6.3 Principali pathway molecolari

Le principali vie di segnale maggiormente implicate nella patogenesi degli HCC sono:

1. Vie dipendenti da recettori tirosin-chinasici (TKRs), dove ligandi come EGF, HGF, PDGF, VEGF attivano la via di RAS-MAPK, di PI3k-Akt-mTOR, HGF-MET [79]
2. Vie embrionali di proliferazione e di differenziazione, come Wnt-CTNNB1 ed Hedgehog;
3. Via di p53, uno dei più importanti oncosoppressori e controllori del ciclo cellulare.

Il tutto è schematizzato nella Figura 1.2

1. RAS/MAPK

Negli HCC umani ed in fegati cirrotici è stata spesso identificata una overespressione delle proteine Ras. Contrariamente è stata osservata una down-regulation dell'inibizione fisiologica del pathway Ras/Raf/MEK/ERK [80].

L'attivazione di RAS ha inizio con la cascata di fosforilazione che conduce alla traslocazione nel nucleo di ERK e conseguenti alterazioni a livello dell'espressione genica. Mutazioni di

RAS e di RAF sono state definite come eventi frequenti in molteplici tipi di neoplasie, come il cancro del pancreas, ma sono riscontrate raramente negli HCC in particolare in un sottogruppo che presenta una storia di esposizione al cloruro di vinile.

Gioca un ruolo critico nella cancerogenesi epatica il pathway di PI3K/Akt/mTOR. Akt può essere attivato da recettori tirosin-chinasici (EGF, IGF) o mediante attivazione costitutiva di PI3K con perdita della funzione dell'oncosoppressore PTEN, mediante silenziamento epigenetico o mutazioni somatiche. PTEN è un noto gene soppressore tumorale con frequenti mutazioni e delezioni somatiche in molteplici classi di tumori con percentuali variabili dal 34 al 44%. Negli HCC sono state dimostrate infatti frequenti perdite alleliche a carico della regione 10q, dove è localizzato tale gene e molteplici studi hanno riportato una più bassa frequenza di mutazioni in PTEN in contrasto ad altre patologie con percentuale variabile dallo 0 all'11% mostrando anche come livelli di PTEN diminuiscano significativamente in HCC che sviluppano cirrosi [56]. Un importante mediatore del pathway PI3K-Akt è mTOR che agisce come regolatore centrale della crescita e proliferazione cellulare, permettendo la progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

2. Wnt/CTNNB1

È frequente nell'HCC la riattivazione inappropriata del *pathway* di segnalazione Wnt in seguito ad alterazioni dei geni CTNNB1, axina ed E-caderina, il cui risultato finale è l'accumulo nucleare di β -catenina /CTNNB1 con proliferazione non controllata [74, 81].

Il pathway Wnt è coinvolto nel 30-40% degli HCC umani e nell'80% degli epatoblastomi. rivestendo un ruolo importante nella differenziazione, proliferazione, apoptosi ed embriogenesi. La β -catenina è una proteina multifunzionale di 92 kD, comprendente tra un dominio N-terminale ed uno C-terminale un sito di fosforilazione (GSK-3B), un sito di legame per la α -catenina, 13 armadillo repeats ed un dominio di transattivazione. Viene espressa in

epatociti normali a livello delle membrane cellulari ed è parte costitutiva delle “adherence junction” intercellulari, in quanto, ancora la porzione citosolica della E-caderina all’ α -actina del citoscheletro stabilizzandone il legame (Figura 1.3) [82].

In assenza di segnalazione da parte di Wnt il normale turnover della β -catenina citoplasmatica, è quello di essere fosforilata in specifici residui di serina e treonina N-terminali da parte del complesso multiproteico contenente; l’axina, la chinasi (GSK)-3 β (*glycogen synthase kinase B*) e la proteina APC (*adenomatous polyposis coli*) con conseguente degradazione ubiquitino-dipendente. Le proteine axina ed APC favoriscono il processo di fosforilazione di β -catenina da parte di CK-1 α e GSK-3 β e questo meccanismo omeostatico può essere alterato a diversi livelli. L’attivazione della via di segnale Wnt comporta il legame delle proteine Wnt ai propri recettori sulla superficie cellulare (Frizzled e LRP5/6) [83]; questo legame blocca la fosforilazione mediata da GSK-3 β e, di conseguenza, la degradazione della β -catenina, che si accumula quindi nel citosol. La β -catenina accumulata può traslocare nel nucleo, dove funge da coattivatore del complesso di trascrizione TCF/LEF che stimola l’espressione di geni bersaglio coinvolti nella proliferazione cellulare tra i quali c-myc, ciclina D1, fibronectina ed alcune metalloproteinasi, oltre che geni ad azione anti-apoptotica, o coinvolti nell’angiogenesi [81]. Il meccanismo della via di segnale Wnt/CTNNB1 è rappresentato in Figura 1.4 [84].

La via di segnale di Hedgehog gioca infine un ruolo fondamentale per la differenziazione cellulare, rigenerazione e biologia delle cellule staminali. E’ stata recentemente descritta una overespressione di Sonic Hedgehog nel 60% di 115 HCC umani [85] ed anche come l’attivazione di Smo possa mediare una overespressione di c-myc andando a giocare un ruolo importante nell’epatocarcinogenesi [38].

3. p53

L'ultima via di segnale altamente implicata nell'epatocarcinogenesi è rappresentata da p53, noto come "guardiano del genoma". P53 svolge un ruolo critico nella regolazione del ciclo cellulare, infatti, in presenza di danni del DNA, è in grado di bloccare la proliferazione cellulare e di stimolare la via di riparazione del DNA; tuttavia, quando il danno è troppo esteso o il sistema di riparazione insufficiente, p53 promuove la via della morte cellulare programmata o apoptosi [86]. La perdita di questo oncosoppressore, localizzato sul braccio corto del cromosoma 17, è stata trovata nella maggior parte delle neoplasie umane, tra cui l'epatocarcinoma andando a suggerire come eventi mutazionali in p53 avvengano tardivamente nel processo multifasico dello sviluppo dell'HCC promuovendo la transizione da una situazione caratterizzata da una sostanziale benignità, ad una caratterizzata da malignità.

Frequenti fenomeni di perdite alleliche a carico della regione 17p13 sono state osservate in una percentuale variabile dal 2% al 60% dei casi, con una media a livello mondiale del 28%, ma con evidenti e marcate differenze geografiche [87]. Le mutazioni a carico di p53 sono più frequenti in tumori di dimensioni più grandi, ad alto " *grading* " o poco differenziati, con prognosi peggiore e con un intervallo libero da malattia minore. La più frequente mutazione si riscontra a carico del codone 249 e risulta di fatto legata all'esposizione alla micotossina aflatossina B1 (AFB1) con un preciso ruolo nell'iniziazione del processo tumorale, mentre negli HCC non associati ad essa, ha una frequenza del 20-40% [71].

In quest'ultimo caso, le mutazioni a carico di p53 sono degli eventi associati alla progressione verso uno stadio tumorale avanzato [67]. Recentemente sono state identificate una serie di proteine p53-correlate, denominate p73 e p63 [88] ma nell'HCC non insorgono eventi mutazionali di p73 e diverse osservazioni indicano vi sia una prevalenza dell'espressione di

isoforme p73 dominanti negative (DN-p73 e DTA-p73) (anti-apoptotiche e pro-proliferative) capaci di bloccare le funzioni della p53 *wt* [89].

1.6.4 Alterazioni CTNNB1- associate

La maggior parte delle mutazioni missenso o microdelezioni occorrono nel 18-41% degli HCC a carico dell'esone 3 del gene CTNNB1 a livello della cosiddetta "*destruction box*" (regione bersaglio di GSK-3 β) rendendola non fosforilabile o ubiquitinabile e quindi insensibile alla *down-regulation* [90]. La maggior frequenza delle mutazioni coinvolge specifici residui amminoacidici, primariamente serina o treonina ed occorre a carico dei codoni 32-33 (S), 37 (S), 41 (T) e 45 (S) siti di fosforilazione primaria mediata da CK-1 α (S45) o da GSK-3 β (S33, S37 e S41) definendo le mutazioni più comunemente riportate in letteratura quali, S37P, S45P e D32G [91-95]. Il mancato riscontro di accumulo nucleare di CTNNB1 o di sue mutazioni nel tessuto peritumorale, nelle lesioni pre-neoplastiche, negli epatociti displastici e nei noduli cirrotici tendono ad indicare che la riattivazione di CTNNB1 è direttamente legata all'acquisizione del fenotipo trasformato. Sono state riscontrate mutazioni a carico dell'axina1 in HCC con accumulo nucleare di CTNNB1 in assenza di mutazioni del gene stesso.

Alcuni studi hanno inoltre mostrato come anche la perdita di espressione del recettore transmembrana Ca-dipendente E-caderina coinvolto nell'adesione cellulare, dovuta principalmente ad ipermetilazione del promotore, sia anch'essa frequente negli HCC soprattutto se HBV-correlati ed abbia come conseguenza la liberazione di CTNNB1 e conseguente accumulo citoplasmatico e nucleare [92, 96].

Resta comunque una quota di HCC con accumulo nucleare di CTNNB1 in cui non è

dimostrabile una mutazione del gene; per questi si ipotizza un'altra modalità di attivazione della via di segnale che non risulta ancora completamente chiarita. A differenza di quanto avviene nelle neoplasie del colon-retto, mutazioni in APC sono state descritte raramente nell'HCC, così come mutazioni nel gene AXINA-1 ed AXINA-2; è ormai noto che l'attivazione della via Wnt rappresenti un evento precoce nella carcinogenesi del grosso intestino, tuttavia non è ancora stato chiarito quando questo si verifichi all'interno dell'epatocarcinogenesi [94].

1.6.5 Correlazione tra parametri clinico-patologici ed espressione immunohistochemica di CTNNB1/ Glutamina sintetasi (GS)

Studi immunohistochemici condotti su campioni tissutali di HCC hanno dimostrato che l'espressione nucleare di CTNNB1 è presente in percentuali variabili dal 17 al 40% degli HCC; tale variabilità è in rapporto soprattutto all'eziologia dell'epatopatia cronica in cui la neoplasia si sviluppa: le frequenze minori sono riportate in casistiche di HCC HBV-correlati, mentre le frequenze maggiori riguardano neoplasie HCV-correlate.

E' stato inoltre riportato che l'espressione nucleare si accompagna frequentemente ad espressione citoplasmatica, come peraltro atteso dato che il trasferimento nel nucleo della proteina è dovuto all'accumulo della stessa nel citoplasma.

Mediante analisi mutazionale del gene, è stato anche dimostrato che l'espressione nucleare di CTNNB1 valutata con metodo immunohistochemico, correla fortemente con la presenza di mutazione nel gene. Tuttavia, l'accuratezza e la sensibilità della valutazione immunohistochemica di CTNNB1 come indice di attivazione di Wnt sono scarse [73, 97, 98]. Per questo motivo, sono stati testati altri marcatori tissutali potenzialmente predittivi per la presenza dell'alterazione genetica; in particolare sono stati considerati marcatori di

espressione di geni bersaglio della via di segnale Wnt/CTNNB1 che possono rivelare in modo indiretto l'attivazione della via stessa. È stato dimostrato con studi di espressione che i geni che codificano la glutamina sintetasi, l'ornitina aminotrasferasi ed il trasportatore del glutamato GLUT-1 vengono attivati in caso di mutazione di CTNNB1. Tra questi il gene GLUL che codifica la glutamina sintetasi (GS) è risultato il marcatore più affidabile dell'attivazione della via di segnale ed è stata dimostrata la riproducibilità della valutazione immunohistochimica della sua espressione [99].

Lo studio di Audard et al., del 2007 condotto su una serie di HCC resecati chirurgicamente, ha confermato che l'espressione di GS è fortemente predittiva della mutazione del gene, ma ha anche riportato che l'attivazione di CTNNB1 si associa alla presenza dell'infezione da HCV, ad un basso grado nucleare secondo Edmondson, ad una architettura mista acinare/microtrabecolare ed alla presenza di colestasi [91].

Un recente studio, effettuato presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e la Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, ha evidenziato che l'espressione del marcatore immunohistochimico, GS, si associa a tumori con specifica morfologia e con migliore sopravvivenza dopo trattamento percutaneo con radiofrequenze (RFTA). Questo marcatore, insieme alla traslocazione nucleare di CTNNB1, è un indicatore indiretto dell'attivazione della via di segnale *Wnt* che identifica un'importante via epatocarcinogenetica con specifici profili epidemiologici e genetici [100].

Sulla base dei dati sopra citati è stato condotto presso il nostro laboratorio uno studio mirato a valutare i cambiamenti genomici globali in una serie di 29 HCC utilizzando tecniche di ibridazione genomica comparativa su array (a-CGH).

I dati ottenuti hanno mostrato come l'immunoreattività per CTNNB1/GS segreghi HCC con caratteristici profili a-CGH, in particolare, tumori CTNNB1/GS-negativi tendono a mostrare

maggior instabilità cromosomica ed un aumento di perdite alleliche del DNA. A conferma dei dati riportati in letteratura sono inoltre emersi guadagni in 1q, 8q12-24, 6p21.3 e 5q13-23 e perdite in 8p, 1p e 19p13.12 che non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi messi a confronto. I risultati ricavati rafforzano l'idea che l'immunoreattività per CTNNB1/GS possa essere utilizzata per identificare classi distinte di HCC e possa costituire un punto di partenza per identificare un eventuale coinvolgimento di specifici geni (Silini et al. dati in attesa di pubblicazione).

È in corso uno studio volto a caratterizzare dal punto di vista istopatologico, mutazionale e clinico un sottogruppo di HCC CTNNB1/GS-negativi caratterizzati da fibrosi stromale in bande e grandi cellule con aspetti balloniformi e ialina di Mallory. I dati ad oggi ottenuti hanno permesso di affermare che questa variante di HCC con fibrosi sclerosante costituisce un gruppo di tumori con specifiche caratteristiche morfologiche e profilo mutazionale, tali tumori non hanno mostrato al momento differenze cliniche e di sopravvivenza rispetto ad altri HCC CTNNB1/GS-negativi nè è stato ancora possibile identificare specifici marcatori immunoistochimici.

L'espressione di marcatori immunoistochimici economici, riproducibili e con chiare basi biologiche sia su campioni tissutali biotici che chirurgici potrebbe efficacemente essere utilizzata come ausilio diagnostico per identificare un sottogruppo di neoplasie caratterizzate dallo stesso meccanismo molecolare e dall'attivazione della stessa via metabolica, fatto di per sé già molto interessante nell'eterogeneo contesto degli HCC, in cui non esistono sottoclassificazioni istologiche con significato predittivo o prognostico. Questa informazione, valutata su casistiche cliniche ampie, potrebbe pertanto dare un'informazione di predizione della prognosi che le valutazioni cliniche e strumentali attualmente disponibili non sono in grado di fornire.

L'attivazione di Wnt/CTNNB1 avrebbe quindi, oltre ad un profilo di espressione immunohistochemica caratteristico, anche un corrispettivo morfologico valutabile su preparati istologici convenzionali che potrebbe consentire di classificare il sottogruppo di HCC Wnt-correlati in base alle loro caratteristiche istopatologiche.

1.7 Direzioni future

La correlazione di variabili cliniche ed epidemiologiche con parametri istologici e dati molecolari è la chiave per dirimere la complessità dell'HCC e per giungere ad una nuova classificazione morfologica e clinica che abbia fondamenti biologici.

Un apporto fondamentale in tal senso è stato recentemente fornito dall'analisi dei profili di espressione genica, ottenuti mediante DNA microarray e altre "high-throughput technologies", che permettono un'analisi trascrizionale globale di cellule [101]. Queste nuove tecnologie promettono di:

- perfezionare la diagnosi e selezionare specifici biomarkers per la diagnosi precoce;
- fornire informazioni sulla prognosi e sulla risposta al trattamento dell'HCC;
- identificare geni up-regolati che possono rappresentare i bersagli delle cosiddette "targeted therapies";
- integrare i dati istologici per migliorare la diagnosi differenziale;
- fornire una classificazione molecolare dell'HCC con suddivisione in sottogruppi omogenei dal punto di vista biologico e clinico [102].

Numerose meta-analisi hanno proposto una classificazione dell'HCC basata sui meccanismi biologici che sottendono questa classe di tumori, per poter ridefinire non solo i parametri prognostici, ma anche i target terapeutici, grazie all'utilizzo di variabili genomiche [103].

La diagnosi di HCC in fase precoce, potenzialmente curabile, è possibile nel 30-60% dei casi, fatto che permette di accentuare i problemi diagnostici rendendo più urgente lo sviluppo di sistemi di stratificazione del rischio basati su principi biologici che soddisfino la richiesta di trattamenti differenziati e personalizzati, comprese le nuove classi di farmaci biologici come gli inibitori molecolari delle tirosin-kinasi.

Lo studio delle vie molecolari alla base del processo carcinogenetico dell'HCC può avere pertanto un impiego razionale mirato per la scelta di farmaci e per predirne la loro efficacia. A questo proposito una nuova fase nella terapia di questo tumore è rappresentato dall'utilizzo dell'inibitore tirosin-kinasico *Sorafenib*, farmaco già approvato per il trattamento del carcinoma renale che appartiene alla categoria delle cosiddette “*piccole molecole*”, ovvero di quei farmaci che agiscono su proteine specifiche del tumore: le chinasi. Gli inibitori di chinasi sono, appunto, farmaci di piccole dimensioni e basso peso molecolare in grado di interferire con il sito attivo intracellulare dei recettori (in genere una tirosina-chinasi) impedendo l'attivazione del meccanismo di trasduzione del segnale. Il Sorafenib è un inibitore multichinasico che agisce sia a livello cellulare che della vascolarizzazione del tumore, pertanto, è considerato una molecola a bersaglio multiplo o multitarget. In modelli preclinici, è infatti risultato attivo su alcuni elementi delle due classi di chinasi coinvolte nella proliferazione cellulare e nell'angiogenesi tumorale, due importanti attività per la crescita tumorale. Queste chinasi includono RAF chinasi, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , KIT, FLT-KIT, FLT-3 [104].

L'utilizzo del Sorafenib nell'epatocarcinoma, ha dimostrato in numerosi studi un aumento della sopravvivenza di pazienti con uno stadio avanzato di HCC [33, 105], in particolare sono stati identificati dei bersagli molecolari predittivi della risposta al farmaco.[37].

In ambito oncologico, studi clinici condotti di recente confermano il potenziale terapeutico dei farmaci a bersaglio molecolare, integrati con la terapia convenzionale, in termini di risposta, sopravvivenza e qualità di vita [33, 105].

2. Scopo del lavoro

L'obiettivo principale del presente lavoro è valutare le correlazioni clinico-patologiche e molecolari di una serie di epatocarcinomi caratterizzati da attivazione del pathway di segnale Wnt. In particolare lo studio si propone di:

- Correlare l'espressione tissutale di CTNNB1 e GS con le caratteristiche morfologiche per delineare eventuali sottotipi di HCC predittivi di attivazione della via di segnale Wnt
- Valutare il ruolo di mutazioni del gene CTNNB1 in epatocarcinomi con Wnt attivato, immunoreattivi per GS
- Valutare il profilo di perdite alleliche (LOH), implicate nel processo di trasformazione neoplastica e correlarle con una serie di parametri clinico-patologici
- Verificare il pattern di LOH in relazione alla progressione neoplastica analizzando componenti a diverso grado di una stessa neoplasia (early, basso ed alto grado).

3. Materiali e metodi

3.1 Pazienti

La base dello studio è costituita da una serie consecutiva di 84 epatocarcinomi (HCC) di dimensioni uguali o inferiori a 5 cm resecati in modo radicale da 77 pazienti presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e la Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, nel periodo 1992-2007. Cinque pazienti avevano due noduli neoplastici indipendenti, mentre un paziente presentava 3 noduli.

I pazienti includevano 20 femmine (26%) e 57 maschi (74%) di età media 67 anni (range 52-79 anni). Sessantasette pazienti (87%) erano affetti da epatopatia cronica ad eziologia virale, 50 (65%) epatite da virus C, 6 (8%) epatite da virus B, 11 (14%) da epatite virale non specificata; 6 pazienti (8%) avevano un'epatopatia non virale (alcolica, autoimmune e steatoepatite non alcolica) mentre in 4 casi (5%) l'eziologia non era nota. Dei 77 pazienti, 55 (71%) risultavano cirrotici (stadio 5 o 6 di Ishak) [1] Tabella 3.1.

Gli 84 HCC avevano un diametro medio di 3.0 cm (range 0.9-5.0 cm) e sono stati valutati in modo sistematico secondo un serie di variabili isto-patologiche predefinite, le principali delle quali sono riassunte in tabella 3.1.1. In particolare, 14 HCC (16%) erano di grado nucleare 1, 40 HCC di grado 2 (48%), e 30 di grado 3 (36%)[1], 40 (48%) mostravano presenza di lesioni preneoplastiche, 30 (36%) invasione vascolare, 67 (80%) capsula peritumorale, 67 (80%) crescita di tipo espansivo, 8 (9%) di tipo early, 9 (11%) di tipo infiltrativo e 6 (7%) presentavano noduli satelliti [1].

In 31 noduli erano identificabili componenti neoplastiche a diverso grado di differenziazione che ai fini dell'analisi sono state classificate codificate in tre categorie, early, basso grado ed alto grado.

Dati di sopravvivenza erano disponibili per 47 pazienti, 27 risultavano morti (21 casi e 6 controlli) e 20 vivi (14 casi e 6 controlli); non è stato possibile modellare questa variabile dal punto di vista statistico.

3.2 Studio istopatologico ed immunohistochimico

I campioni chirurgici, sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, processati ed inclusi in paraffina secondo metodica standard. Ai fini dello studio sono stati rivalutati tutti i preparati istologici originali, colorati in ematossilina-eosina; solo in caso di degrado di questi ultimi, si è proceduto all'allestimento di nuove sezioni. Per ogni nodulo è stata selezionata l'inclusione più rappresentativa e da questa sono state allestite delle sezioni di tessuto dello spessore di 3-4 μm raccolte su vetrini silanizzati per lo studio immunohistochimico. Su tutti i noduli è stata valutata l'immunoreattività per i seguenti anticorpi primari: β -catenina (CTNNB1), glutamina sintetasi (GS) (Tabella 3.2).

Le reazioni immunohistochimiche sono state eseguite secondo procedure standardizzate e descritte [91]. Le sezioni sono state sparaffinate e reidratate in una scala discendente di alcoli. L'attività della perossidasi endogena è stata inibita mediante incubazione per 10 minuti in soluzione al 3% di perossido di idrogeno. Lo smascheramento antigenico è stato eseguito in bagno termostato a 98°C con tampone EDTA a pH9.

I vetrini sono stati incubati con l'anticorpo primario over-night e le reazioni sono state rivelate grazie ad un sistema polimerico (Dako, ADVANCE-HRP) coniugato a perossidasi e successivamente con il substrato cromogeno 3,3' diamminobenzidina (DAB). Infine le sezioni sono state controcolorate con ematossilina. I controlli negativi sono stati trattati con siero normale a conferma della specificità dell'anticorpo.

Le reazioni immunistochemiche sono state valutate in modo semiquantitativo, in particolare, per CTNNB1 è stata considerata significativa un'espressione nucleare $\geq 10\%$, mentre la positività di membrana e citoplasmatica non sono state considerate significative.

L'espressione di GS è stata sulla base della frequenza ed all'intensità dell'immunocolorazione citoplasmatica valutata rispetto al tessuto epatico normale, dove è normalmente espressa negli epatociti perivenosi. La positività è stata classificata come:

- diffusa intensa: tutte le cellule neoplastiche hanno reattività intensa
- diffusa mista: cellule intensamente positive sono commiste a cellule negative
- diffusa debole: tutte le cellule neoplastiche presentano debole reattività
- zonale: solo una porzione della neoplasia presenta immunoreattività
- assente: le cellule neoplastiche sono negative all'immunoreazione

Ai fini dell'analisi, sono state considerate positive le reazioni con espressione diffusa intensa e diffusa mista, negative le reazioni con espressione diffusa debole, zonale o assente.

Sulla base dell'immunoreattività per GS, la casistica è stata suddivisa in casi (GS+), 56 noduli, e controlli (GS-), 28 noduli.

3.3 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da sezioni istologiche di 4-5 μm di spessore colorate con ematossilina. In ogni caso, è stata condotta una microdissezione manuale sia del tessuto normale sia di quello tumorale. Ove possibile, sono state microdissezionate selettivamente porzioni di tessuto tumorale a differente grado di progressione neoplastica. Il metodo di estrazione si è basato sull'uso di Chelex, una resina a scambio ionico composta da copolimeri di stirene e divinilbenzene che contiene gruppi iminodiacetici. La resina agisce

chelando gli ioni metallici divalenti necessari per l'azione di endonucleasi e/o inibitori di PCR (Sigma, Chemical CO, Germany).

L'estrazione con Chelex prevede una digestione enzimatica con proteinasi K(20mg/μl), overnight partendo dall'aggiunta del buffer di lisi TE (Tris-EDTA) ed incubazione a 56°C overnight, bollitura per 8-10 minuti e centrifugazione per 1 minuto a 14.000 rpm per separare il surnatante dalla resina.

3.4 Sequenziamento del gene CTNNB1

Per lo studio mutazionale, il DNA tumorale è stato amplificato mediante PCR con primers per l'esone 3 del gene CTNNB1 la cui sequenza è stata ricavata da precedenti lavori [106] ed indicata di seguito:

- F- 5'- ATGGAACCAGACAGAAAAGC - 3'
- R- 5'- GCTACTTGTTCTGAGTGAAG - 3'

Le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando la seguente miscela di reazione per un volume finale di 50 μl:

- 2 μl DNA campione
- Buffer 10x PCR GOLD BUFFER (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100)
- MgCl₂ 25 mM
- dNTPs 10 mM (Promega, Madison, WI)
- Primer forward e reverse 20 pmol/μl
- AmpliTaqGold 5U/μl (Applied Biosystem)

Le condizioni di amplificazione prevedevano una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 10 minuti seguita da 40 cicli caratterizzati da uno step di denaturazione (95°C per 45 secondi), uno step di annealing dei primer (58-64°C per 35 secondi) ed uno step di allungamento (72°C per 45 secondi), quindi una fase finale di estensione a 72 °C per 10 minuti.

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit Nucleospin Extract II PCR clean-up (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Duren) basato su legame del DNA ad una membrana in silice in presenza di un sale caotropico e la successiva eluizione con tampone NE (5mM Tris-HCl, pH 8.5) a bassa forza ionica. La presenza e le dimensioni degli amplificati è stata verificata con elettroforesi in gel di agarosio al 2% in tampone TBE 0,5% (Tris Borato EDTA). Il sequenziamento è stato ottenuto mediante “cycle sequencing” direttamente su prodotti di PCR utilizzando polimerasi termostabili, primers di sequenziamento e dideossi-terminatori marcati con fluorocromi in posizione 3'-OH (Dye terminators) (Eurofins MWG Opern, Edersberg, Germany).

I profili elettroforetici ottenuti per ciascun amplificato sono stati analizzati con il software SeqMan II (DNA STAR) ed allineati, con la sequenza wild (NCBI/Blast Human Genome <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Le mutazioni identificate sono state confermate sia nella sequenza forward sia in quella reverse e nominate in accordo alla nomenclatura proposta da Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/>). Infine sono state confrontate con quelle sottomesse nel database generale Human Gene Mutation Database, Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

3.5 Microsatelliti ed analisi di LOH

Lo studio è stato effettuato con un pannello di 18 markers microsatellitari altamente polimorfici localizzati in regioni cromosomiche note per essere coinvolte nello sviluppo e nella progressione dell'HCC: D1S206 (1p21), D1S1588 (1p22.2), D1S255 (1p34.2), D1S199 (1p36), D8S1477 (8p12), D8S136 (8p21.2-p22), D8S261 (8p22), D8S277 (8p23), D16S753 (16p11.2), D16S420 (16p11.1-p12.1), D16S423 (16p13.3), D17S1358 (17p12.1), D17S520 (17p12-p13), D17S786 (17p13.1), D19S206 (19q13.41), D19S412 (19q13.3), D19S49 (19q12), D19S433 (19q12.1) [107-114].

I microsatelliti sono stati selezionati sulla base di una revisione dei dati di letteratura e di un preliminare studio di a-CGH (Silini et al dati in attesa di pubblicazione) condotto presso il nostro laboratorio. L'analisi di LOH è stata condotta sull'intera serie di 84 noduli; nel caso in cui fossero presenti più componenti neoplastiche, ognuna di queste è stata analizzata separatamente. Ciascun microsatellite è stato amplificato mediante PCR da DNA di tessuto normale e tumorale in una miscela di reazione di 25 µl contenente:

- 2 µl DNA campione,
- 10x buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X- 100,
- 2 mM MgCl₂,
- 0.2 mM di ciascun dNTP (Promega, Madison, WI),
- 0.4 µM di ciascun primer,
- 1.25 U Taq Polimerasi (Promega, Madison, WI).

Ciascun primer con direzione "senso" (forward) è stato marcato con sostanze fluorescenti.

L'amplificazione dei microsatelliti è stata ottenuta utilizzando PCR di 35-40 cicli con

differenti temperature di appaiamento-annealing (Tabella 3.3). La presenza e le dimensioni degli amplificati è stata verificata su gel di agarosio al 2%.

Gli amplificati ottenuti sono stati successivamente separati in un gel denaturante di poliacrilammide al 6%, utilizzando il sequenziatore automatico a capillare CEQ 8000 XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Alla fine della corsa elettroforetica, il segnale fluorescente emesso dai primers è stato automaticamente analizzato attraverso un software di analisi d'immagini, con generazione di elettroferogrammi in cui ciascun allele appariva come un picco. L'altezza e l'area di tali picchi, calcolate automaticamente dal software, erano proporzionali alla concentrazione degli alleli nel campione.

La presenza di due alleli distinti visualizzati da 2 picchi nel tessuto normale (eterozigotità), era la condizione necessaria per lo studio delle perdite alleliche. I casi in cui il DNA nel tessuto normale risultava essere omozigote, ossia con un unico allele (1 picco), venivano classificati come non informativi e non sottoposti a successive indagini.

Il calcolo di LOH è stato effettuato utilizzando la seguente formula matematica calcolata sulla base dell'altezza dei picchi:

$$\frac{(\text{allele minore/allele maggiore})_{\text{tumore}}}{(\text{allele minore/allele maggiore})_{\text{normale}}}$$

Valori inferiori o uguali a 0.6 erano indicativi di una riduzione del 40% dell'allele tumorale ed erano considerati il cut-off per la definizione di LOH [115].

La comparsa nell'elettroferogramma di nuovi picchi (corrispondenti a nuovi alleli) nel DNA tumorale, non presenti nella controparte normale, è stata considerata la condizione necessaria per definire l'instabilità dei microsatelliti (MSI) [116]. In accordo con i criteri internazionali adottati in letteratura i tumori sono stati classificati come MSI-H (high-frequency MSI) quando l'instabilità è presente in almeno il 30% dei marcatori microsatellitari e come MSI-L

(low-frequency MSI) quando l'instabilità coinvolge meno del 30% dei marcatori. Le neoplasie senza MSI sono invece definite MSS (MSI-stabili) [116-118].

Lo studio di LOH è stato completato con il calcolo dell'indice frazionario di perdita allelica (FAL) sulla base del seguente rapporto:

(numero di microsatelliti con LOH) / (numero totale di microsatelliti informativi)

Valori maggiori o uguali a 0.35 erano indicativi di un evento non casuale indicando che il 35% dei loci cromosomici aveva LOH, tale valore è stato considerato il cut-off per la definizione di instabilità cromosomica (CIN) [119].

3.6 Analisi statistica

Le frequenze di LOH ai vari loci e nei singoli bracci cromosomici sono state confrontate tra il gruppo dei casi e quello dei controlli e correlate con una serie di variabili cliniche tra cui età (< 67 vs > 67anni) sesso, dimensioni dei noduli (<3 vs >3cm), eziologia (virale vs non virale), variabili istopatologiche, tra cui, grado nucleare, grado di differenziazione istologico (high vs low), invasione vascolare, presenza di capsula peritumorale, di lesioni preneoplastiche, cirrosi, ed infine con variabili genetiche quali la risposta immunohistochimica a CTNNB1 e a GS e mutazioni identificate a carico dell'esone 3 del gene CTNNB1 mediante il test Fisher/Chi2.

I confronti tra le dimensioni dei noduli nei gruppi GS+/CTNNB1+ vs GS+/CTNNB1- GS+/CTNNB1+ vs GS-/CTNNB1- sono stati effettuati mediante analisi della varianza.

Il livello di significatività è stato fissato per p inferiore 0,05.

4. Risultati

4.1 Caratterizzazione immunoistochimica

È stata considerata una serie consecutiva di 84 HCC resecati da 77 pazienti sottoposti a resezione segmentaria o nodulectomia; le Tabelle 3.1 - 3.1.1 (vedi M&M) riassumono le principali caratteristiche clinico-patologiche utilizzate ai fini della correlazione con i dati immunoistochimici e genetici.

I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi sulla base della positività immunoistochimica del tessuto tumorale per glutamina sintetasi (GS) e/o β -catenina (CTNNB1) in casi (GS/CTNNB1+, 56/84 -67%) e controlli (GS/CTNNB1-, 28/84 -33%).

L'espressione immunoistochimica di GS è stata classificata diffusa intensa in 38 HCC, diffusa mista in 13 HCC, diffusa intensa/mista in 5, zonale in 4, diffusa debole in 16 ed assente in 8 tumori. L'espressione immunoistochimica di CTNNB1, valutata sulla base della reattività nucleare, è stata identificata in 23 HCC (27%), di cui la totalità (41%) risultava anche immunoreattiva per GS ($p < 0.001$). Nei restanti 61 noduli l'espressione nucleare di CTNNB1 era assente o inferiore al 5% (Tabella 4.1). In Figura 4.1 sono esemplificati i principali pattern di reattività immunoistochimica sia per CTNNB1 sia per GS.

4.2 Correlazione fra variabili clinico-patologiche e reattività immunoistochimica

Rispetto ai parametri clinici, in particolare, sesso ed età, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra casi e controlli, mentre per quanto riguarda l'eziologia dell'epatopatia il gruppo dei casi è risultato significativamente correlato ad un infezione di tipo virale rispetto al gruppo dei controlli ($p = 0.02$) (Tabella 4.2).

Fra le variabili istopatologiche considerate, alcune sono risultate statisticamente diverse fra i due gruppi. In particolare, le dimensioni dei noduli erano maggiori nei casi rispetto ai controlli ($p=0.0547$), il pattern di crescita espansivo risultava più frequente nei casi (91% 51/56 vs. 61% 17/28), mentre una crescita di tipo infiltrativo era più frequente fra i controlli (21% 6/28 vs. 4% 2/56) ($p=0.0031$). La presenza di capsula peritumorale era anche più frequente fra i casi rispetto ai controlli (93% 52/56 vs. 54% 15/28) ($p<0.001$). I dati sono dettagliati in Tabella 4.2.1.

Le correlazioni clinico-patologiche sono state ulteriormente indagate suddividendo il gruppo dei casi in: GS+/CTNNB1+ e GS+/CTNNB1-.

Circa le variabili cliniche, i casi GS+/CTNNB1+ erano correlati ad infezione di tipo virale rispetto ai controlli GS-/CTNNB1- ($p=0.02$) (Tabella 4.3). Relativamente alle variabili di tipo isto-patologico, i casi GS+/CTNNB1+ a differenza dei casi i GS+/CTNNB1- risultavano significativamente più grandi rispetto ai controlli GS-/CTNNB1- ($p=0.034$). Anche l'invasione vascolare risultava più frequente negli HCC GS+/CTNNB1+ sia rispetto ai casi GS+/CTNNB1- sia ai controlli GS-/CTNNB1- (rispettivamente $p^*=0.034$, $p^\#=0.017$) (Tabella 4.3.1).

4.3 Analisi delle mutazioni del gene CTNNB1

Per 70 HCC (49 casi e 21 controlli) è stato valutato lo stato mutazionale dell'esone 3 del gene CTNNB1. Cinquantasette noduli risultavano non mutati (81%), e 13 (19%) mutati. Elettroferogrammi esemplificativi di sequenze mutate e non mutate sono riportati in Figura 4.2.

Fra le 13 mutazioni identificate, sono state osservate una delezione mononucleotidica (c.376_377delG) e 12 mutazioni missenso in eterozigosi a livello dei codoni 32, 33, 37 e 45 coinvolgenti prevalentemente residui di serina con una sola mutazione a carico di un residuo di acido aspartico (Tabella 4.4).

Delle 13 mutazioni, 12 risultavano in HCC classificati come casi (12/49, 24%) ed una tra i controlli (1/21, 5%) ($p=0.0464$). Otto mutazioni risultavano in HCC GS+/CTNNB1+ (8/22, 36%), 4 mutazioni in HCC GS+/CTNNB1- (4/27, 15%) ed una in controlli GS/CTNNB1 negativi (1/21, 5%) ($p=0.0233$) (Tabella 4.4.1).

4.4 Analisi di perdita allelica

Lo studio di perdita allelica (LOH) sui bracci cromosomici 1p, 8p, 16p, 17p e 19q ha considerato un pannello di 18 markers altamente polimorfici descritti e selezionati da dati riportati in letteratura e da un recente studio di a-CGH condotto presso il nostro laboratorio.

Per lo studio delle correlazioni clinico-patologiche in pazienti con più noduli o con noduli a differente grado di progressione neoplastica, sono stati considerati i dati di LOH relativi ai noduli con grado istologico più elevato.

Esempi esplicativi di profili elettroforetici sono riportati in Figura 4.3; i risultati dello studio di LOH sono visualizzati in dettaglio per ognuno degli 84 noduli analizzati in Figura 4.4.

Il grado di informatività complessivo dei microsatelliti analizzati era dell' 80% (69-98%) con una percentuale variabile per ogni singolo marker; in particolare per il cromosoma 1p, la percentuale di informatività complessiva era del 77% (74-80%), per il cromosoma 8p del 83% (76-89%), per il cromosoma 16p dell'80% (78-86%), il cromosoma 17p del 76% (69-82%) ed infine per il cromosoma 19q dell'85% (80-98%).

La frequenza di LOH è risultata essere per il cromosoma 1p del 50% (126 LOH/254 casi informativi), per l'8p del 58% (164 / 281), per il 16p del 52% (108 /208), per il 17p del 48% (92 / 191), infine per il 19q del 32% (91 /287). Nella regione 16p13.3 sono state identificati 3 casi di instabilità microsatellitare (MSI). I dettagli, espressi in percentuale, di informatività, di frequenza di LOH per i singoli microsatelliti e per i cromosomi indagati sono riportati in Tabella 4.5 e rappresentati in Figura 4.5.

E' stato anche calcolato il valore dell'indice frazionario allelico (FAL) che definisce il livello totale di perdite alleliche per ogni caso, espressione del livello di instabilità cromosomica (CIN) [119]. Considerando un valore cut-off di FAL di 0.35, 59 HCC (70%) risultavano CIN+ e 25 CIN- (30%).

4.4.1 Correlazioni di LOH e FAL con le caratteristiche cliniche, patologiche e mutazionali

I dati di LOH sono stati correlati con lo stato GS/CTNNB1 e con alcune variabili clinico-istopatologiche selezionate.

Confrontando la frequenza di LOH tra casi e controlli, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa. Tuttavia, i controlli tendevano ad avere una maggiore frequenza di LOH rispetto ai casi nelle regioni cromosomiche 1p, 16p ed in alcuni markers localizzati in 17p e 19q (Figura 4.6).

I dati di LOH sono stati quindi correlati con le variabili clinico-istopatologiche e molecolari riportate in Tabella 4.6 sia sull'intera serie che separatamente per casi e controlli.

La stato di CIN non è risultato correlare in modo significativo con lo stato GS/CTNNB1 o alcuna delle caratteristiche clinico-istopatologiche indagate.

Per quanto riguarda i microsatelliti localizzati sul cromosoma 1p, sono state evidenziate correlazioni statisticamente significative fra LOH ed alcune variabili clinico-istopatologiche, in particolare:

D1S206 con la presenza di capsula peritumorale nei controlli ($p=0.0031$);

D1S1588 con la presenza di capsula peritumorale nel gruppo dei controlli ($p=0.038$) e con tumori CTNNB1-negativi ($p=0.034$);

D1S255 con dimensioni tumorali $>3\text{cm}$, sia sulla totalità dei campioni analizzati che sul gruppo dei casi (GS+) (rispettivamente $p=0.025$, $p=0.047$) e con l'assenza di mutazioni di CTNNB1 ($p=0.043$);

D1S199 con le dimensioni $>3\text{cm}$ ($p=0.035$), la presenza di capsula peritumorale sia nella totalità dei campioni analizzati che nel gruppo dei controlli (rispettivamente $p=0.036$, $p=0.023$), con l'assenza di lesioni preneoplastiche sia nella totalità di campioni che nel sottogruppo di casi (GS+) (rispettivamente $p=0.022$, $p=0.016$) (Tabella 4.6-A).

Per i markers del cromosoma 8 sono state identificate correlazioni statisticamente significative per:

D8S1477 con la presenza di capsula peritumorale nei casi ($p=0.022$), e nei casi CTNNB1 positivi⁺ ($p=0.021$);

D8S136 con un'età > 67 anni, sia nella totalità dei pazienti che nel sottogruppo dei casi (rispettivamente $p=0.0006$, $p=0.0052$), e con l'assenza di mutazioni sia nel totale dei campioni analizzati che nel solo gruppo di casi (rispettivamente $p=0.047$, $p=0.016$);

D8S277 con la presenza di capsula peritumorale nei casi ($p=0.027$), con noduli $>3\text{cm}$ nei controlli ($p=0.04$) (Tabella 4.6-B).

Per il cromosoma 16 sono state trovate correlazioni statisticamente significative per:

D16S753 con casi CTNNB1- negativi ($p=0.050$);

D16S420 con la presenza di cirrosi sia nella totalità dei pazienti che nei controlli (rispettivamente $p=0.0005$, $p=0.001$);

D16S423 con la presenza di capsula peritumorale nei controlli ($p=0.0031$) (Tabella 4.6-C).

Per il cromosoma 17, sono state trovate correlazioni statisticamente significative per:

D17S1358 con la presenza di mutazioni ($p=0.046$) e di capsula peritumorale ($p=0.00031$);

D17S520 con un'età < 67 anni ($p=0.043$), con un grado istologico elevato ($p=0.043$), e con la positività immunoistochimica per CTNNB1 ($p=0.042$) fra i casi (GS+) e nella totalità ($p=0.050$);

D17S786 con la presenza di invasione vascolare nei casi ($p=0.035$) (Tabella 4.6-D).

Per quanto riguarda i markers analizzati sul cromosoma 19, sono emerse correlazioni significative per:

D19S433 con la presenza di capsula peritumorale sia fra casi che controlli (rispettivamente $p=0.032$, $p=0.043$) e con la presenza di cirrosi ($p=0.020$);

D19S412 con noduli > 3cm sia nel totale che nei controlli (rispettivamente $p=0.007$, $p=0.020$);

D19S206 con la presenza di cirrosi ($p=0.03$) (Tabella 4.6-E).

4.5 Pattern di LOH durante la progressione tumorale

In 31 HCC per i quali erano state analizzate più componenti di una stessa neoplasia, è stato confrontato il pattern di LOH in relazione alla progressione neoplastica. In 19 tumori erano presenti aree di early HCC (19/31, 61%), in 27 HCC aree di HCC a basso grado (G1), (27/31, 87%) e in 19, aree di HCC ad alto grado (G2-G3) (19/31, 61%). Dodici tumori associavano una componente early e di basso grado (39%), 4 early ed alto grado (13%), 12

aree sia di basso che alto grado (39%) e 3 noduli presentavano tutti i livelli di progressione neoplastica (9%).

La percentuale di LOH, nelle diverse componenti; HCC early, di basso ed alto grado nel totale di tutti i prelievi tumorali (n=118) è risultata significativamente diversa per vari loci analizzati (Tabella 4.7, Figura 4.7). In generale, la frequenza di LOH incrementava con la progressione neoplastica, raggiungendo la significatività statistica per i markers D1S206, D1S1588, D17S1358, D17S520, D19S206 (rispettivamente $p=0.035$; $p=0.037$; $p=0.045$; $p=0.012$; $p=0.038$).

Risultati analoghi sono stati ottenuti considerando il solo gruppo dei casi (GS+) (Tabella 4.7.1). In questo gruppo, la significatività statistica è stata raggiunta per D17S1358, D17S520, D19S206 (rispettivamente $p=0.015$, $p=0.017$, $p=0.029$), mentre a differenza del totale della serie è stata persa per i marcatori della regione 1p (D1S206, D1S1588).

Circa i dati di LOH nei tumori analizzati su più componenti, è stato inizialmente valutato il numero di LOH acquisite (LOH-a) nel passaggio da stadi precoci a stadi più avanzati.

LOH nella regione 19q erano prevalentemente acquisite nelle fasi tumorali più avanzate ($p=0.029$). Questo pattern di acquisizione tardiva di LOH, si applicava in modo particolare ai microsatelliti, D19S49 e D19S206, mentre per D19S433 l'andamento era più simile a quello osservato per altre regioni cromosomiche (Tabella 4.8). In Figura 4.8 è esemplificato il pattern di acquisizione di LOH in corso di progressione, per i microsatelliti della regione 19q.

Le LOH in 8p, invece presentavano un pattern precoce: erano infatti già presenti con elevata frequenza ($> 40\%$ in 3 dei 4 microsatelliti analizzati) nelle fasi precoci, pur rimanendo conservate durante la progressione.

5. Discussione

Diversamente dalla maggior parte dei tumori solidi, lo studio istopatologico ha un ruolo poco rilevante nella diagnosi, nella stratificazione prognostica e nell'indicazione terapeutica dell'HCC. La classificazione istologica si basa su criteri non validati elaborati negli anni '50 e l'uso di marcatori genetici e biologici predittivi o prognostici, è limitato dalla scarsità di tessuto in quanto solo una parte dei tumori viene biopsiata ed una ristretta minoranza è sottoposta ad ablazione chirurgica [43].

A ciò si aggiunge il fatto che l'HCC comprende un gruppo eterogeneo di neoplasie con eziologia, fattori di rischio e vie di trasformazione differenti. Gli studi molecolari hanno identificato notevole variabilità di alterazioni quali perdita di eterozigosità (LOH), delezioni e duplicazioni cromosomiche, instabilità microsatellitare, mutazioni geniche e profili di trascrizione aberranti [120], ma nonostante l'incremento delle conoscenze la comprensione del compendio di geni che regolano la patogenesi di HCC, è ancora limitata [121].

La maggioranza degli studi di correlazione tra variabili genetiche e clinico-patologiche non ha ad oggi fornito risultati significativi rendendo necessario il passaggio da una classificazione istopatologica basata su criteri puramente descrittivi ad una classificazione molecolare degli HCC [103]. Un'analisi patologica accurata e sistematica, supportata da una comprensione delle basi biologiche delle neoplasie ed integrata con l'uso di marcatori tissutali e con un'accurata correlazione clinica può fornire informazioni preziose ed immediatamente trasferibili sul piano diagnostico, come dimostrano alcune recenti osservazioni sugli HCC Wnt-attivati [100].

Nel presente lavoro abbiamo voluto utilizzare questo approccio per valutare le correlazioni clinico-patologiche e molecolari di una serie di epatocarcinomi caratterizzati da attivazione del pathway di segnalazione Wnt.

Una caratteristica innovativa del lavoro è stato l'approccio multidisciplinare che ha dimostrato come un'analisi sistematica e quantitativa degli aspetti morfologici dell'HCC integrata con dati antigenici e molecolari fornisce utili elementi per chiarire la variabilità clinica di questa forma tumorale.

I punti qualificanti di questo studio che lo distinguono da precedenti lavori sull'argomento sono i seguenti:

- uso di una serie di HCC resecati con intento radicale in fase iniziale (stadio A sec. BCLC) valutati in modo sistematico dal punto di vista istopatologico basandosi su una serie di variabili morfologiche predefinite, quantitative e validate;
- uso di marcatori immunocistochemici a supporto dell'interpretazione istopatologica e della definizione di classi di tumori per lo studio di correlazioni cliniche su marcatori biologici;
- integrazione con dati molecolari sullo stato mutazionale del gene CTNNB1 e sullo stato di perdita allelica (LOH);
- analisi di fasi diverse della progressione neoplastica basata sulla dissezione di diverse componenti una stessa neoplasia (early, basso ed alto grado);
- utilizzo di software aggiornati per una precisa definizione di LOH consentendo di identificare piccole regioni di sbilanciamento allelico ed LOH neutrali [122] al fine non solo di migliorare l'accuratezza genetica ma anche di suggerire nuovi geni potenzialmente candidati rilevanti nella cancerogenesi.

Rappresentano, invece, dei limiti dello studio:

- la ridotta numerosità della serie che limita la potenza statistica dei confronti;
- il numero di regioni cromosomiche analizzate;

- la mancanza di dati clinici completi in particolare in relazione alla sopravvivenza e la ridotta durata del follow-up che hanno impedito di modellare tale variabile da un punto di vista statistico.

Nel complesso, i dati raccolti dimostrano che sulla base delle caratteristiche morfologiche, dell'espressione immunohistochimica di GS e/o CTNNB1 e dello stato mutazionale del gene CTNNB1, è possibile definire un sottotipo di HCC predittivo dell'attivazione della via di segnale Wnt.

I dati di LOH, inoltre, contribuiscono ad identificare regioni cromosomiche altamente implicate nell'epatocarcinogenesi consentendo di completare ed incrementare i dati di dosaggio genico ottenuti presso il nostro laboratorio. Infine lo studio di LOH in relazione alla progressione tumorale consente di definire specifici pattern di LOH acquisiti ed indica ipotetici geni soppressori tumorali implicati nell'epatocarcinogenesi.

Caratterizzazione immunohistochimica e correlazioni clinico - patologiche

I dati di espressione nucleare di CTNNB1, presente in 23 HCC (27%) di cui la totalità risultava anche immunoreattiva per GS ($p < 0.001$) indicano una maggior sensibilità di GS nel rivelare l'attivazione della via di segnale Wnt. Questo risultato è coerente con quanto osservato da Audard et al., che ha riportato una sensibilità dell'espressione immunohistochimica di CTNNB1 del 63% con una specificità del 98% nel predire la presenza di mutazioni del gene stesso, rispetto ad una sensibilità del 90%, con specificità del 98% di GS [91]. L'attivazione della via di segnale Wnt quindi, può essere attendibilmente indagata mediante l'analisi immunohistochimica di espressione di CTNNB1 o di un gene bersaglio della via medesima come GS.

Casi Wnt-attivati differiscono significativamente rispetto ad HCC di controllo. In particolare tendono ad avere eziologia virale, dimensioni maggiori (>3cm), pattern di crescita di tipo espansivo e presenza di capsula peritumorale. Queste differenze si mantengono anche dopo avere stratificato i tumori in GS+/CTNNB1+, GS+/CTNNB1-. In particolare sono i tumori GS+/CTNNB1+ che contribuiscono maggiormente alla significatività statistica rispetto ai controlli.

Questi dati confermano su prelievi chirurgici quanto già descritto in una serie agobiologica precedentemente studiata in collaborazione con la Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Tale studio aveva anche evidenziato significative differenze in termini di sopravvivenza totale e tumore-specifica a seguito di terapia ablativa percutanea a favore di HCC Wnt-attivati. Una classificazione tumorale basata su principi biologici rappresenta, inoltre, una premessa per l'impiego razionale di farmaci biologici mirati su specifiche vie di segnale, quali ad esempio l'inibitore multichinasi Sorafenib che negli ultimi anni ha mostrato un netto miglioramento nella sopravvivenza di pazienti affetti da HCC a stadio avanzato, rappresentando una svolta nel trattamento di questa complessa malattia [100].

Valutazioni di mutazioni del gene CTNNB1

Sono state identificate 13 mutazioni di CTNNB1 (19%) su 70 noduli analizzati di cui una delezione mononucleotidica e 12 mutazioni missenso coinvolgenti prevalentemente residui di serina quali S37P, S37F [92, 97], S45P [93, 94, 123] ed una a carico di un residuo di acido aspartico D32G. Questi dati sono coerenti con quanto osservato da altri autori sia in termini di frequenza (18-41%) che di sede, interessando codoni bersaglio di fosforilazione primaria mediata da CK-1 α (S45) o da GSK-3 β (S33, S37 e S41). Dodici delle 13 mutazioni si riscontravano in HCC GS+/CTNNB1+ ed una sola mutazione in controlli (p=0.064).

È interessante notare come questo caso evidenziasse la presenza di noduli di progressione GS+. Potrebbe quindi trattarsi di un caso misclassificato nell'analisi immunohistochimica oppure della comparsa di un evento mutazionale secondario legato alla progressione neoplastica e non una caratteristica genetica fondamentale della neoplasia. Dati preliminari ottenuti presso il nostro laboratorio indicano che la comparsa di mutazioni di CTNNB1 e di specifica immuoreattività per CTNNB1 e GS compare nella transizione fra HCC early ed HCC franco.

Lo studio immunohistochimico dell'espressione di GS/CTNNB1 è quindi fortemente predittivo dello stato mutazionale del gene CTNNB1. Studi precedenti hanno evidenziato come HCC CTNNB1-mutati hanno caratteristiche clinico-patologiche simili a quelli Wnt-attivati caratterizzati nel presente studio, quali età più avanzata all'esordio, eziologia non virale e specifiche caratteristiche genetiche [124]. Questi dati dimostrano indirettamente come l'attivazione della via Wnt possa avvenire attraverso meccanismi alternativi quali, mutazioni del gene CTNNB1 [92, 123] ed axina [125], up-regulation di frizzled-7 [126], ed inattivazione di GSK-3 β [127].

Studio dei profili di perdita allelica (LOH)

I dati ricavati dallo studio di LOH condotto utilizzando un pannello di 18 markers microsatellitari localizzati nelle regioni 1p, 8p, 16p, 17p e 19q hanno evidenziato una elevata frequenza di perdite alleliche nella quasi totalità dei marcatori analizzati. In particolare, le regioni maggiormente coinvolte risultavano 8p (58%), 16p (52%), 1p (50%) e 17p (48%). Tali dati indicano una più estesa instabilità genetica di quanto rilevabile da studi di dosaggio genico mediante CGH e non significativamente distribuita fra gli HCC Wnt-attivati ed i

controlli. La frequenza di LOH è risultata minore per 19q (32%), ad eccezione del microsatellite D19S433 (19q12) che ha mostrato una frequenza di LOH pari al 73%.

I dati di LOH sono in accordo con quelli riportati da altri autori che evidenziano elevate frequenze di perdite alleliche in 1p, 4q, 8p, 13q, 16p e 17p [107, 111-113]. Per quanto riguarda la regione 19q, ad oggi sono stati condotti pochi studi di LOH. E' possibile supporre che in prossimità di questo locus siano localizzati putativi geni soppressori tumorali a supporto della cui ipotesi proprio la regione 19q12 è stata identificata come un 'hot spot' di LOH in studi condotti su HNSCC (*Head and Neck Squamous Cell Carcinomas*) [128].

Sono stati identificati anche 3 HCC che mostravano MSI nella regione 16p11-p12, un evento raro e ad oggi poco approfondito nella tumorigenesi epatica [129, 130]

Per quanto la genetica molecolare degli epatocarcinomi sia molto eterogenea e complessa ed alterazioni genomiche ricorrenti possano essere identificate solo nel 20-30% dei tumori (Feitelson 2002, Suriawinata 2004), tuttavia queste coinvolgono pochi loci, suggerendo che esiste un numero finito di geni che contribuiscono allo sviluppo ed alla progressione di HCC. Per alcuni loci, sono stati identificati possibili geni tumorali, che attendono di essere validati, ma le ampie dimensioni della maggior parte degli 'hot spots' genomici lascia aperta la possibilità che molti geni rilevanti siano ancora ignoti [53].

In alcuni dei loci caratterizzati da LOH sono localizzati putativi geni oncosoppressori , in particolare:

- *WNT4* (*Wingless-type 4*) (1p36.12)
- *SFRP1* (*Secreted Frizzled-Related Protein 1*) (8p12-11.1) antagonista dell'attivazione di Wnt, spesso inattivato per metilazione in molti tumori quali il carcinoma della vescica [131]

- *FZD3* (*Frizzled 3*) (8p21) che in uno studio condotto da Bengonchea et al., è risultato frequentemente deregolato durante l'epatocarcinogenesi [132]
- *AXINA 1* (16p13.3), oggetto di mutazioni di tipo missenso o framshift in circa il 5-10% degli HCC. Tale gene è inoltre mutato in altri tipi di neoplasie e le mutazioni più frequentemente identificate sono di tipo puntiforme e più raramente minime delezioni in omozigosi o piccole duplicazioni [94]
- *p53* (17p13.1) altamente coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare è mutato in circa un terzo degli HCC, e la frequenza ed il tipo di mutazioni variano in base alla provenienza geografica e sospetta eziologia del tumore [133]

Dal confronto fra HCC Wnt-attivati e controlli non sono emerse differenze significative nei pattern di LOH, sebbene la maggior parte delle regioni cromosomiche indagate, in particolare 1p, 16p, 17p e 19q presentavano frequenze di LOH maggiori nel gruppo dei controlli (GS/CTNNB1- vs. GS/CTNNB1+). La numerosità sbilanciata del gruppo di casi (n=56) rispetto ai controlli (n=28), potrebbe avere influito negativamente sulla significatività statistica.

Dati di letteratura indicano che LOH in 1p sono frequenti in HCC di piccole dimensioni e ben differenziati mentre LOH in 16p e 17q sono più frequenti in tumori avanzati e metastatici. E' stata proposta una suddivisione di HCC in tre sottogruppi basata sulla gerarchia di eventi genetici [134]. Sono ritenuti eventi primari della epatocarcinogenesi acquisizioni in 1q21-q23 e 8q22-q24 essendo alterazioni già presenti in noduli displastici; delezioni in 17p11-p13, 4q31-q34 e 16q22-q24 identificano, invece, tumori a stadio intermedio di progressione; infine, acquisizioni in 7q21-q31, 5p12-14 e 5q23-32 sono caratteristici di tumori in fase avanzata. Gli studi di CGH ad oggi disponibili, hanno limiti legati alle dimensioni, all'eterogeneità del

campione ed alla bassa risoluzione e/o trasferibilità dei dati ottenuti su piattaforme diverse [121] inoltre, molti studi non sono stati integrati con la conoscenza delle vie di trasformazione e con correlati eziologici e clinici [3]. L'identificazione di geni candidati sulla base di variazioni del numero di copie, come valutato da studi di comparative genomic hybridization (a-CGH), può essere facilitato dall'integrazione di dati provenienti da più campioni e da diverse fonti genetiche, come l'entità della variazione genica, lo stato allelico e le variazioni nell'espressione di mRNA [135, 136].

I nostri risultati di LOH hanno permesso di confermare in parte i dati parziali di a-CGH ottenuti da uno studio condotto nel nostro laboratorio su una serie di 29 HCC HCV-correlati (Silini et al. dati in attesa di pubblicazione). In tale studio le alterazioni genetiche più frequentemente rilevate (acquisizioni in 1q, 8q, perdite estese di 8p e 17p) , ricorrono in specifiche regioni cromosomiche classicamente implicate nella cancerogenesi epatocellulare. Tali alterazioni interessano sia il gene soppressore tumorale p53 sia geni coinvolti nel pathway di Wnt, quali AXINA (16p13.3), WNT4 (1p36.12), WNT3A (1q42), FZD3 (8p2), SFRP1 (8p12), FZD6 (8q22.3), ciclina D1 (11q13.3).

Il dato di particolare interesse emerso dal suddetto studio è stata l'identificazione di una netta segregazione delle alterazioni cromosomiche tra casi GS+/CTNNB1+ caratterizzati prevalentemente da guadagni cromosomici e controlli GS-/CTNNB1- che mostrano perdite di materiale genetico; ciò evidenzia come nei due tipi di tumori operino meccanismi di instabilità genetica fondamentalmente diversi: metilazione, stabilità cromosomica, duplicazioni nei primi, instabilità cromosomica, aneuploidia, LOH nei secondi.

Per quanto riguarda le correlazioni con variabili Wnt-associate, immunoreattività per CTNNB1 e mutazioni di CTNNB1, sono emerse alcune correlazioni interessanti.

Perdite alleliche in 8p12 (D8S1477) ed in 17p12-p13 (D17S520) correlano con l'immunoreattività per CTNNB1 (rispettivamente 80% e 55%). La frequenza di LOH in 1p22.2 (D1S1588) e 16p11.2 (D16S753), invece, è maggiore in HCC CTNNB1 negativi (rispettivamente 47% e 60%). Tali dati risultano in accordo con quelli ricavati dallo studio di a-CGH che identifica delezioni in 16p11.2-p13 come evento segregato a tumori GS/CTNNB1-
Anche uno studio francese [137] ha dimostrato che perdite alleliche in 1p e 16p sono significativamente associate all'assenza di mutazioni del gene CTNNB1, un dato coerente con la mancata immunoreattività per CTNNB1 del nostro studio.

Le perdite alleliche identificate nelle regioni cromosomiche 1p34.2 (D1S255) e 8p21.2 (D8S136) correlano con HCC CTNNB1 non mutati (rispettivamente 51% e 67%) in accordo con quanto evidenziato da Legoix et al., che mostrava perdite alleliche in 8p associate ad assenza di mutazioni del gene CTNNB1 [137].

Perdite alleliche nella regione cromosomica 17p13.1 (D17S1358), relativamente al limitato numero di mutazioni identificate, al contrario, correlano con la presenza di mutazioni del gene CTNNB1 (91%). Sempre nella regione 17p12-p13 sono emerse significative correlazioni con l'età (>67anni), il grado tumorale, e l'invasione vascolare suggerendo un ruolo nell'aggressività clinica di tali neoplasie. Nella regione 17p13.1 mappa il gene soppressore tumorale p53; questo suggerisce che alterazioni che coinvolgono il cromosoma 17p costituiscono un evento tardivo nel processo epatocarcinogenetico.

Circa le altre correlazioni evidenziate tra LOH e variabili clinico-patologiche, sono di più difficile interpretazione e necessitano di essere confermate su un più ampio numero di casi. Non è stata osservata alcuna correlazione tra FAL e caratteristiche clinico-patologiche indagate. Questo potrebbe indicare che le singole delezioni riguardano geni differenzialmente

coinvolti in singoli processi patogenetici, e non esiste un meccanismo globale di accumulo di alterazioni genetiche coinvolte nella tumorigenesi epatica.

Valutazione del profilo di perdite alleliche (LOH) durante la progressione neoplastica

Relativamente all'analisi dell'andamento di LOH nella serie di 31 HCC per i quali erano disponibili più componenti di una stessa neoplasia a diverso grado (early, basso ed alto grado), sono emerse interessanti distribuzioni delle alterazioni acquisite.

In generale, è emerso che la frequenza di LOH aumentava dallo stadio early sino ad HCC franco ad alto grado durante la progressione neoplastica, raggiungendo la significatività statistica in particolare nelle regioni 1p21.2 (D1S206) e 1p32-33 (D1S1588), 17p12-p13 (D17S1358-D17S520) e 19q13.41 (D19S206).

A livello della regione 17p12-p13.1, precedentemente descritta correlare sia con casi CTNNB1 mutati sia con una serie di variabili cliniche ed isto-patologiche, si evidenzia come le alterazioni vengono acquisite durante la progressione neoplastica. Interessante notare come in tale regione mappi il gene p53, codificante per l'omonima proteina, che potrebbe fungere da marker per la differenziazione di tumori nell'ambito di casi caratterizzati da un decorso clinico più grave. La proteina p53, ed anticorpi anti-p53 vengono infatti utilizzati in modo combinato per la valutazione delle caratteristiche cliniche e per la diagnosi di HCC sebbene una conoscenza del loro ruolo nel contesto epatocarcinogenetico necessiti di ulteriori approfondimenti [138].

Circa la valutazione dell'LOH-a relativa al cromosoma 19q, in particolare nelle regioni 19q12 (D19S49) e 19q13.41 (D19S206) indagate, si evidenzia un comportamento particolare; il numero di LOH viene infatti acquisito prevalentemente nelle fasi tumorali di HCC franco più

avanzate e non in HCC early, suggerendo un coinvolgimento di tale regione in fasi più tardive della neoplasia.

Contrariamente la regione 8p12-p23, pur rimanendo in linea con l'acquisizione delle perdite alleliche durante la progressione, mostra una frequenza di LOH elevata già a livello della componente early; questo suggerisce l'esistenza di uno o più putativi geni soppressori tumorali precoci localizzati in questa specifica regione cromosomica. È infatti noto dai dati riportati in letteratura che l'elevata frequenza di LOH nel cromosoma 8p, in particolare nella regione 8p21-p23, costituisce una delle più comuni alterazioni genetiche rilevate in questa classe di tumori. Nonostante siano stati condotti numerosi studi di allelotipizzazione la ricerca di geni potenzialmente coinvolti è ancora in corso. Alcuni autori [111] hanno riscontrato un'elevata frequenza di LOH nel locus 8p23 (D8S277), Fujiwara et al., in particolare hanno suggerito il coinvolgimento in questa regione del putativo gene oncosoppressore PRLTS (PDGF-Receptor beta-Like Tumor Suppressor) (8p21-p22) [139]. Sono in seguito stati eseguiti studi mirati alla regione 8p23, in cui mappa tale gene [110] confermandone il coinvolgimento nell'epatocarcinogenesi, in quanto sede non di un solo ma di più geni potenzialmente coinvolti in fasi precoci [140].

L'identificazione di alterazioni genetiche precoci degli HCC potrebbe pertanto essere di aiuto per la diagnosi e lo screening ed una maggiore comprensione della progressione degli HCC.

6. *Bibliografia*

1. Ishak, K.G., Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts, in Atlas of tumor pathology, J. Rosai, Editor. 2001, AFIP. p. 199-230.
2. Bosch, F.X., J. Ribes, M. Diaz, et al., *Primary liver cancer: worldwide incidence and trends*. **Gastroenterology**, 2004. 127: S5-S16.
3. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. **Gastroenterology**, 2007. 132: 2557-76.
4. Colombo, M., *Natural history of hepatocellular carcinoma*. **Cancer Imaging**, 2005. 5: 85-8.
5. Forner, A. and J. Bruix, *Locoregional treatment for hepatocellular carcinoma: From clinical exploration to robust clinical data, changing standards of care*. **Hepatology**, 2008. 47: 5-7.
6. Varela, M., M. Sala, J.M. Llovet, et al., *Review article: natural history and prognostic prediction of patients with hepatocellular carcinoma*. **Aliment Pharmacol Ther**, 2003. 17 Suppl 2: 98-102.
7. Parkin, D.M. and C.S. Muir, *Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data*. **IARC Sci Publ**, 1992. 120: 45-173.
8. Tiribelli, C., M. Melato, L.S. Croce, et al., *Prevalence of hepatocellular carcinoma and relation to cirrhosis: comparison of two different cities of the world--Trieste, Italy, and Chiba, Japan*. **Hepatology**, 1989. 10: 998-1002.
9. Colombo, M., R. de Franchis, E. Del Ninno, et al., *Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis*. **N Engl J Med**, 1991. 325: 675-80.
10. Donato, M.F., E. Arosio, E. Del Ninno, et al., *High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity*. **Hepatology**, 2001. 34: 523-8.

11. Ganne-Carrie, N., C. Chastang, F. Chapel, et al., *Predictive score for the development of hepatocellular carcinoma and additional value of liver large cell dysplasia in Western patients with cirrhosis*. **Hepatology**, 1996. 23: 1112-8.
12. Fattovich, G., T. Stroffolini, I. Zagni, et al., *Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors*. **Gastroenterology**, 2004. 127: S35-50.
13. Beasley, R.P., *Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma*. **Cancer**, 1988. 61: 1942-56.
14. Yu, M.C. and J.M. Yuan, *Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma*. **Gastroenterology**, 2004. 127: S72-8.
15. Kao, J.H., P.J. Chen, M.Y. Lai, et al., *Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection*. **J Clin Microbiol**, 2002. 40: 1207-9.
16. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C virus infection*. **World J Gastroenterol**, 2007. 13: 2436-41.
17. El-Serag, H.B. and A.C. Mason, *Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States*. **N Engl J Med**, 1999. 340: 745-50.
18. El-Serag, H.B., J.A. Davila, N.J. Petersen, et al., *The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update*. **Ann Intern Med**, 2003. 139: 817-23.
19. Donato, F., P. Boffetta, and M. Puoti, *A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma*. **Int J Cancer**, 1998. 75: 347-54.

20. Bruno, S., A. Crosignani, P. Maisonneuve, et al., *Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study*. **Hepatology**, 2007. 46: 1350-6.
21. Di Bisceglie, A.M., R.L. Carithers, Jr., and G.J. Gores, *Hepatocellular carcinoma*. **Hepatology**, 1998. 28: 1161-5.
22. Hassan, M.M., L.Y. Hwang, C.J. Hatten, et al., *Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus*. **Hepatology**, 2002. 36: 1206-13.
23. Donato, F., A. Tagger, U. Gelatti, et al., *Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women*. **Am J Epidemiol**, 2002. 155: 323-31.
24. Ming, L., S.S. Thorgeirsson, M.H. Gail, et al., *Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China*. **Hepatology**, 2002. 36: 1214-20.
25. Henry, S.H., *Foodborne disease and mycotoxin epidemiology*, in *Foodborne disease handbook. Plant toxicant*, Y.H. Hui, Editor. 2000, Marcel Dekker: New York. p. 593-626.
26. Mazzanti, R., L. Gramantieri, and L. Bolondi, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspects*. **Mol Aspects Med**, 2008. 29: 130-43.
27. Yuan, J.M., S. Govindarajan, K. Arakawa, et al., *Synergism of alcohol, diabetes, and viral hepatitis on the risk of hepatocellular carcinoma in blacks and whites in the U.S*. **Cancer**, 2004. 101: 1009-17.

28. Bugianesi, E., N. Leone, E. Vanni, et al., *Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. Gastroenterology*, 2002. 123: 134-40.
29. Lei, D.N., L.Q. Wang, B.H. Ruebner, et al., *Effect of selenium on aflatoxin hepatocarcinogenesis in the rat. Biomed Environ Sci*, 1990. 3: 65-80.
30. Yu, M.W., H.H. Hsieh, W.H. Pan, et al., *Vegetable consumption, serum retinol level, and risk of hepatocellular carcinoma. Cancer Res*, 1995. 55: 1301-5.
31. Di Bisceglie, A.M., *Issues in screening and surveillance for hepatocellular carcinoma. Gastroenterology*, 2004. 127: S104-7.
32. Bruix, J., M. Sherman, J.M. Llovet, et al., *Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. J Hepatol*, 2001. 35: 421-30.
33. Llovet, J.M., A.M. Di Bisceglie, J. Bruix, et al., *Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. J Natl Cancer Inst*, 2008. 100: 698-711.
34. Bruix, J. and M. Sherman, *Management of hepatocellular carcinoma. Hepatology*, 2005. 42: 1208-36.
35. Talwalkar, J.A. and G.J. Gores, *Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology*, 2004. 127: S126-32.
36. Llovet, J.M., M.I. Real, X. Montana, et al., *Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. Lancet*, 2002. 359: 1734-9.
37. Abou-Alfa, G.K., L. Schwartz, S. Ricci, et al., *Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol*, 2006. 24: 4293-300.

38. Llovet, J.M. and J. Bruix, *Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008*. **J Hepatol**, 2008. 48 Suppl 1: S20-37.
39. Beaugrand, M., G. N'Kontchou, O. Seror, et al., *Local/regional and systemic treatments of hepatocellular carcinoma*. **Semin Liver Dis**, 2005. 25: 201-11.
40. Forner, A., A.J. Hessheimer, M. Isabel Real, et al., *Treatment of hepatocellular carcinoma*. **Crit Rev Oncol Hematol**, 2006. 60: 89-98.
41. Sala, M., A. Forner, M. Varela, et al., *Prognostic prediction in patients with hepatocellular carcinoma*. **Semin Liver Dis**, 2005. 25: 171-80.
42. Llovet, J.M., A. Burroughs, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. **Lancet**, 2003. 362: 1907-17.
43. Edmondson, H.A. and P.E. Steiner, *Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies*. **Cancer**, 1954. 7: 462-503.
44. Durnez, A., C. Verslype, F. Nevens, et al., *The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin*. **Histopathology**, 2006. 49: 138-51.
45. Lauwers, G.Y., B. Terris, U.J. Balis, et al., *Prognostic histologic indicators of curatively resected hepatocellular carcinomas: a multi-institutional analysis of 425 patients with definition of a histologic prognostic index*. **Am J Surg Pathol**, 2002. 26: 25-34.
46. Kojiro, M. and T. Roskams, *Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules*. **Semin Liver Dis**, 2005. 25: 133-42.
47. Hytioglou, P., Y.N. Park, G. Krinsky, et al., *Hepatic precancerous lesions and small hepatocellular carcinoma*. **Gastroenterol Clin North Am**, 2007. 36: 867-87, vii.

48. Baumhoer, D., L. Tornillo, S. Stadlmann, et al., *Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples*. **Am J Clin Pathol**, 2008. 129: 899-906.
49. Di Tommaso, L., G. Franchi, Y.N. Park, et al., *Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis*. **Hepatology**, 2007. 45: 725-34.
50. Peltomaki, P., *Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer*. **J Clin Oncol**, 2003. 21: 1174-9.
51. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. **Nat Med**, 2004. 10: 789-99.
52. Jefford, C.E. and I. Irminger-Finger, *Mechanisms of chromosome instability in cancers*. **Crit Rev Oncol Hematol**, 2006. 59: 1-14.
53. Villanueva, A., P. Newell, D.Y. Chiang, et al., *Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma*. **Semin Liver Dis**, 2007. 27: 55-76.
54. Thorgeirsson, S.S., J.S. Lee, and J.W. Grishama, *Molecular prognostication of liver cancer: End of the beginning* **J. Hepatol**, 2006. 44: 798-805
55. Laurent-Puig, P., P. Legoix, O. Bluteau, et al., *Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis*. **Gastroenterology**, 2001. 120: 1763-73.
56. Thorgeirsson, S.S. and J.W. Grisham, *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*. **Nat Genet**, 2002. 31: 339-46.
57. Andersen, J.B., R. Loi, A. Perra, et al., *Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat*. **Hepatology**, 2010. 51: 1401-9.

58. Borzio, M., S. Fargion, F. Borzio, et al., *Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development.* **J Hepatol**, 2003. 39: 208-14.
59. Park, Y.N., K.J. Chae, Y.B. Kim, et al., *Apoptosis and proliferation in hepatocarcinogenesis related to cirrhosis.* **Cancer**, 2001. 92: 2733-8.
60. Nakashima, Y., O. Nakashima, M. Tanaka, et al., *Portal vein invasion and intrahepatic micrometastasis in small hepatocellular carcinoma by gross type.* **Hepatol Res**, 2003. 26: 142-7.
61. Roskams, T.A., L. Libbrecht, and V.J. Desmet, *Progenitor cells in diseased human liver.* **Semin Liver Dis**, 2003. 23: 385-96.
62. Sell, S., *Cellular origin of hepatocellular carcinomas.* **Semin Cell Dev Biol**, 2002. 13: 419-24.
63. Block, T.M., A.S. Mehta, C.J. Fimmel, et al., *Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma.* **Oncogene**, 2003. 22: 5093-107.
64. Wang, X.W., S.P. Hussain, T.I. Huo, et al., *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma.* **Toxicology**, 2002. 181-182: 43-7.
65. Waris, G. and A. Siddiqui, *Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C.* **J Biosci**, 2003. 28: 311-21.
66. Paterlini-Brechot, P., K. Saigo, Y. Murakami, et al., *Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene.* **Oncogene**, 2003. 22: 3911-6.
67. Chan, H.L. and J.J. Sung, *Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus.* **Semin Liver Dis**, 2006. 26: 153-61.

68. Matsuzaki, K., M. Murata, K. Yoshida, et al., *Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma.* **Hepatology**, 2007. 46: 48-57.
69. Chirillo, P., S. Pagano, G. Natoli, et al., *The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1997. 94: 8162-7.
70. McKillop, I.H. and L.W. Schrum, *Role of alcohol in liver carcinogenesis.* **Semin Liver Dis**, 2009. 29: 222-32.
71. Aguilar, F., S.P. Hussain, and P. Cerutti, *Aflatoxin B1 induces the transversion of G->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1993. 90: 8586-90.
72. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* **Cell**, 2000. 100: 57-70.
73. Boyault, S., D.S. Rickman, A. de Reynies, et al., *Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets.* **Hepatology**, 2007. 45: 42-52.
74. Buendia, M.A., *Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects.* **Med Pediatr Oncol**, 2002. 39: 530-5.
75. Feitelson, M.A., B. Sun, N.L. Satiroglu Tufan, et al., *Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis.* **Oncogene**, 2002. 21: 2593-604.
76. Wong, N., P. Lai, S. Lee, et al., *Assessment of genetic changes in hepatocellular carcinoma by comparative genomic hybridization analysis: relationship to disease stage, tumor size, and cirrhosis.* **Am J Pathol**, 1999. 154: 37-43.
77. Llovet, J.M., S. Ricci, V. Mazzaferro, et al., *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma.* **N Engl J Med**, 2008. 359: 378-90.

78. Nishida, N., T. Nagasaka, T. Nishimura, et al., *Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. Hepatology*, 2008. 47: 908-18.
79. Calvisi, D.F., S. Ladu, A. Gorden, et al., *Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. Gastroenterology*, 2006. 130: 1117-28.
80. Wong, C.M. and I.O. Ng, *Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. Liver Int*, 2008. 28: 160-74.
81. Shitashige, M., S. Hirohashi, and T. Yamada, *Wnt signaling inside the nucleus. Cancer Sci*, 2008. 99: 631-7.
82. Kikuchi, A., *Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. Cancer Sci*, 2003. 94: 225-9.
83. Kim, M., H.C. Lee, O. Tsedensodnom, et al., *Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. J Hepatol*, 2008. 48: 780-91.
84. Takahashi-Yanaga, F. and T. Sasaguri, *The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. J Pharmacol Sci*, 2007. 104: 293-302.
85. Osipo, C. and L. Miele, *Hedgehog signaling in hepatocellular carcinoma: novel therapeutic strategy targeting hedgehog signaling in HCC. Cancer Biol Ther*, 2006. 5: 238-9.
86. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome. Nature*, 1992. 358: 15-6.
87. Staib, F., S.P. Hussain, L.J. Hofseth, et al., *TP53 and liver carcinogenesis. Hum Mutat*, 2003. 21: 201-16.

88. Levrero, M., V. De Laurenzi, A. Costanzo, et al., *The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions*. **J Cell Sci**, 2000. 113 (Pt 10): 1661-70.
89. Stiewe, T., S. Tuve, M. Peter, et al., *Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas*. **Clin Cancer Res**, 2004. 10: 626-33.
90. Terris, B., P. Pineau, L. Bregeaud, et al., *Close correlation between beta-catenin gene alterations and nuclear accumulation of the protein in human hepatocellular carcinomas*. **Oncogene**, 1999. 11: 6583-8.
91. Audard, V., G. Grimber, C. Elie, et al., *Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations*. **J Pathol**, 2007. 212: 345-52.
92. de La Coste, A., B. Romagnolo, P. Billuart, et al., *Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1998. 95: 8847-51.
93. Hsu, H.C., Y.M. Jeng, T.L. Mao, et al., *Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis*. **Am J Pathol**, 2000. 157: 763-70.
94. Taniguchi, K., L.R. Roberts, I.N. Aderca, et al., *Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas*. **Oncogene**, 2002. 21: 4863-71.
95. Zucman-Rossi, J., S. Benhamouche, C. Godard, et al., *Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas*. **Oncogene**, 2007. 26: 774-80.
96. Buendia, M.A., *Genetics of hepatocellular carcinoma*. **Semin Cancer Biol**, 2000. 10: 185-200.

97. Austinat, M., R. Dunsch, C. Wittekind, et al., *Correlation between beta-catenin mutations and expression of Wnt-signaling target genes in hepatocellular carcinoma. Mol Cancer*, 2008. 7: 21.
98. Wong, C.M., T. Sheung, and O.L. Irene, *β -catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma. Cancer*, 2001. 92: 136-145.
99. Cadoret, A., C. Ovejero, B. Terris, et al., *New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. Oncogene*, 2002. 21: 8293-301.
100. Dal Bello, B., L. Rosa, N. Campanini, et al., *Glutamine synthetase immunostaining correlates with pathologic features of hepatocellular carcinoma and better survival after radiofrequency thermal ablation. Clin Cancer Res*, 2010. 16: 2157-66.
101. Lemmer, E.R., S.L. Friedman, and J.M. Llovet, *Molecular diagnosis of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma: the potential of gene expression profiling. Semin Liver Dis*, 2006. 26: 373-84.
102. Lee, J.S. and S.S. Thorgeirsson, *Genetic profiling of human hepatocellular carcinoma. Semin Liver Dis*, 2005. 25: 125-32.
103. Hoshida, Y., S. Toffanin, A. Lachenmayer, et al., *Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. Semin Liver Dis*, 2010. 30: 35-51.
104. Liu, L., Y. Cao, C. Chen, et al., *Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5. Cancer Res*, 2006 66: 118-51
105. Zhu, A.X., *Development of sorafenib and other molecularly targeted agents in hepatocellular carcinoma. Cancer*, 2008. 112: 250-9.

106. Gerdes, B., A. Ramaswamy, B. Simon, et al., *Analysis of beta-catenin gene mutations in pancreatic tumors*. **Digestion**, 1999. 60: 544-8.
107. Boige, V., P. Laurent-Puig, P. Fouchet, et al., *Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype*. **Cancer Res**, 1997. 57: 1986-90.
108. Dolan, K., A.I. Morris, J.R. Gosney, et al., *Loss of heterozygosity on chromosome 17p predicts neoplastic progression in Barrett's esophagus*. **J Gastroenterol Hepatol**, 2003. 18: 683-9.
109. Hryshchenko, N.V., S.A. Kravchenko, and L.A. Livshits, *Polymorphic short tandem repeats for PCR-based diagnosis of the Charcot-Marie-Tooth 1A duplication in Ukraine*. **Tsitol Genet**, 2005. 39: 56-61.
110. Kahng, Y.S., Y.S. Lee, B.K. Kim, et al., *Loss of heterozygosity of chromosome 8p and 11p in the dysplastic nodule and hepatocellular carcinoma*. **J Gastroenterol Hepatol**, 2003. 18: 430-6.
111. Nagai, H., P. Pineau, P. Tiollais, et al., *Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma*. **Oncogene**, 1997. 14: 2927-33.
112. Okabe, H., I. Ikai, K. Matsuo, et al., *Comprehensive allelotype study of hepatocellular carcinoma: potential differences in pathways to hepatocellular carcinoma between hepatitis B virus-positive and -negative tumors*. **Hepatology**, 2000. 31: 1073-9.
113. Pineau, P., H. Nagai, S. Prigent, et al., *Identification of three distinct regions of allelic deletions on the short arm of chromosome 8 in hepatocellular carcinoma*. **Oncogene**, 1999. 18: 3127-34.
114. Piao, Z., C. Park, J.H. Park, et al., *Allelotype analysis of hepatocellular carcinoma*. **Int J Cancer**, 1998. 75: 29-33.

115. Beckmann, M.W., F. Picard, H.X. An, et al., *Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer.* **Br J Cancer**, 1996. 73: 1220-6.
116. Mueller, J.D., N. Haegle, G. Keller, et al., *Loss of heterozygosity and microsatellite instability in de novo versus ex-adenoma carcinomas of the colorectum.* **Am J Pathol**, 1998. 153: 1977-84.
117. Boland, C.R., S.N. Thibodeau, S.R. Hamilton, et al., *A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer.* **Cancer Res**, 1998. 58: 5248-57.
118. Thibodeau, S.N., A.J. French, J.M. Cunningham, et al., *Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1.* **Cancer Res**, 1998. 58: 1713-8.
119. Vogelstein, B., E.R. Fearon, S.E. Kern, et al., *Allelotype of colorectal carcinomas.* **Science**, 1989. 244: 207-11.
120. Suriawinata, A. and R. Xu, *An update on the molecular genetics of hepatocellular carcinoma.* **Semin Liver Dis**, 2004. 24: 77-88.
121. Farazi, P.A. and R.A. DePinho, *Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment.* **Nat Rev Cancer**, 2006. 6: 674-87.
122. Lockwood, W.W., R. Chari, B. Chi, et al., *Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics.* **Eur J Hum Genet** 2005. 14: 139-148.

123. Miyoshi, Y., K. Iwao, Y. Nagasawa, et al., *Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3*. **Cancer Res**, 1998. 58: 2524-7.
124. Huang, H., H. Fujii, A. Sankila, et al., *Beta catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas*. **Am J Pathol**, 1999. 155: 1795-801.
125. Satoh, S., Y. Daigo, Y. Furukawa, et al., *AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1*. **Nat Genet**, 2000. 24: 245-50.
126. Merlea, P., M. Kima, M. Herrmann, et al., *Oncogenic role of the frizzled-7/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma*. **J. Hepatol**, 2005. 43: 854-862.
127. Bana, K.C., H. Singh, R. Krishnan, et al., *GSK-3 β phosphorylation and alteration of β -catenin in hepatocellular carcinoma*. **Cancer Letters**, 2003. 199: 201-208.
128. Beder, L.B., M. Gunduz, M. Ouchida, et al., *Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas*. **Lab Invest**, 2003. 83: 99-105.
129. Togni, R., N. Bagla, P. Muiesan, et al., *Microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver in patients older than 60 years*. **Hepatol Res**, 2009. 39: 266-73.
130. Chiappini, F., M. Gross-Goupil, R. Saffroy, et al., *Microsatellite instability mutator phenotype in hepatocellular carcinoma in non-alcoholic and non-virally infected normal livers*. **Carcinogenesis**, 2004. 34: 514-17.
131. Shih, Y.L., R.Y. Shyu, C.B. Hsieh, et al., *Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma*. **Cancer**, 2006. 107: 579-90.

132. Bengochea, A., M.M. de Souza, L. Lefrancois, et al., *Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma*. **Br J Cancer**, 2008. 99: 143-50.
133. Andersson, M., M. Jönsson, L.L. Nielsen, et al., *Mutations in the tumor suppressor gene p53 in human liver cancer induced by alpha-particles*. **Cancer Epidemiol** 1995. 4: 785.
134. McGlynn, K.A., L. Tsao, A.W. Hsing, et al., *International trends and patterns of primary liver cancer*. **Int J Cancer**, 2001. 94: 290-6.
135. Moinzadeh, P., K. Breuhahn, H. Stutzer, et al., *Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis*. **Br J Cancer**, 2005. 92: 935-41.
136. Pinkel, D. and D.G. Albertson, *Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer*. **Nat Genet**, 2005. 37 Suppl: S11-7.
137. Legoix, P., O. Bluteau, J. Bayer, et al., *Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity*. **Oncogene**, 1999. 18: 4044-6.
138. Guan, Y.S., Q. He, and Z. La, *Roles of p53 in carcinogenesis, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma*. **J Cancer Mol**, 2006. 2: 191-7.
139. Fujiwara, Y., H. Ohata, T. Kuroki, et al., *Isolation of a candidate tumor suppressor gene on chromosome 8p21.3-p22 that is homologous to an extracellular domain of the PDGF receptor beta gene*. **Oncogene**, 1995. 10: 891-5.
140. Yuan, B.Z., M.J. Miller, C.L. Keck, et al., *Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP*. **Cancer Res**, 1998. 58: 2196-9.

TABELLE

Tabella 3.1: Caratteristiche cliniche dei 77 pazienti affetti da HCC analizzati

<i>Variabile</i>	<i>Categoria</i>	<i>Frequenza</i>
Sesso	M	57 (74%)
	F	20 (26%)
Età (anni)	Media	67
Eziologia	HCV	50 (65%)
	HBV	6 (8%)
	Virale	11 (14%)
	Non virale	6 (8%)
	Non nota	4 (5%)
Numero noduli	1	71 (92%)
	2	5 (7%)
	3	1 (1%)
Cirrosi	Si	55 (71%)
	No	22 (29%)

Tabella 3.1.1: Caratteristiche isto-patologiche degli 84 noduli di HCC analizzati

Variabile	Categoria	Frequenza
Grado di differenziazione	Alto	43 (51%)
	Basso	41 (49%)
Grado nucleare	1	14 (16%)
	2	40 (48%)
	3	30 (36%)
Lesioni preneoplastiche	Presenti	40 (48%)
	Assenti	44 (52%)
Invasione vascolare	Si	30 (36%)
	No	54 (64%)
Capsula	Si	67(80%)
	No	17 (20%)
Satelliti	Si	6 (7%)
	No	78 (93%)
Crescita	Early	8 (9%)
	Espansiva	67 (80%)
	Infiltrativa	9 (11%)

Tabella 3.2: Parametri immunoistochimici

Anticorpi	Clone	Pretrattamento	Diluizione	Incubazione	Positività
CTNNB1	14 β - CAT/CTNNB1	EDTA pH9	1:1000	overnight	nucleare
GS	6/glutamina Synthetase	EDTA pH9	1:10000	overnight	citoplasmatica

Tabella 3.3: *Microsatelliti analizzati e condizioni di PCR*

Microsatelliti	Banda Citogenetica	Temperatura Annealing (°C)	Concentrazione MgCl2 (mM)	N° cicli PCR
D1S206	1p21	60	2	35
D1S1588	1p22.2	62	2	35
D1S255	1p34.2	62	2	35
D1S199	1p36	58	2	35
D8S1477	8p12	61	2	35
D8S136	8p21.3-p22	58	2	35
D8S261	8p22	61	2	35
D8S277	8p23	60	2	35
D16S753	16p11.2	62	2	35
D16S420	16p11.1-p12.1	63	2	35
D16S423	16p13.3	60	2	35
D17S1358	17p12.1	61	2	35
D17S520	17p12-p13	58	2	35
D17S786	17p13.1	61	2	35
D19S206	19q13.41	64	2	35
D19S412	19q13.3	58	2	35
D19S49	19q12	57	2	35
D19S433	19q12.1	60	2	35

Tabella 4.1: Caratterizzazione immunohistochimica degli 84 HCC inclusi nella casistica:
GS+ vs GS-

Marcatori	Espressione	Totale (n=84)	GS+ (n=56)	GS- (n=28)	<i>p</i>
CTNNB1	Assente	61 (73%)	33 (59%)	28 (100%)	<0.001
	Presente	23 (27%)	23 (41%)	0 (0%)	
GS	Assente	28 (100%)	0	28 (100%)	
	Negativo	8		8	
	Debole	16		16	
	Zonale	4		4	
	Positivo	56 (100%)	56 (100%)	0	
	Diffuso intenso	38	38		
	Diffuso misto	13	13		
	Diffusa intensa/mista	5	5		

Tabella 4.2: Caratteristiche cliniche dei 77 pazienti affetti da HCC analizzati: GS+ vs GS-

Variabile	Categoria	Totale (n=77)	GS+ (n=53)	GS- (n=24)	<i>p</i>
Sesso	M	57 (74%)	39 (74%)	18 (75%)	ns
	F	20 (26%)	14 (26%)	6 (25%)	
Età (anni)	Media ± ds	67.5 ± 7.2	68 ± 7.13	65.5±7.26	ns
Eziologia	HCV	50 (65%)	36 (68%)	14 (58%)	0.02
	HBV	6 (8%)	2 (4%)	4 (17%)	
	Virale	11 (14%)	10 (19%)	1 (4%)	
	Non virale	6 (8%)	2 (4%)	4 (17%)	
	Non nota	4 (5%)	3 (5%)	1 (4%)	

Tabella 4.2.1 : Caratteristiche istopatologiche degli 84 noduli di HCC: GS+ vs GS-

Variabile	Categoria	Totale (n=84)	GS+ (n=56)	GS- (n=28)	p
Dimensione dei noduli (mm)	Media ± ds	3.05 ± 1.15	3.2 ± 1.14	2,73 ± 1.15	0.0547
Capsula	Presente	67 (80%)	52 (93%)	15 (54%)	<0.001
	Assente	17 (20%)	4 (7%)	13 (46%)	
Pattern di crescita	Espansivo	68 (81%)	51 (91%)	17 (61%)	0.0031
	Infiltrativo	8 (9.5%)	2 (4%)	6 (21%)	
	Permeativo (early)	8 (9.5%)	3 (5%)	5 (18%)	
Invasione vascolare	Presente	30 (36%)	23 (41%)	7 (25%)	0.14
	Assente	54 (64%)	33 (59%)	21 (75%)	
Grado nucleare	1	14 (16%)	11 (20%)	3 (11%)	0.54
	2	40 (48%)	25 (44%)	15 (53%)	
	3	30 (36%)	20 (36%)	10 (36%)	
Noduli satelliti	No	78 (93%)	50 (89%)	28 (100%)	0.072
	Si	6 (7%)	6 (11%)	0 (0%)	
Lesioni preneoplastiche	No	44 (52%)	27 (48%)	17 (61%)	0.279
	Si	40 (48%)	29 (52%)	11 (39%)	
Grado di differenziazione	Alto	43 (51%)	30 (54%)	13 (46%)	0.86
	Basso	41 (49%)	26 (46%)	15 (54%)	

Tabella 4.3: Caratteristiche cliniche dei 77 pazienti affetti da HCC tra i gruppi:
GS+/ CTNNB1+, *GS+/ CTNNB1 -*, *GS-/ CTNNB1 -*

Variabile	Categoria	Totale (n=77)	GS+/ CTNNB1+ (n=22)	GS+/ CTNNB1 - (n=31)	GS-/ CTNNB1 - (n=24)	p
Sesso	M	57 (74%)	18 (82%)	21 (68%)	18 (75%)	ns
	F	20 (26%)	4 (18%)	10 (32%)	6 (25%)	
Età (anni)	Media ± ds	67± 7.2	68,5±6,5	68,2±7,5	65 ± 7.18	ns
Eziologia	HCV	50 (65%)	16 (73%)	20 (65%)	14 (58%)	p[#]0,03 p* ns p ns
	HBV	6 (8%)	1 (4%)	1 (3%)	4 (17%)	
	Virale	11 (14%)	5 (23%)	5 (16%)	1 (4%)	
	Non virale	6 (8%)	0 (0%)	2 (6%)	4 (17%)	
	Non nota	4 (5%)	0 (0%)	3 (10%)	1 (4%)	

Legenda: p*: *GS+/ CTNNB1+* vs *GS+/ CTNNB1-*, p[#]: *GS+/ CTNNB1+* vs *GS-/ CTNNB1-*, p: *GS+/ CTNNB1-* vs *GS-/ CTNNB1-*

Tabella 4.3.1: Caratteristiche isto-patologiche degli 84 noduli di HCC tra i gruppi: GS+/ CTNNB1 +, GS+/ CTNNB1-, GS-/ CTNNB1-

Variabile	Categoria	Totale (n=84)	GS+/ CTNNB1+ (n=23)	GS+/ CTNNB1 - (n=33)	GS-/ CTNNB1 - (n=28)	p
Dimensione dei noduli (mm)	Media \pm ds	3.05 \pm 1.15	3.43 \pm 1.14	3.05 \pm 1.17	2.74 \pm 1.20	p[#]0.034 p ns
Capsula	Presente Assente	67 (80%) 17 (20%)	22 (96%) 1 (4%)	30 (91%) 3 (9%)	15 (54%) 13 (46%)	ns
Pattern di crescita	Espansivo Infiltrativo Permeativo (early)	68 (81%) 8 (9.5%) 8 (9.5%)	23 (100%) 0 0	28 (85%) 2 (6%) 3 (9%)	17 (61%) 6 (21%) 5 (18%)	ns
Invasione vascolare	Presente Assente	30 (36%) 54 (64%)	13 (56%) 10 (44%)	10 (30%) 23 (70%)	7 (25%) 21 (75%)	p*0.034 p[#] 0.017
Grado nucleare	1 2 3	14 (16%) 40 (48%) 30 (36%)	4 (18%) 9 (39%) 10 (43%)	7 (21%) 16 (49%) 10 (30%)	3 (11%) 15 (53%) 10 (36%)	ns
Noduli satelliti	No Si	78 (93%) 6 (7%)	22 (96%) 1 (4%)	28 (85%) 5 (15%)	28 (100%) 0	ns
Lesioni preneoplastiche	No Si	44 (52%) 40 (48%)	11 (48%) 12 (52%)	16 (48%) 17 (52%)	17 (61%) 11 (39%)	ns
Grado di differenziazione	Alto Basso	43 (51%) 41 (49%)	13 (56%) 10 (44%)	17 (52%) 16 (48%)	13 (46%) 15 (54%)	ns

Legenda: p*: GS+/ CTNNB1+ vs GS+/ CTNNB1-, p[#]: GS+/ CTNNB1+ vs GS-/ CTNNB1-, p: GS+/ CTNNB1- vs GS-/ CTNNB1-

Tabella 4.4: Mutazioni del gene *CTNNB1* identificate con corrispondenti cambiamenti nucleotidici ed amminoacidici

CASI	CODONE	NUCLEOTIDE	CAMBIO NT	CAMBIO AA	MUTAZIONE
HCC1	45	138	TCT>CCT	Serina-prolina	S45P
HCC5	37	110	TCT>TTT	Serina-fenilalanina	S37F
HCC10	37	110	TCT>TTT	Serina-fenilalanina	S37F
HCC17	37	110	TCT>TAT	Serina-tyrosina	S37Y
HCC19	45	132	TCT>CCT	Serina-prolina	S37P
HCC20	37	110	TCT>TAT	Serina-tyrosina	S37Y
HCC25	37	110	TCT>TTT	Serina-fenilalanina	S37F
HCC31	37	110	TCT>TTT	Serina-fenilalanina	S37F
HCC32	33	98	TCT>TAT	Serina-tyrosina	S33Y
HCC34	32	95	GAC>GGC	Ac.aspartico-glicina	D32G
HCC39	33	98	TCT>TTT	Serina-fenilalanina	S37F
HCC59	c.376_377delG	376-377	GAGG <u>A</u> T	Delezione mononucleotidica	G_deletion
HCC84	33	98	TCT>TTT	Serina-fenilalanina,	S37F

Tabella 4.4.1: Correlazione tra espressione immunoistochimica di GS/ CTNNB1 e stato mutazionale

<i>Mutazioni CTNNB1</i>	<i>GS +</i>		<i>GS -</i>		<i>Totale</i>
	<i>CTNNB1 positivi</i>	<i>CTNNB1 negativi</i>	<i>CTNNB1 positivi</i>	<i>CTNNB1 negativi</i>	
<i>Positivi</i>	<i>8</i>	<i>4</i>	<i>-</i>	<i>1</i>	<i>13</i>
<i>Negativi</i>	<i>14</i>	<i>23</i>	<i>-</i>	<i>20</i>	<i>57</i>
<i>Totale</i>	<i>22</i>	<i>27</i>	<i>-</i>	<i>21</i>	<i>70</i>

Tabella 4.5: Grado di informatività, frequenza di LOH per singolo microsatellite e per braccio cromosomico espresse in percentuale

Microsatelliti indagati	% Informatività		% LOH per microsatellite		% LOH per cromosoma
D1S206	62/84	74%	42/62	68%	50%
D1S1588	66/84	78%	26/66	39%	
D1S255	68/84	80%	29/63	46%	
D1S199	63/84	75%	29/63	46%	
D8S1477	68/84	81%	40/68	58%	58%
D8S136	75/84	89%	45/75	60%	
D8S261	74/84	88%	42/74	57%	
D8S277	64/84	76%	37/64	58%	
D16S753	66/84	78%	37/69	53%	52%
D16S420	66/84	78%	37/69	53%	
D16S423	70/84	83%	34/70	48%	
D17S1358	58/84	69%	39/58	67%	48%
D17S520	69/84	82%	27/69	39%	
D17S786	64/84	76%	26/64	41%	
D19S49	70/84	83%	11/70	16%	32%
D19S433	67/84	80%	49/67	73%	
D19S412	68/84	81%	14/68	20%	
D19S206	82/84	98%	17/82	21%	

Tabella 4.6: Correlazioni tra frequenza di LOH ed una serie di variabili clinico-istopatologiche per cromosoma analizzato A) cromosoma 1; B) cromosoma 8; C) cromosoma 16; D) cromosoma 17; E) cromosoma 19

A) CROMOSOMA 1p

Variabile	Categoria	D1S206		D1S1588		D1S255		D1S199	
		GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>
Caso vs controllo	GS+ vs GS-	ns		ns		ns		ns	
Età	<67 vs >67	<i>trend</i> >67		<i>trend</i> >67		ns		ns	
Sesso	M vs F	<i>trend M</i>		ns		ns		ns	
Dimensioni	<3 vs >3	<i>trend</i> >3		<i>trend</i> >3		0.047	ns	0.035	
						0.025			
Grado	High vs.Low	<i>trend high</i>		ns		ns		<i>trend high</i>	
Invasione vascolare	Si vs no	ns		ns		ns		ns	
Capsula peritumorale	Si vs no	ns	0.0031	ns	0.038	ns		ns	0.023
		ns		ns				0.036	
Lesioni preneoplastiche	Si vs no	ns		ns		ns		0.016	Ns
								0.022	
Cirrosi	Si vs no	ns		ns		ns		ns	
IHC CTNNB1	Pos vs Neg	ns		0.034		ns		ns	
Mutazioni CTNNB1	Si vs no	ns		ns		0.043		ns	

B) CROMOSOMA 8p

Variabile	Categoria	D8S1477		D8S136		D8S261		D8S277	
		GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>P</i>
Caso vs controllo	GS+ vs GS-	ns		ns		ns		ns	
Età	<67 vs >67	<i>trend >67</i>		0.005	ns	ns		ns	
				0.0006					
Sesso	M vs F	<i>trend M</i>		ns		ns		ns	
Dimensioni	<3 vs >3	<i>trend >3</i>		ns		ns		ns	0.040
Grado	High vs low	<i>trend high</i>		ns		ns		ns	
Invasione vascolare	Si vs no	ns		ns		ns		ns	
Capsula peritumorale	Si vs no	0.022	ns	ns		ns		0.027	ns
		ns						ns	
Lesioni preneoplastiche	Si vs no	ns		ns		ns		ns	
Cirrosi	Si vs no	ns		ns		ns		ns	
IHC CTNNB1	Pos vs Neg	0.021		ns		ns		ns	
Mutazioni CTNNB1	Si vs no	ns		0.016	ns	ns		ns	
				0.047					

C) CROMOSOMA 16p

Variabile	Categoria	D16S753		D16S420		D16S423	
		GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>
Caso vs controllo	GS+ vs GS-	ns		ns		ns	<i>Trend</i>
Età	<67 vs >67	ns		ns		ns	
Sesso	M vs F	ns		ns		ns	
Dimensioni	<3 vs >3	ns		ns		ns	
Grado	High vs.lo	ns		ns		ns	
Invasione vascolare	Si vs No	ns		ns		ns	
Capsula peritumorale	Si vs No	ns		ns		ns	0.0031
						ns	
Lesioni preneoplastiche	Si vs No	ns		ns		ns	
Cirrosi	Si vs No	ns		ns	0.001	ns	
				0.0005			
IHC CTNNB1	Pos vs Neg	0.050		ns		Ns	
Mutazioni CTNNB1	Si vs No	ns		ns		Ns	

D) CROMOSOMA 17p

Variabile	Categoria	D17S1358		D17S520		D17S786	
		GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>P</i>
Caso vs controllo	GS+ vs GS-	ns		ns		ns	
Età	<67 vs >67	ns		0.043	ns	ns	
Sesso	M vs F	<i>trend M</i>		<i>trend M</i>		ns	
Dimensioni	<3 vs >3	ns		ns		ns	
Grado	High vs. low	ns		0.043	ns	ns	
Invasione vascolare	Si vs No	<i>Trend vs casi</i>		<i>Trend vs casi</i>		0.035	ns
Capsula peritumorale	Si vs No	0.00031		ns		ns	
Lesioni preneoplastiche	Si vs No	ns		ns		ns	
Cirrosi	Si vs No	ns		ns		ns	
IHC CTNNB1	Pos vs Neg	ns		0.042	ns	ns	
				0.050			
Mutazioni CTNNB1	Si vs No	0.046		ns		ns	

E) CROMOSOMA 19q

Variabile	Categoria	D19S49		D19S433		D19S412		D19S206	
		GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>	GS+ <i>p</i>	GS- <i>p</i>
Caso vs controllo	GS+ vs GS-	ns		<i>trend vs controlli</i>		ns		Ns	
Età	<67 vs >67	ns		ns		ns		ns	
Sesso	M vs F	ns		ns		ns		Ns	
Dimensioni	<3 vs >3	ns		ns		ns	0.020	ns	
						0.007			
Grado	High vs low	ns		ns		ns		ns	
Invasione vascolare	Si vs No	ns		ns		ns		ns	
Capsula peritumorale	Si vs No	ns		0.032	0.043	ns		ns	
Lesioni preneoplastiche	Si vs No	ns		ns		ns		ns	
Cirrosi	Si vs No	ns		0.020		ns		0.030	
IHC CTNNB1	Pos vs Neg	ns		ns		ns		ns	
Mutazioni CTNNB1	Si vs No	ns		ns		ns		ns	

Tabella 4.7: Frequenza di LOH espressa in percentuale in noduli che presentavano più gradi di progressione neoplastica: early, G1, G2-G3

MICROSATELLITI	% LOH						P value	
	EARLY		G1		G2-G3		EARLY vs G1+G2-G3	EARLY+G1 vs G2-G3
D1S206	9/17	53%	20/35	57%	29/38	76%	0.27	0.035
D1S1588	2/17	12%	13/40	32.5%	17/39	44%	0.037	0.077
D1S255	6/17	35%	22/39	56%	14/35	40%	0.35	0.31
D1S199	4/17	23.5%	14/41	34%	20/40	50%	0.29	0.415
D8S1477	7/17	41%	21/40	52.5%	23/40	57.5%	0.90	0.34
D8S136	10/17	59%	21/41	51%	30/48	62.5%	0.70	0.51
D8S261	8/18	44%	21/44	48%	24/41	58%	0.51	0.24
D8S277	6/19	32%	20/40	50%	20/35	57%	0.38	0.36
D16S753	5/18	27%	22/41	53%	19/41	46%	0.086	0.95
D16S420	5/16	31%	20/41	49%	21/40	52%	0.156	0.40
D16S423	9/15	60%	13/41	32%	23/42	55%	0.23	0.12
D17S1358	6/15	40%	24/34	70.5%	22/34	65%	0.045	0.74
D17S520	6/16	37.5%	9/40	22.5%	22/43	51%	0.99	0.012
D17S786	5/14	36%	14/37	38%	15/37	40.5%	0.80	0.75
D19S49	0/16	0%	6/40	15%	5/40	12.5%	0.13	0.93
D19S433	12/15	80%	26/40	65%	30/39	77%	0.46	0.40
D19S412	3/15	20%	6/37	16%	10/41	24%	0.96	0.40
D19S206	1/19	5%	6/48	12.5%	12/48	25%	0.14	0.038

Legenda: early lesioni precoci; G1 lesioni a basso grado; G2-G3 lesioni ad alto grado

Tabella 4.7.1: Frequenza di LOH espressa in percentuale nel solo gruppo dei casi GS+ in noduli che presentavano più gradi di progressione neoplastica: early, G1, G2-G3

MICROSATELLITI	% LOH						P value	
	EARLY		G1		G2-G3		EARLY vs G1+G2	EARLY+G1 vs G2
D1S206	8/15	53%	16/26	61.5%	19/26	73%	0.31	0.56
D1S1588	2/14	14%	9/28	32%	10/26	38%	0.13	0.28
D1S255	6/15	40%	15/28	53%	11/23	48%	0.45	0.93
D1S199	3/15	20%	11/32	34%	14/29	48%	0.13	0.10
D8S1477	6/15	40%	15/29	52%	15/25	60%	0.28	0.32
D8S136	9/14	64%	18/29	62%	20/32	62%	0.88	0.97
D8S261	6/15	40%	15/31	48%	15/26	57%	0.38	0.32
D8S277	6/16	37.5%	14/28	50%	14/24	58%	0.25	0.31
D16S753	4/15	27%	15/30	50%	12/28	43%	0.16	0.95
D16S420	5/13	38%	15/31	48%	13/26	50%	0.48	0.71
D16S423	7/12	58%	9/30	30%	12/27	44%	0.16	0.60
D17S1358	4/12	33%	18/24	75%	14/21	66%	0.015	0.67
D17S520	3/13	23%	6/29	21%	14/29	48%	0.42	0.017
D17S786	3/12	25%	9/26	35%	9/24	37,5%	0.46	0.63
D19S49	0/15	0%	5/31	16%	3/27	11%	0.12	0.97
D19S433	11/13	85%	16/28	57%	20/28	71%	0.15	0.62
D19S412	2/13	15%	3/28	11%	7/29	24%	0.85	0.19
D19S206	1/17	6%	4/36	11%	9/33	27%	0.19	0.029

Legenda: early lesioni precoci; G1 lesioni a basso grado; G2-G3 lesioni ad alto grado

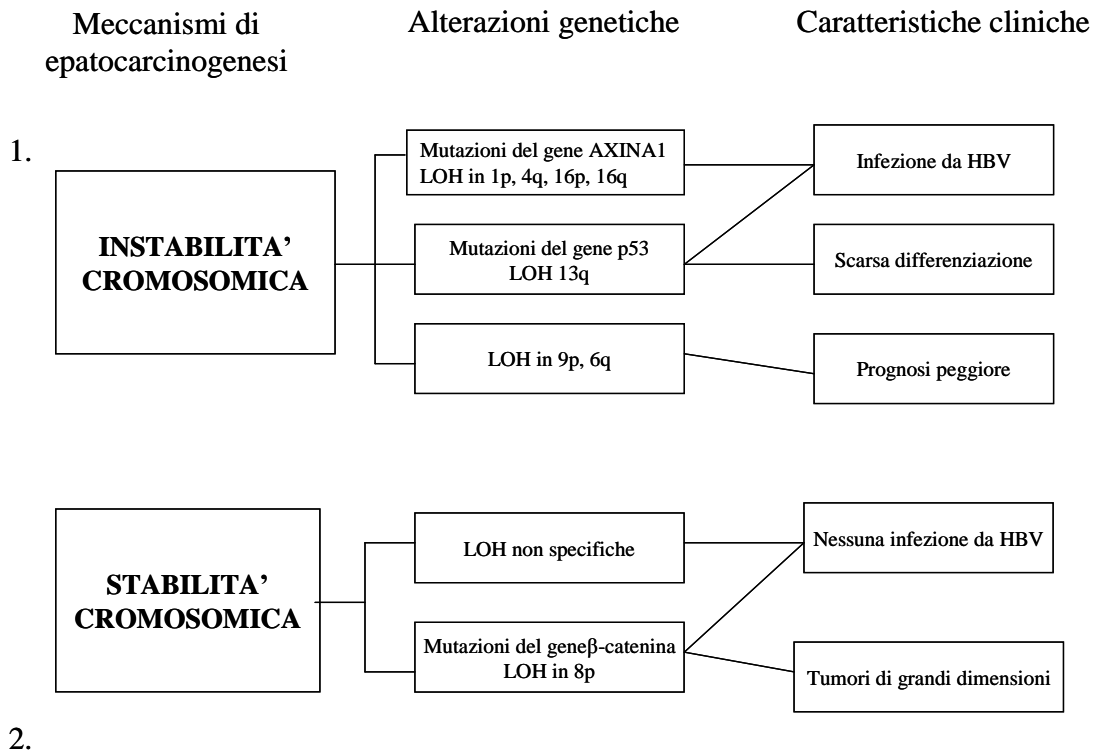
Tabella 4.8: Numero di perdite alleliche acquisite durante la progressione neoplastica e frequenza totale di LOH per nodulo indagato espressa in percentuale

Microsatelliti	LOH e	LOH G1	LOH G2-G3	Casi totali con LOH ACQUISITA		LOH _{totali} / C.I. _{con} LOH	% LOH totale
				C.I	TOTALE		
D1S206	8	2	2	12	18	18/25	72%
D1S1588	2	1	2	5	9	9/27	33%
D1S255	6	1	1	8	11	11/24	12.5%
D1S199	4	0	2	6	10	10/27	37%
D8S1477	7	3	2	12	15	15/26	58%
D8S136	9	2	1	12	17	17/28	61%
D8S261	8	2	3	13	16	16/26	61.5%
D8S277	7	3	2	12	15	15/26	58%
D16S753	4	4	3	12	14	14/27	52%
D16S420	4	5	1	10	16	16/21	76%
D16S423	8	2	3	13	16	16/26	61.5%
D17S1358	5	5	1	11	20	20/23	87%
D17S520	6	0	2	8	14	14/26	54%
D17S786	5	3	0	8	9	9/20	45%
D19S49	0	1	2	3	3	3/22	14%
D19S433	11	1	4	16	22	22/23	96%
D19S412	3	0	2	5	6	6/22	27%
D19S206	1	3	4	8	10	10/30	33%

Legenda: LOH e: numero di LOH in noduli con componente early, LOH G1: numero di LOH in noduli a grado G1; LOH G2: numero di LOH in noduli a grado G2-G3; C.I: casi informativi per LOH; LOH_{totali}: numero di LOH presenti nel totale di noduli indagati; % LOH_{totale}: percentuale di LOH calcolata per singolo nodulo tumorale.

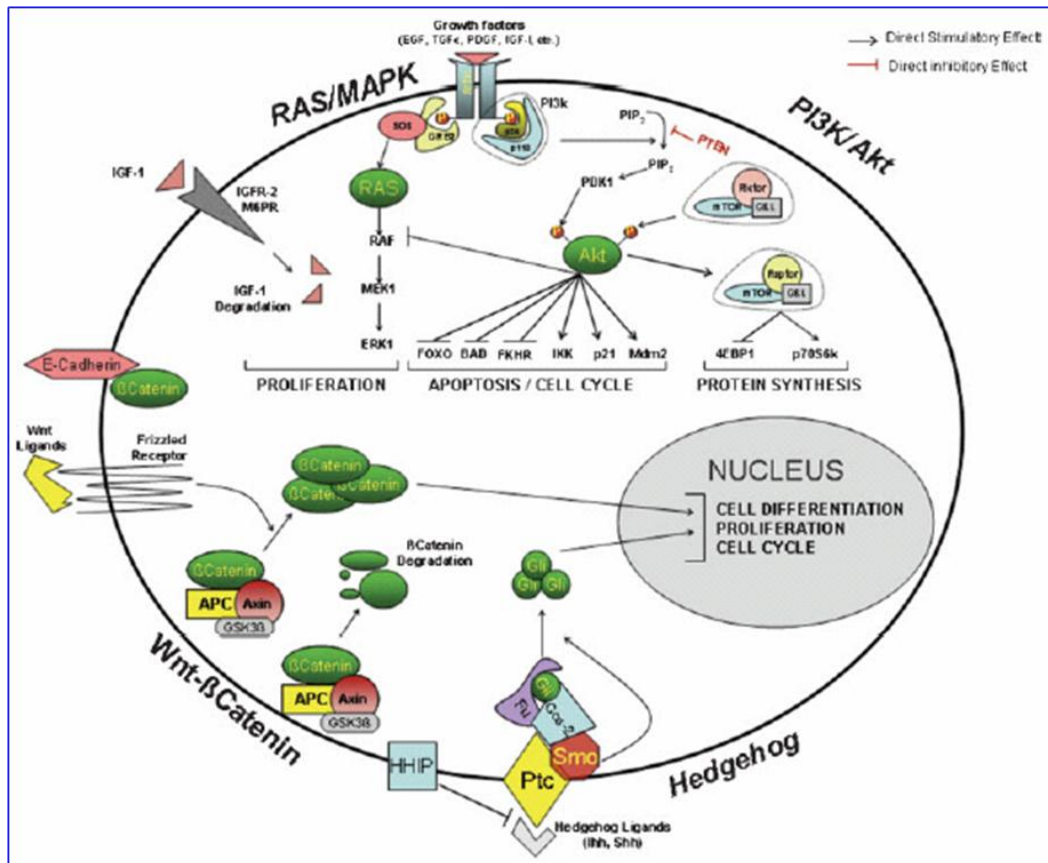
FIGURE

Figura 1.1: Principali meccanismi di epatocarcinogenesi definiti da alterazioni genetiche e correlazioni con parametri clinici



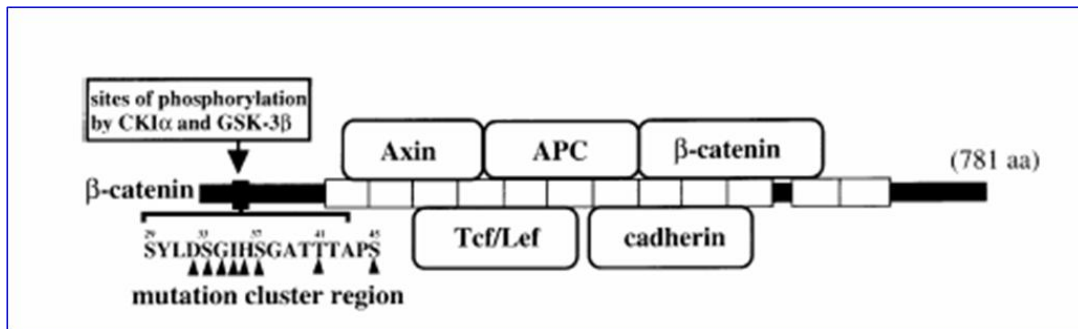
Legenda: [Modificata da Laurent-Puig P and Zucman-Rossi. Gastroenterology 2001] [55]

Figura 1.2: Vie di segnalazione implicate nell'epatocarcinogenesi



Legenda: Sotto il controllo dei recettori tirosin-chinasici (TKRs) vi sono i due principali pathways. RAS/MAPK: in assenza di ligando, RAS inizia un'attivazione sequenziale (fosforilazione) di Raf, Mek ed Erk, che induce modificazioni a livello dell'espressione di geni che stimolano la proliferazione. PI3k/Akt: Akt contiene i due maggiori siti di fosforilazione. Uno dipendente da PIP3 (fosfatidilinositolo-3,4,5 trifosfato) ed il secondo attivato dal complesso mTOR/Rictor/GβL. Akt interagisce con numerosi mediatori (FOXO, BAD, FKHR, IKK, p21, Mdm2, etc.) ed interviene nella regolazione dell'apoptosi. Sotto il controllo di Akt, il complesso mTOR/Raptor/GβL può indurre la sintesi proteica attraverso due differenti meccanismi 50TOPdipendenti (p70S6) and Ca-dipendente (4EBP1). Wnt/CTNNB1: in assenza di ligando la β-Catenina viene degradata attraverso ubiquitinizzazione proteasoma-dipendente a seguito di fosforilazione del complesso APC/AXIN/GSK3β. A seguito della stimolazione del ligando Wnt, la β-Catenina si accumula nel citoplasma e trasloca nel nucleo inducendo la modificazione di numerosi geni coinvolti nella proliferazione cellulare, regolazione del ciclo cellulare, apoptosi e differenziazione Survivin, c-myc, Cyclin D1, etc). Hedgehog: in assenza della protein Hh, Ptc inibisce Smo che forma un complesso con Cos e Fu e previene la traslocazione nucleare di Gli. In presenza del ligando Hh, l'effetto inibitorio di Ptc su Smo viene meno. Come risultato, Gli raggiunge i propri geni target a livello intranucleare. In modo simile alla β-Catenina, Gli svolge un ruolo chiave nel regolare la differenziazione, proliferazione e ciclo cellulare. [Tratta da Villanueva, MD, et al., Seminar Liver disease 2007; 27:55-76] [53]

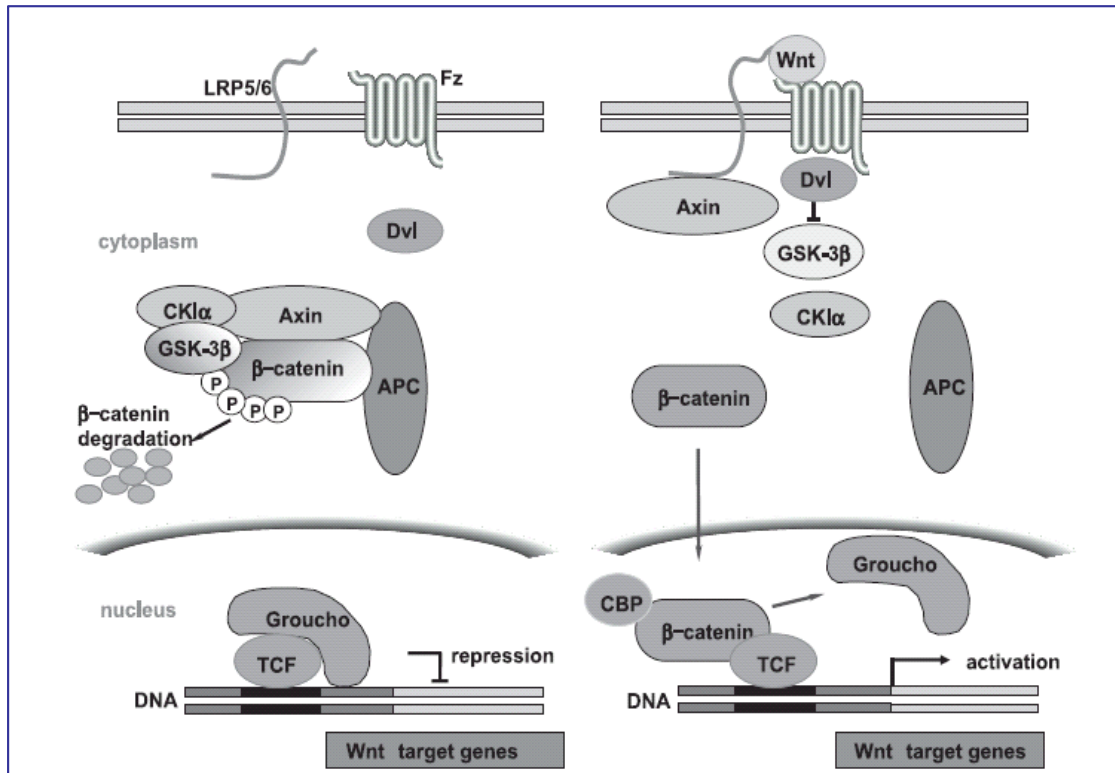
Figura 1.3: Struttura di β -catenina/CTNNB1



Legenda: La proteina β -catenina/CTNNB1 è una proteina di 92kDa, il cui gene CTNNB1 è localizzato nella regione cromosomica 3p21.3-p22. Comprende un sito di fosforilazione da parte di CKI- α e GSK-3 β conservato tra un dominio N-terminale ed uno C-terminale, un sito di legame per la α -catenina in quanto nelle cellule epiteliali normali, è parte costitutiva delle “adherence junction” intercellulari ancora infatti la porzione citosolica della E-caderina all’actina del citoscheletro, 13 armadillo repeats ed un dominio di trans attivazione.

[Modificata da Kikuchi A. *Cancer Sci* 2003, 94: 225 – 229] [82]

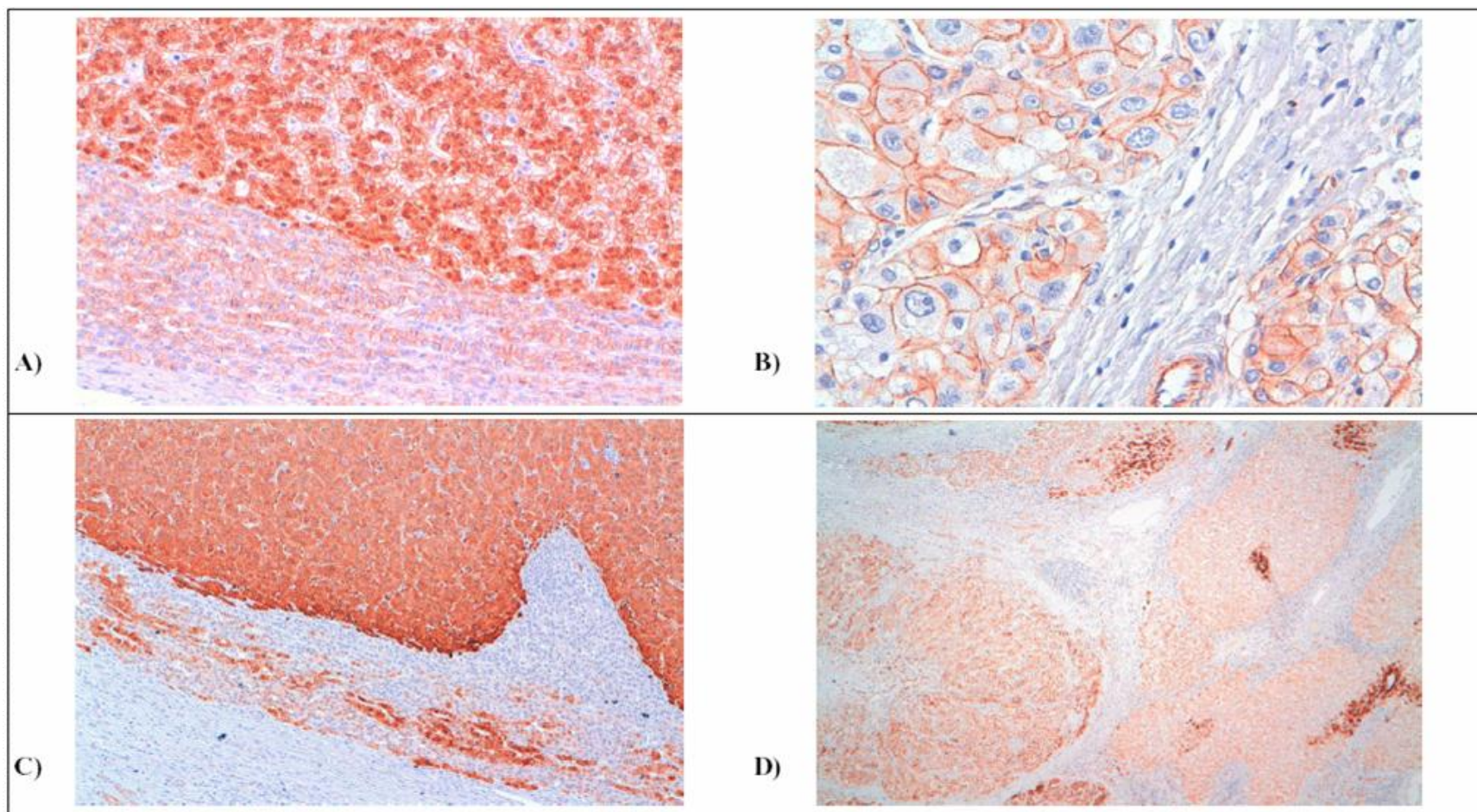
Figura 1.4: Via di segnale Wnt/CTNNB1



Legenda: L'attivazione del pathway di segnalazione Wnt in seguito ad alterazioni a carico dell'oncogene β -catenina o degli oncosoppressori axina ed E-caderina, determina come risultato finale l'accumulo nucleare di β -catenina portando ad una proliferazione incontrollata. In assenza di segnalazione da parte di Wnt, la β -catenina risulta fosforilata in specifici residui di serina e treonina N-terminali da parte del complesso multiproteico contenente l'axina, la chinasi (GSK)-3 β (glycogen synthase kinase B) e la proteina APC (adenomatous polyposis coli) con conseguente degradazione ubiquitino-dipendente. L'attivazione della segnalazione attraverso i recettori Wnt inibisce l'attività della GSK-3 β ed induce la stabilizzazione della β -catenina che trasloca nel nucleo dove si associa con i fattori trascrizionali Tcf/LEF, attivando l'espressione di specifici geni bersaglio, tra i quali c-myc, ciclina D1, fibronectina e alcune metalloproteinasi.

[Tratta da Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. J Pharmacol Sci 2007, 104:293-302] [84]

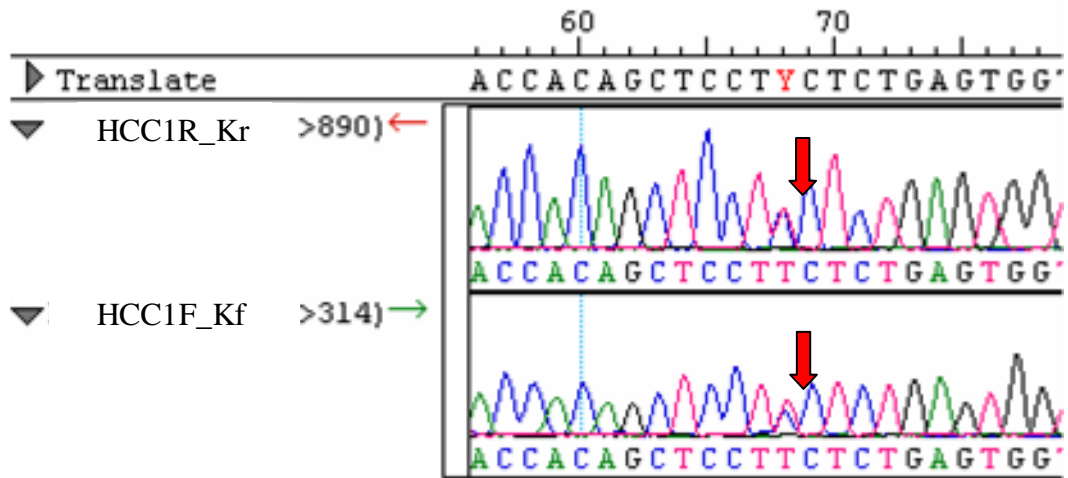
Figura 4.1: Aspetti dell'immunoreattività per CTNNB1 e GS



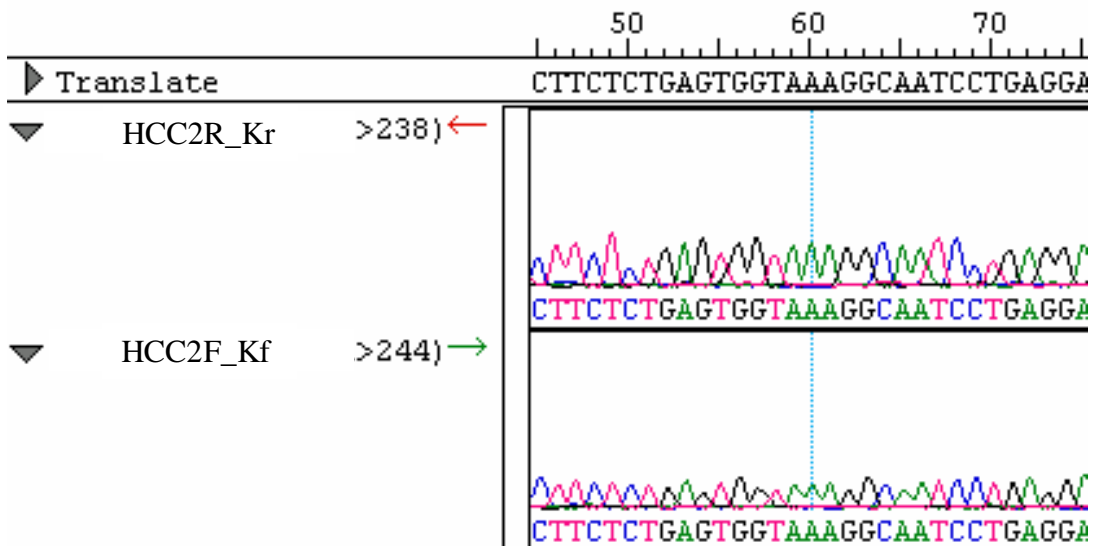
Legenda: A) positività per CTNNB1 (nucleare); B) negatività per CTNNB1 (di membrana); C) positività per GS (diffuso intenso); D) negatività per GS (debole) e confronto con tessuto epatico circostante.

Figura 4.2: Elettroferogrammi esplicativi delle mutazioni di CTNNB1

A

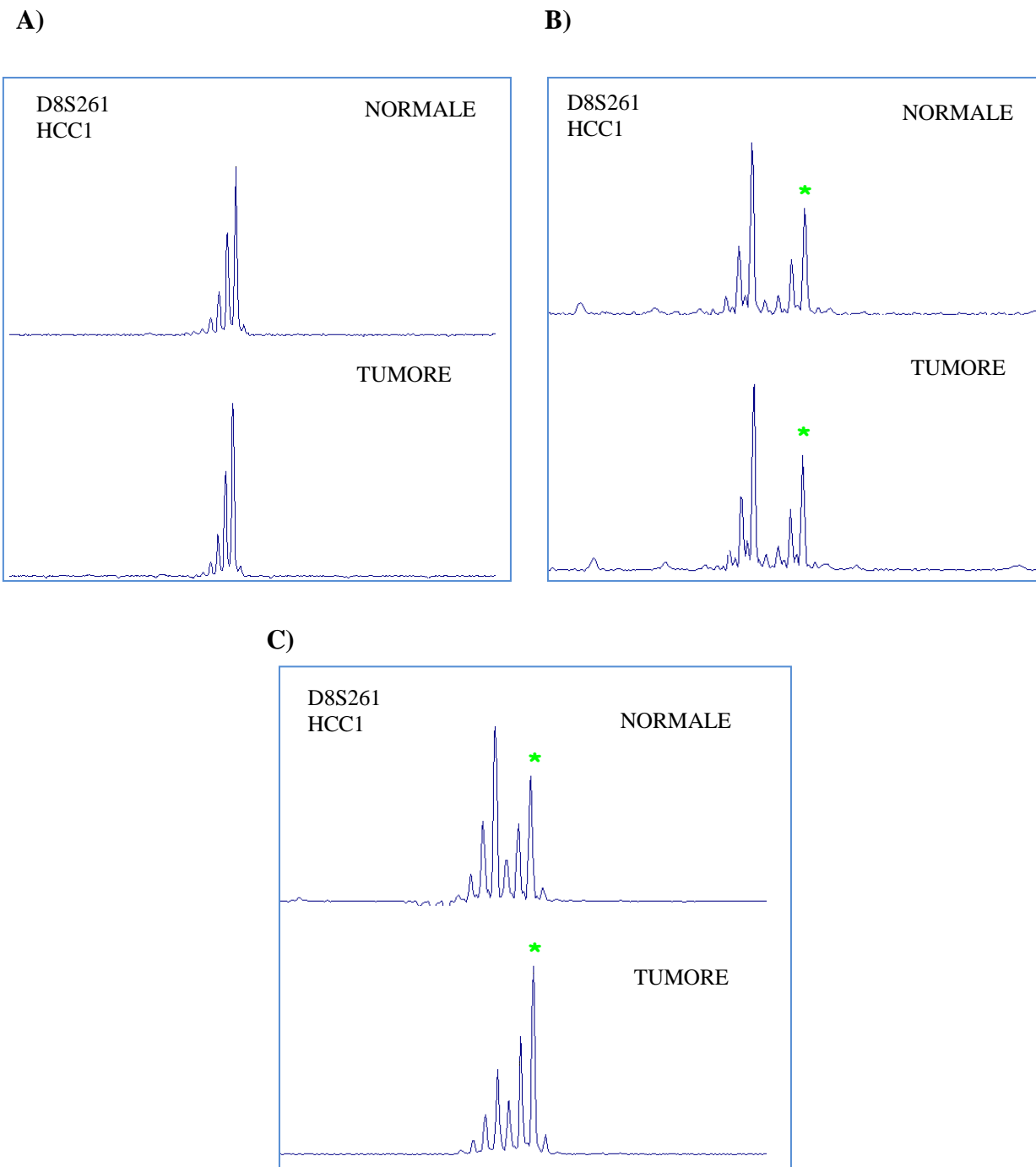


B



Legenda: A) sequenza mutata; B) sequenza wild type

Figura 4.3: Profili elettroforetici di analisi di LOH esemplificativi del microsatellite D8S261



Legenda: A) caso non informativo; B) caso informativo senza LOH; C) caso informativo con LOH; * allele delecto

Figura 4.4: Caratteristiche genetiche degli 84 noduli di HCC analizzati nello studio

CASO	Cromosoma 1p				Cromosoma 8p				Cromosoma 16p			Cromosoma 17p			Cromosoma 19q			
	206	1588	255	199	1477	136	261	277	753	420	423	1358	520	786	49	433	412	206
1	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH
2	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NI	LOH	NI	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH
3	LOH	NOLOH	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	LOH	LOH	LOH
4	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NI	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
5	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NI	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
6	NI	LOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NI	NI	LOH	NI	NOLOH
7	NI	LOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	NI	NI	LOH	NI	NOLOH
8	NI	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH
9	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NI
10	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH
11	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
12	LOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH
13	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH
14	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NI	NI	LOH	LOH	LOH	NI	NI	NI	NI	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH
15	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	NI	LOH	LOH	NOLOH	NI	NI	NI	NI	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH
16	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NI	LOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
17	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH
18	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
19	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH
20	NI	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH
21	LOH	NI	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NI	NI	LOH	NI	LOH
22	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NI	NOLOH	NI	NOLOH	LOH
23	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NI	LOH	LOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
24	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	NI	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH
25	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	NI	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
26	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	NI	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NI	LOH	NI	LOH	NOLOH
27	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH
28	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH
29	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH
30	LOH	NOLOH	NI	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	NOLOH
31	NI	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	LOH
32	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH
33	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
34	LOH	NI	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	LOH	NI	NOLOH	NI	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH
35	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH
36	LOH	LOH	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH
37	LOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NI	NI	LOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH
38	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	NI	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	NI	NI	NOLOH	NOLOH
39	NI	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH
40	LOH	NI	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	LOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH
41	LOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NI	NOLOH
42	LOH	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NI	NOLOH

Continua pag. successiva

CASO	Cromosoma 1p				Cromosoma 8p				Cromosoma 16p			Cromosoma 17p			Cromosoma 19q			
	206	1588	255	199	1477	136	261	277	753	420	423	1358	520	786	49	433	412	206
43	LOH	LOH	NI	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH
44	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	LOH	NI	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH
45	NI	NI	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	
46	LOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH
47	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NI	LOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH
48	NI	NI	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NI	NI	NI	NOLOH	LOH	NI	LOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH
49	NI	NOLOH	NI	NI	NI	LOH	NI	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH
50	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	NI	NI	LOH	LOH	NI	NI	NI	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH
51	LOH	NI	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	LOH	MSI	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH
52	NOLOH	LOH	NI	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	NI	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
53	LOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	LOH	NV	LOH	NI	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH
54	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH
55	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH
56	LOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	LOH
57	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NI	LOH	LOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH
58	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH
59	NOLOH	NI	NI	NOLOH	LOH	NI	NI	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH
60	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH
61	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH
62	LOH	NI	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
63	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
64	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
65	LOH	NI	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH	MSI	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH
66	NI	LOH	LOH	LOH	NI	NI	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH
67	LOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH
68	NI	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH
69	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NI	NOLOH	NI	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH
70	LOH	LOH	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH
71	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NI	NI	NI
72	NI	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH
73	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NI	NI	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
74	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH
75	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	LOH	NOLOH	LOH
76	NI	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH
77	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	LOH	LOH
78	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	LOH	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH
79	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	NI	LOH	LOH	LOH	NI	LOH	LOH	NI	LOH	LOH	LOH
80	NI	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NI	LOH	LOH	NOLOH	NI	NOLOH	NI	NOLOH	NI
81	NI	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NI	NI	NI	NOLOH
82	LOH	NI	NOLOH	NI	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
83	NI	NOLOH	LOH	NI	NI	NOLOH	LOH	NI	NI	MSI	NOLOH	NI	NOLOH	LOH	NOLOH	LOH	NOLOH	NOLOH
84	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	LOH	NOLOH	NOLOH	LOH	LOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NI	NOLOH	NOLOH	NOLOH	NOLOH

Legenda: LOH (evidenziato in giallo): perdita di eterozigosità; NO LOH: assenza di perdita di eterozigosità; NI: non informativo; MSI: (evidenziato in arancione) instabilità microsatellitare; NV: non valutabile

Figura 4.5: Frequenza di LOH espressa in percentuale per i singoli marker microsatellitari analizzati nei cromosomi 1p, 8p, 16p, 17p e 19q

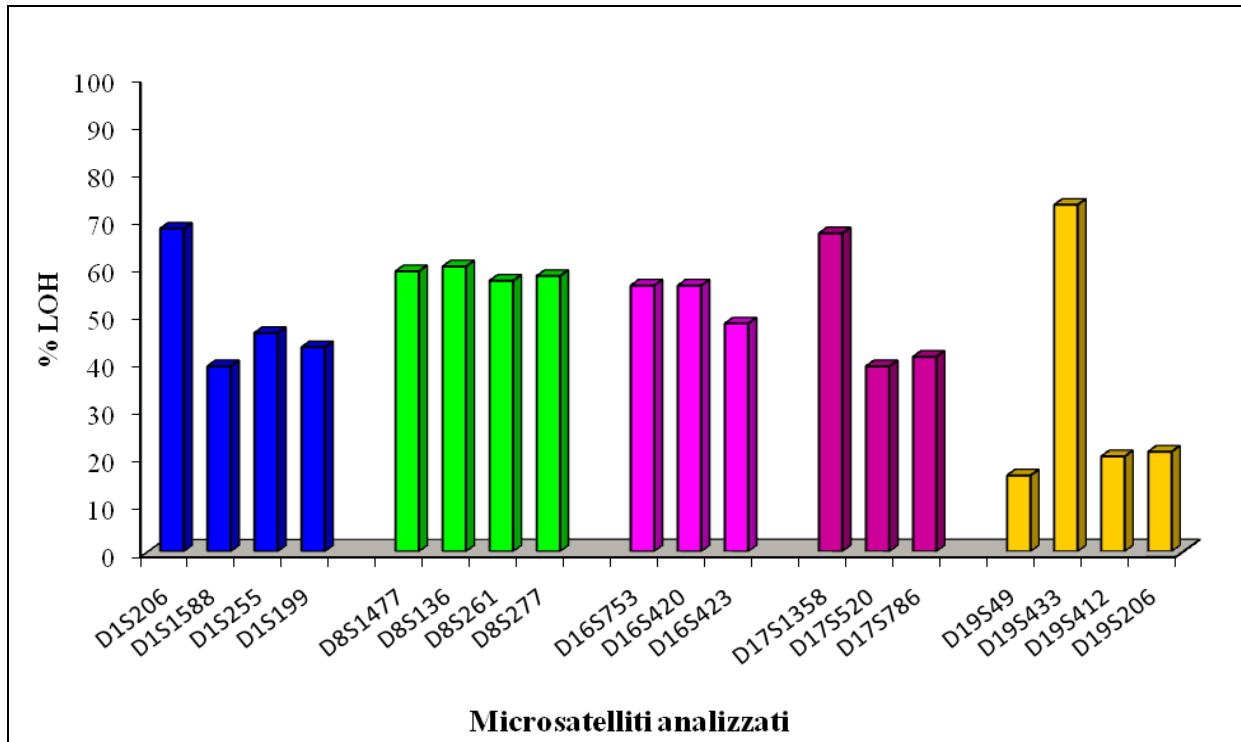


Figura 4.6: Frequenza di LOH espressa in percentuale per i singoli marker microsatellitari: GS+ vs GS-

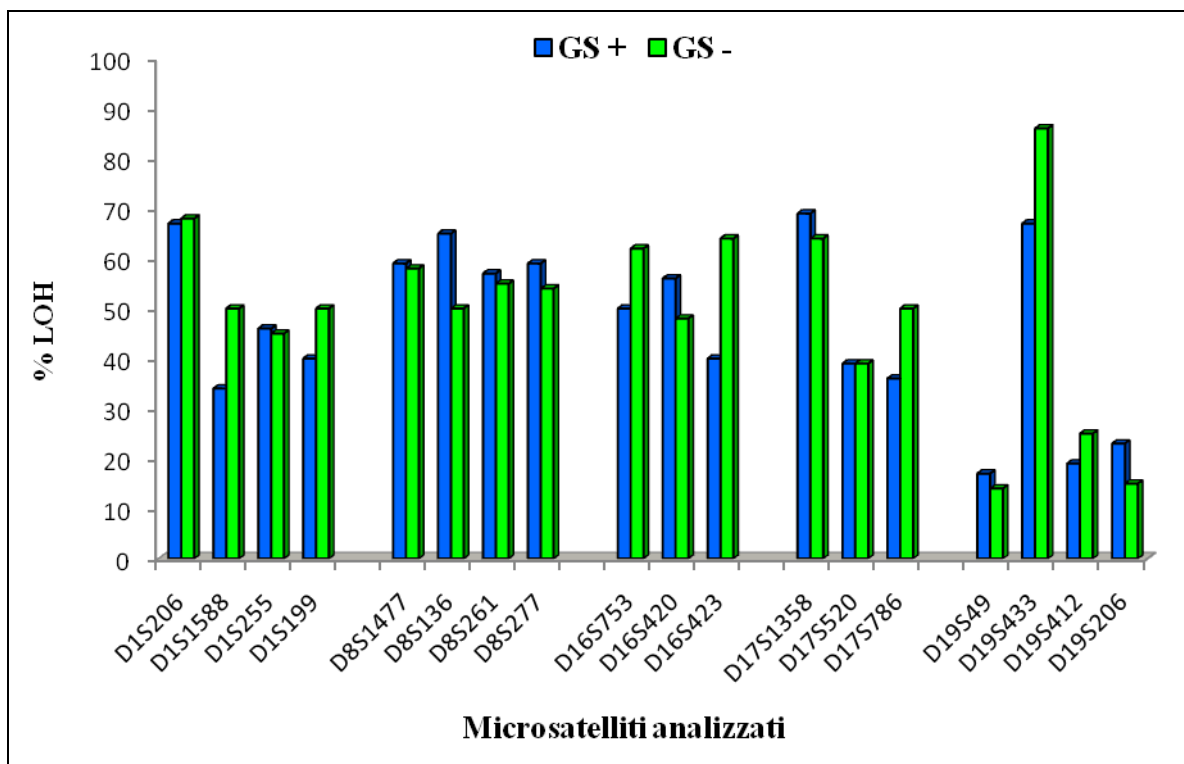


Figura 4.7: Frequenza di LOH espressa in percentuale per i singoli marker microsatellitari in componenti *early* – basso grado (G1) – alto grado (G2-G3)

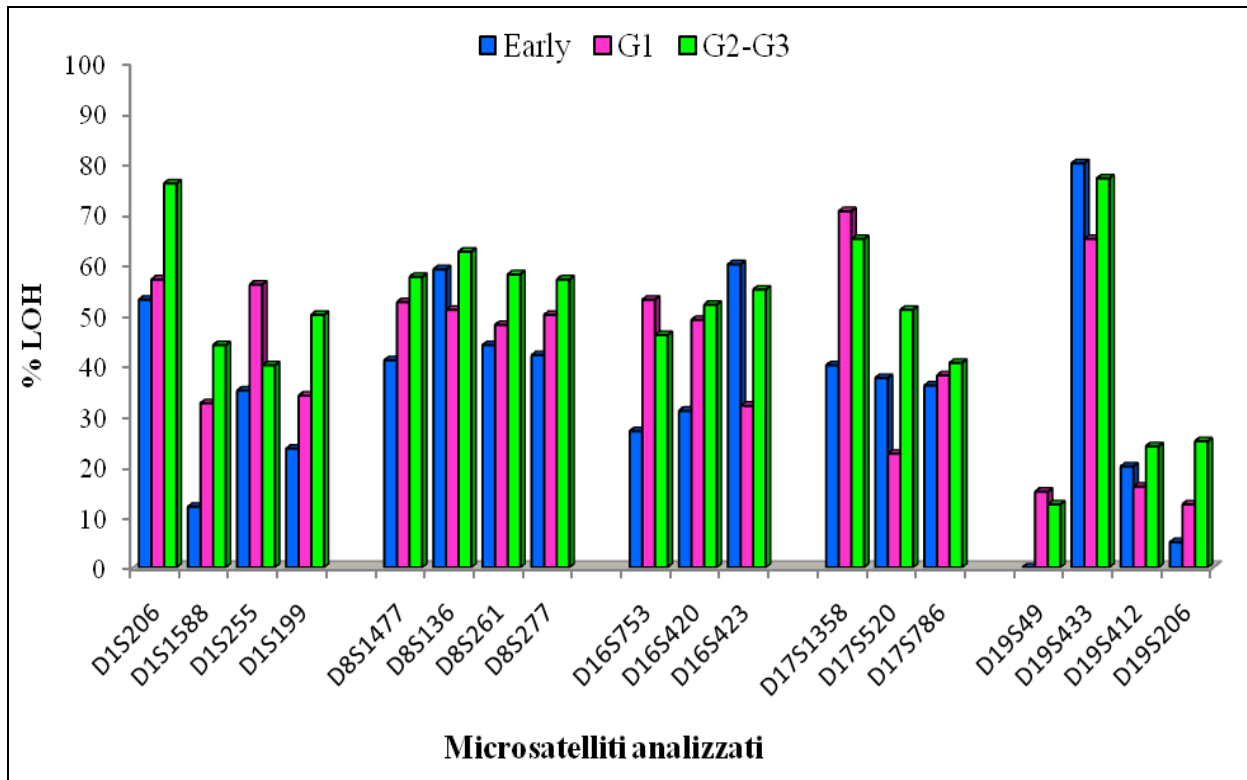


Figura 4.8: Pannello esplicativo del pattern di progressione tumorale del cromosoma 19q per tutti i microsatelliti indagati.

CASO N°	CROMOSOMA 19q											
	D19S49			D19S433			D19S412			D19S206		
	E	G1	G2 G3	E	G1	G2 G3	E	G1	G2 G3	E	G1	G2 G3
HCC1												
HCC2						■						
HCC3												
HCC5												
HCC7												
HCC10												
HCC11												
HCC12												
HCC13						■						
HCC15												
HCC20-21												
HCC22												
HCC24												
HCC26-27												
HCC28												
HCC32												
HCC34												
HCC46												
HCC48												
HCC55												
HCC60												
HCC61												
HCC62												
HCC64												
HCC68												
HCC69												
HCC77												
HCC81												
HCC83												
HCC85												
HCC87												

Legenda: ■ perdita di eterozigotità (LOH); □ assenza di perdita di eterozigotità (NO LOH); ▨ casi non informativi (NI); evidenziate in rosso le progressioni presenti per singolo caso, spesso caratteristiche di più regioni microsatellitari.

RINGRAZIAMENTI

Sono estremamente grata a tutte le persone che mi hanno accompagnata lungo questo percorso.

Primo tra tutti, desidero ringraziare sentitamente il mio Tutor, Professor Enrico Maria Silini, per la grande professionalità e costante disponibilità con cui mi ha seguita in questi anni permettendomi di apprendere molto e di raggiungere questo importante traguardo.

Ringrazio il Professor Ezio Musso, coordinatore di questo corso di dottorato, per la disponibilità e comprensione che mi ha mostrato in ogni momento di bisogno.

Ringrazio inoltre con infinito affetto tutte le mie colleghe di laboratorio per i loro insegnamenti e per l'amicizia coltivata in questi anni: Cinzia, Emily, Lorena, Nicoletta, Silvia, Tiziana.