

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia Sistemica

Ciclo XXIV

Studio clinico-patologico di HCC
con attivazione della via di segnale Wnt

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. E. M. Silini

Tutor:

Chiar.mo Prof. E. M. Silini

Dottorando: Silvia Bosio

INDICE

Introduzione	
<i>Epidemiologia</i>	pag. 3
<i>Eziologia e fattori di rischio</i>	pag. 4
<i>Screening e sorveglianza</i>	pag. 7
<i>Diagnosi</i>	pag. 7
<i>Sistemi di stadiazione dell'epatocarcinoma e gestione del paziente</i>	pag. 8
<i>Trattamento</i>	pag. 11
<i>Anatomia Patologica</i>	pag. 15
<i>Basi genetiche e modelli interpretativi dell'HCC</i>	pag. 17
Scopo dello Studio	pag. 22
Materiali e Metodi	
<i>Studio istologico</i>	pag. 23
<i>Studio immunoistochimico</i>	pag. 24
<i>Dati clinici</i>	pag. 25
<i>Analisi statistica</i>	pag. 25
Risultati	
<i>Caratteristiche cliniche</i>	pag. 26
<i>Caratteristiche morfologiche</i>	pag. 27
<i>Caratteristiche immunoistochimiche</i>	pag. 29
<i>Analisi di sopravvivenza</i>	pag. 29
Discussione	pag. 31
Conclusioni	pag. 38
Bibliografia	pag. 39
Legenda Iconografica	pag. 43
Iconografia	pag. 44
Tabelle	pag. 52

INTRODUZIONE

Epidemiologia

Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta la forma più comune di tumore maligno primitivo del fegato dell'adulto, è la quinta neoplasia per importanza a livello mondiale, costituendo complessivamente il 5.6% di tutti i tumori e occupando il terzo posto nella classifica mondiale delle morti per cancro¹⁻³.

In generale, 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 dell'uomo rispetto alla donna a fattori di rischio quali l'epatite virale, l'alcolismo ed il tabacco⁴.

E' particolarmente diffuso in Asia Orientale e nell'Africa Subsahariana, dove raggiunge tassi di incidenza di 20-48 casi su 100000 abitanti maschi per anno, con la sola Cina che annovera circa il 50% di tutti gli HCC a livello mondiale; in Australia, Europa e negli Stati Uniti l'incidenza è invece inferiore a 10 casi su 100000¹⁻³. Queste variazioni possono essere spiegate ancora una volta da una differente esposizione ad alcuni fattori di rischio, come per esempio l'infezione del virus dell'epatite B (HBV) e C (HCV) o la contaminazione dei cibi con Aflatossina che sono più frequenti nei paesi in via di sviluppo.

All'interno di una stessa area geografica, peraltro, l'incidenza sembra correlare con variabili come razza, etnia, sesso, livello socio-economico e d'istruzione che influenzano la modalità di diffusione dei principali fattori eziologici ed in particolare l'età di acquisizione dell'infezione da virus epatitici⁵: 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 dell'HCC è intorno ai 50 anni, anche se non raramente la malattia si manifesta 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'epatocarcinoma si manifesta prevalentemente nella sesta e settima decade^{1,4,5}.

Per quanto riguarda l'Italia, dati recenti forniti dall'Associazione Italiana di Oncologia Medica (Aiom)⁶, hanno mostrato che l'epatocarcinoma rappresenta circa il 4% di tutti i nuovi casi nazionali di tumore ogni anno, con un rapporto maschi:femmine di 3:1. Dalla seconda metà degli Anni Novanta l'incidenza appare stabile, al netto dell'invecchiamento progressivo. Il Sud Italia è l'area a più alta incidenza: dai Registri Tumori è emerso che i

nuovi casi ogni anno sono circa il 17% in più rispetto al Nord nei maschi e il 65% in più nelle femmine; il Centro invece è la zona meno colpita, con un 39% in meno negli uomini e un 19% in meno nelle donne rispetto al Sud. La differenza può essere spiegata con il fatto che esiste nella nostra popolazione una diversa distribuzione dei virus dell'epatite B e dell'epatite C, maggiormente rappresentati al Sud. Spostando il discorso sulla prevalenza, nel 2011 si è calcolato che circa l'1% dei malati di tumore avesse una diagnosi di epatocarcinoma, con un rapporto maschi:femmine di circa 2,2:1; la maggior parte dei pazienti si trovava temporalmente in prossimità della diagnosi (il 48% entro i primi 2 anni e il 77% entro i primi 5 anni dal primo riscontro di malattia), in virtù della prognosi sfavorevole di questo tumore. Tra gli ultra settantacinquenni la proporzione dei malati era circa un 25% in più rispetto alla fascia d'età 60-74 e oltre il quintuplo di quella 45-59enni. L'epatocarcinoma si conferma anche in Italia una patologia a prognosi sfavorevole⁶: la sopravvivenza a 5 anni nella prima metà degli Anni 2000 è stata il 15% nei maschi e il 12% nelle femmine: rispetto ai quinquenni precedenti la speranza di vita appare migliorata, anche se nel contesto di una patologia a prognosi sfavorevole. La mortalità risulta più alta al Sud, rispetto al Nord e al Centro. Senza differenza invece in ambito nazionale, si può dire che la mortalità massima tocca il vertice nel primo anno dalla diagnosi, mentre la probabilità di sopravvivenza per ulteriori 5 anni aumenta in progressione nei pazienti vivi a 1, 3 e 5 anni rispettivamente del 20%, 37% e 48%.

Eziologia e fattori di rischio

Più dell'80% dei tumori insorge in un contesto di cirrosi epatica che da sola rappresenta il singolo fattore di rischio più importante⁷. Studi prospettici di coorte hanno dimostrato che nei pazienti affetti da cirrosi, l'HCC si sviluppa con un tasso annuale del 3%⁸ ed è la principale causa di morte⁹, indipendentemente dalla patologia che l'ha causata.

La proliferazione epatocellulare caratteristica della cirrosi pare sia il fattore più importante nella progressione verso l'HCC: infatti nei pazienti con cirrosi compensata il tasso di neoplasia è l'1% annuo in presenza di bassa proliferazione epatocellulare, mentre sale fino al 5% nei pazienti con elevato indice proliferativo⁹.

Dal punto di vista istologico, inoltre, la combinazione del marcato sovvertimento architetturale della struttura epatica tipico della cirrosi con la presenza di displasia a grandi cellule sembra avere un potere predittivo negativo in termini di prognosi, con maggior

probabilità di evoluzione in neoplasia: l'incidenza cumulativa di HCC a 3 anni infatti passa dal 72% al 17% a seconda che la cirrosi sia associata o meno ad alterazioni architetturali e strutturali epatocitarie significative e alla displasia¹⁰.

Alcol

Nei paesi occidentali l'abuso di alcol rappresenta la principale causa di epatopatia cronica e di cirrosi ed il singolo fattore di rischio più importante per l'HCC¹¹.

Non è certo che l'alcol agisca come diretto carcinogeno: probabilmente sono implicati meccanismi indirettamente 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 DNA¹².

Numerosi studi epidemiologici hanno peraltro dimostrato un'alta prevalenza di marker di HBV (16-70%) e di HCV (10-20%) negli alcolisti, con valori maggiori nei pazienti che sviluppano HCC¹³. L'alcol in questi casi potrebbe avere un'azione sinergica con l'infezione virale: pazienti con epatite cronica da HCV con una assunzione di alcol superiore a 40g/die (30g/die per le femmine) hanno un rischio aumentato di 2,2 volte di diventare cirrotici¹⁴.

Virus

Il rischio di sviluppare un HCC nei soggetti HBSAg+ è circa 100 volte superiore rispetto a quelli sieronegativi e in generale i portatori cronici di HBV hanno un rischio relativo di 5-15 volte superiore. Ciò è particolarmente vero nelle aree in cui l'infezione da HBV è endemica ed è trasmessa in modo verticale dalla madre al neonato, con conseguente decorso cronico in 7 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%^{12,14}.

Non si conoscono nei dettagli i meccanismi patogenetici con cui il virus dell'epatite B è in grado di promuovere la carcinogenesi: l'HBV è un virus con DNA a doppia elica, in grado di integrarsi nel DNA della cellula ospite e può avere pertanto un effetto mutageno, attraverso la modulazione dell'espressione genica (attivazione di oncogeni e/o disattivazione di oncosoppressori) o l'induzione di instabilità cromosomica.

L'infezione da virus dell'epatite C rappresenta il principale fattore di rischio per HCC nei paesi sviluppati: in particolare in Italia la prevalenza di epatocarcinoma HCV correlato raggiunge valori quasi del 2%, con un rischio relativo di circa 17 volte di evoluzione neoplastica nei pazienti HCV positivi rispetto ai controlli HCV negativi^{15,16}. Negli Stati Uniti si è rilevato un progressivo aumento dell'incidenza di HCC correlabile all'epatite C,

soprattutto nei maschi di razza bianca tra i 45 e i 55 anni, come 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^{16,17}. L'HCV è un virus a RNA, non in grado di integrarsi nel genoma delle cellule ospiti e non capace di azione mutagena diretta sul DNA come l'HBV: la sua oncogenicità è legata alla cirrosi epatica che induce nella maggior parte dei casi e al processo continuo di necrosi e rigenerazione cellulare che ne deriva e che rende le cellule in generale più suscettibili ad altri fattori di rischio e/o sostanze tossiche. Il rischio aumenta ulteriormente se si è affetti dal genotipo virale HCV 1b¹⁸ e se si associano altri fattori come l'infezione da HBV e/o HIV, l'abuso di alcol e la steatosi¹⁹.

Aflatossina

L'aflatossina è una tossina prodotta da funghi della famiglia Aspergillus. La contaminazione del cibo in alcune aree geografiche come la Cina e l'Africa del Sud è associata a un elevato rischio d'insorgenza di epatocarcinoma ed il rischio di sviluppare la malattia è maggiore nel caso in cui l'esposizione all'aflatossina sia associata all'infezione da HBV, condizione relativamente frequente in queste zone³.

In diversi modelli sperimentali l'aflatossina appare fortemente mutagena, probabilmente attraverso reazioni di epossidazione che stabiliscono legami covalenti con il DNA umano.

Steatoepatite non alcolica

E' ormai assodato che l'HCC può insorgere su cirrosi in pazienti affetti da steatoepatite non alcolica (NASH), generalmente in un contesto di sindrome metabolica (caratterizzata da obesità, diabete, insulino-resistenza ed elevati livelli sierici di trigliceridi)²⁰.

Emocromatosi

L'emocromatosi, patologia ereditaria caratterizzata da un eccessivo accumulo di ferro nei tessuti, è una condizione peculiare in cui l'epatocarcinoma può insorgere senza cirrosi; peraltro nei soggetti affetti, l'HCC è la principale causa di morte prematura²¹.

Altri fattori

Infine vanno annoverati tra i fattori di rischio anche l'esposizione al fumo, l'assunzione di contraccettivi orali e i fattori dietetici²²⁻²⁴: brevemente, per quanto riguarda il fumo, i risultati degli studi non sono univoci nello stabilire una correlazione con l'HCC, anche perché spesso i malati che fumano hanno anche altri fattori di rischio concomitanti, quali le infezioni virali o l'alcol. L'estrogeno ed il progesterone sono ormoni capaci di agire come induttori in tumori epatici in modelli animali, ma non è ancora chiaro il loro valore in tal

senso nell'uomo. Da ultimo, una dieta priva di antiossidanti (come il selenio o i retinoidi) e in generale poco ricca in vegetali sembrerebbe essere correlata a un maggior rischio di sviluppare HCC perché verrebbe meno il ruolo inibente di queste sostanze nella cancerogenesi epatica.

Screening e sorveglianza

Insorgendo prevalentemente in un contesto di cirrosi epatica e in categorie ben definibili di soggetti "a rischio", l'epatocarcinoma è una neoplasia che è, almeno in linea teorica, prevenibile e prevedibile⁶: grazie al miglioramento negli ultimi anni della gestione del paziente cirrotico, l'HCC è divenuto infatti la principale causa di decesso nei casi di cirrosi compensata. Per questo è raccomandata, nei cirrotici, una sorveglianza semestrale tramite ecografia (ultrasuoni, US) dell'addome superiore e, se questo non è possibile, attraverso i valori ematici di α -fetoproteina (AFP), in modo da poter effettuare una diagnosi precoce. I limiti dell'AFP risiedono nel fatto che, pur essendo un indicatore di rischio di sviluppo di epatocarcinoma, ha comunque una ridotta sensibilità per lesioni di piccole dimensioni e in soggetti con epatiti virali ad elevato tasso di replicazione può avere valori ematici anche notevoli, dando falsi positivi²⁵, con scarso rapporto costo/beneficio. Il suo utilizzo dovrebbe essere limitato, quindi, ai soli casi di impossibilità di sorveglianza US.

Diagnosi

Quando durante la sorveglianza mediante US viene osservata una lesione nodulare, ci si comporta in modo diverso in base alle dimensioni del nodulo, come codificato durante l'EASL (European Association for the Study of the Liver) Barcelona Conference del 2000, ratificato successivamente dalle Linee Guida AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) nel 2005 e raccomandato dalle Linee Guida Aiom del 2013^{6,26,27}.

I noduli di 1 cm o più vengono considerati altamente sospetti per HCC e dovrebbero essere indagati ulteriormente con tecniche di imaging (risonanza magnetica, RM e/o tomografia assiale computerizzata, TC) con mezzo di contrasto in modo da raggiungere una diagnosi non invasiva di carcinoma. Viene considerato criterio diagnostico di neoplasia un incremento del segnale contrastografico della lesione in fase arteriosa rispetto al parenchima circostante (ipervascolarizzazione arteriosa o "wash-in"), seguito da una

riduzione in fase venosa portale o tardiva, tale da far apparire il nodulo moderatamente meno contrastato del parenchima ("lavaggio precoce" o "wash-out"). In generale, i cambiamenti di vascolarizzazione vanno di pari passo con l'incremento dimensionale: molto più difficili da evidenziare per focolai tumorali < 1 cm, sono invece più facilmente dimostrabili per lesioni tra 2 e 3 cm (nel 75% circa dei casi) e in oltre il 90% dei tumori > 3 cm.

Date queste premesse, si può affermare che nei noduli con diametro superiore ai 2 cm che abbiano pattern di "wash-in" e "wash-out" tipici all'ecografia (US con contrasto a basso indice meccanico, CEUS), alla TC o alla RM e che siano supportati da livelli significativi di α -fetoproteina, la diagnosi di malignità può essere posta senza ulteriori indagini. Nel caso ci siano quadri più ambigui, caratterizzati per esempio da una lesione con pattern di enhancement contrastografico non dirimente, da livelli di AFP non sufficienti (< 400 ng/ml) o da un contesto di insorgenza non tipico (fegato non cirrotico), è indicato procedere all'indagine agobiopsica.

Nelle lesioni di dimensioni tra 1 e 2 cm, sarebbe opportuno un approccio diagnostico con due diverse tecniche imaging, per una valutazione accurata della fase di ipervascolarizzazione arteriosa e del "wash-out" venoso. Si sottolinea però che, anche in caso di assenza dei criteri radiologici tipici di neoplasia, le lesioni di questa categoria vengono comunque considerate altamente sospette e meritevoli quindi di ulteriore conferma diagnostica, attraverso l'agobiopsia. Se l'agobiopsia non è effettuabile o se da esito negativo, il paziente entra in regime di stretto follow-up US (3-6 mesi), con eventuale ripetizione delle indagini imaging contrastografiche e/o della biopsia. La necessità di ripetere la valutazione anatomopatologica deriva dalla consistente quota di falsi negativi, soprattutto legati a carcinomi ben differenziati, di difficile diagnosi su materiale citologico (30-40% dei casi)²¹.

Se i noduli infine sono di dimensioni < 1 cm (maligne in circa il 50% dei casi), viene indicato il monitoraggio della lesioni ogni 3-6 mesi, fino all'eventuale superamento della soglia di 1 cm.

Sistemi di stadiazione dell'epatocarcinoma e gestione del paziente

La maggior parte dei tumori insorge, come già detto, in pazienti cirrotici che presentano gradi diversi di compromissione del fegato. Pertanto la prognosi dei pazienti è condizionata

non solo dall'estensione / diffusione della neoplasia ma anche dalla residua funzione epatica⁶: diventa quindi fondamentale nella stadiazione dei malati avere un sistema che integri i due aspetti, anche per evitare che il trattamento del tumore comporti per esempio un danno della funzione epatica tale da compromettere i potenziali vantaggi che ne derivano o addirittura ridurre le aspettative di vita rispetto alla storia naturale del tumore stesso.

La funzione epatica "sintetica" viene misurata in modo efficace sostanzialmente valutando i livelli plasmatici di albumina, il tempo di protrombina o INR, i livelli di colesterolo e la colinesterasi. Informativi invece per quanto riguarda la funzione "metabolica / emuntoria" sono i livelli di bilirubina (soprattutto diretta) e l'ammoniemia. Da ultimo, bisogna anche tenere presente che il fegato si trova tra il distretto venoso spleno-mesenterico-portale e il sistema cavale: la cirrosi e l'ipertensione portale che ne deriva può generare quadri di splenomegalia con ipersplenismo (piastrinopenia, leucopenia, anemia), scompenso ascitico, varici esofago-gastriche con emorragia e encefalopatia porto-sistemica, sindrome epato-renale.

I sistemi di classificazione della gravità dell'insufficienza epatica prendono in considerazione in misura variabile i diversi parametri sopra citati: uno dei più utilizzati e pertanto incluso in quasi tutti i sistemi di stadiazione è la classificazione Child-Pugh che considera 5 variabili (bilirubina totale, INR tempo di protrombina, albumina, ascite clinica, encefalopatia epatica), ciascuna valutata con un punteggio da 1 a 3, per un totale complessivo che va da 5 a 15 punti, dove l'incremento del valore numerico corrisponde ad una maggiore gravità della situazione clinica. I vari punteggi sono distribuiti in tre classi, A, B e C (A: 5-6 punti; B: 7-9 punti; C: 10-15 punti)²⁸: la classe A comprende di solito pazienti con una buona funzione epatica, per i quali si calcola che la sopravvivenza cirrosi-dipendente a due anni sia intorno al 90%; tali pazienti non hanno significativa compromissione del performance status e sono teoricamente eleggibili per qualsiasi trattamento oncologico disponibile, valutato caso per caso. La classe C è costituita da malati gravemente compromessi, con una prognosi infausta a breve termine (mortalità a un anno del 50% e a due anni del 65%): per loro l'unica opzione è il trapianto (se in possesso di determinati requisiti), mentre nessun trattamento oncologico è indicato, perché qualsiasi forma di terapia farmacologica peggiorerebbe ulteriormente la funzione epatica, con un danno derivante maggiore dei potenziali benefici sul tumore che potrebbe portare.

La classe B definisce una condizione intermedia ed è particolarmente eterogenea: va valutato pertanto caso per caso poiché il rischio di compromettere ulteriormente il fegato è comunque molto elevato.

Il sistema di classificazione Child-Pugh è riassunto nella tabella 1.

Una volta appurata la situazione clinica del paziente in termini di funzionalità epatica residua e di performance status, bisogna ovviamente integrare queste informazioni con dati inerenti più specificamente il tumore⁶: nel mondo occidentale l'algoritmo a tal scopo più utilizzato è il BCLC (Barcelona Clinic for Liver Cancer)²⁹ che ha il vantaggio di fornire indicazioni prognostiche e terapeutiche contemporaneamente.

Tale sistema è riportato nella figura 1.

Vengono raggruppati i pazienti in 5 categorie, corrispondenti ad altrettanti stadi della malattia: molto precoce (0), precoce (A), intermedio (B), avanzato (C) e terminale (D).

Nello stadio 0 vengono inclusi pazienti con un nodulo neoplastico singolo, di dimensioni inferiori ai 2 cm, che abbiano una cirrosi compensata e senza ipertensione portale; per loro il trattamento di scelta è la resezione chirurgica, con una percentuale di sopravvivenza a 5 anni del 90% ed oltre.

Nello stadio successivo (A), i malati hanno una funzione epatica ancora preservata, a fronte di una neoplasia più avanzata localmente rispetto allo stadio 0, con noduli singoli o multipli (massimo 3), di dimensioni < 3 cm. Questi malati beneficiano di trattamenti curativi come la resezione, il trapianto di fegato e di procedure percutanee come l'ablazione del tumore mediante radiofrequenze o iniezione di etanolo. In questa categoria "precoce" i tassi di sopravvivenza sono circa del 50-70% a 5 anni.

I malati in stadio B hanno una HCC singolo > 5 cm o multifocale, senza evidenza di invasione vascolare o diffusione extraepatica e sono solitamente asintomatici, con classe Child-Pugh A e B; per questi pazienti l'indicazione è la chemioembolizzazione, che porta ad un aumento di sopravvivenza fino a 20 mesi³⁰.

Gli stadi più avanzati comprendono i malati sintomatici: nel gruppo C del BCLC rientrano i casi di HCC o con diffusione extraepatica, o con invasione vascolare o con entrambe le caratteristiche; la cura è di solito palliativa, anche con agenti terapeutici sperimentali, tra i quali il più diffuso è il Sorafenib, un inibitore multichinasico. La prognosi è pessima, con una sopravvivenza a 12 mesi del 50%. Nello stadio D i casi sono "terminali", con un'aspettativa di vita di circa 3 mesi: di solito sono pazienti con grave deterioramento fisico (Performance Status > 2) e/o Child-Pugh C. La terapia è di tipo sintomatico^{27,31-35}.

Trattamento

Diverse sono le modalità di trattamento del malato oncologico epatico. Vengono elencate qui di seguito le principali.

- 1) Trapianto di fegato: terapia peculiare, di scelta secondo BCLC per i pazienti in stadio A, consente sia di eradicare l'HCC sia di curare la cirrosi sottostante ed è teoricamente riservata ai pazienti che rispettino i cosiddetti "Criteri di Milano"³⁶, cioè che abbiano un nodulo singolo al massimo di 5 cm in assenza di invasione vascolare o noduli multipli in numero massimo di 3 e di dimensioni minori o uguali a 3 cm. La sopravvivenza, rispettando tali criteri, è del 75-80% a 5 anni. Negli ultimi anni alcuni centri hanno proposto un allargamento dei criteri di trapiantabilità⁶: in generale però si è visto che più ci si allontana dalle linee definite nei "Criteri di Milano", in termini di aumento del numero dei noduli o delle loro dimensioni, si riduce proporzionalmente la sopravvivenza dei pazienti³⁷ e almeno in Italia, le probabilità che un paziente cirrotico con HCC al di fuori dei "Criteri di Milano" venga trapiantato, anche in considerazione del pool limitato di organi disponibili, sono molto basse. Tra le varie proposte va comunque annoverato il tentativo del Metroticket Investigator Study Group che, utilizzando un database inclusivo di tutti i pazienti al di fuori degli standard di Milano, ha proposto il criterio "Up to Seven", cioè ha definito come potenzialmente trapiantabili tutti quei casi in cui numero dei noduli e diametro maggiore desse come risultato massimo 7: la sopravvivenza di questi malati a 5 anni dall'intervento è del 70%. Molti gruppi hanno studiato e tuttora stanno studiando la possibilità di portare pazienti con tumori o troppo numerosi o troppo grandi al trapianto, cercando di intervenire prima con trattamenti loco-regionali: quali siano le effettive possibilità di successo del "down-staging" resta però ancora da stabilire⁶. Il donatore può essere cadavere o vivente: il trapianto del lobo destro da fegato di un soggetto in vita rappresenta un'indicazione controversa, soprattutto in considerazione di una percentuale molto bassa, ma concreta, di decessi (1 caso ogni 200-500 interventi di donazione) e di una significativa incidenza di complicanze gravi e di invalidità permanente nel donatore^{38,39}. In Italia, a differenza del Giappone e in generale dell'Asia, il trapianto da vivente è effettuato in una stretta minoranza di casi e rappresenta lo 0,6% di tutti i trapianti per HCC⁴⁰.

- 2) Chirurgia resettiva. E' il trattamento di prima scelta dei pazienti in stadio 0 BCLC e nei casi di HCC che rientrino nei "Criteri di Milano" e che abbiano caratteristiche favorevoli alla chirurgia (assenza di comorbidità, assenza di ipertensione portale, normali valori di bilirubina), soprattutto con noduli monolobari o monosegmentari o di diametro maggiore di 3 cm; va presa in considerazione anche per quei casi di HCC unifocali che siano al di fuori degli standard milanesi per dimensioni (> 5 cm), se ovviamente tecnicamente possibile e se il fegato residuo del paziente possa garantire comunque un'adeguata funzione⁶. Le procedure utilizzate comprendono l'enucleazione, la resezione cuneiforme o anatomica, la segmentectomia, la subsegmentectomia, ma si calcola che solo il 15% circa dei pazienti sia operato in questo modo nei paesi Occidentali⁴¹.
- 3) Ablazione per Radiofrequenza (RFA, Radiofrequency Ablation). E' una delle metodiche transcutanee più utilizzate, superiore come efficacia all'iniezione di etanolo⁴². In casi selezionati è in grado di determinare la necrosi completa del tumore nel 98% dei malati. Di solito è il trattamento di scelta nei pazienti con singolo nodulo di 2 cm al massimo di diametro, situato in posizione che non comporti un rischio elevato di complicanze (noduli superficiali, vicino a grossi vasi o alla colecisti): rispetto alla resezione è gravata da costi diretti inferiori, degenza ridotta e tassi di morbidità e mortalità inferiori⁶. La RFA è indicata anche nei pazienti in attesa per il trapianto, per controllare la malattia.
- 4) Chemoembolizzazione transarteriosa (TACE, Transarterial Chemoembolisation)⁶. Prevede un'iniezione nell'arteria epatica di un farmaco citotossico (cisplatino o doxorubicina) associato ad un mezzo oleoso (lipiodol) che consenta il suo trasporto e successivo rilascio all'interno del tumore, seguiti da embolizzazione dei vasi arteriosi afferenti alla neoplasia con particelle di gelatina assorbibili (Gelfoam), in modo da produrre un danno tossico ed ischemico contemporaneamente. Viene di solito effettuata in casi di HCC multifocali che eccedano i "Criteri di Milano" per numero di noduli, ma è potenzialmente controindicata in una serie di casi ben precisi relativi a caratteristiche del paziente (Child-Pugh B, ascite, bilirubina sierica elevata, Performance Status di 1 o più, encefalopatia, creatinina elevata, varici esofagee a rischio di sanguinamento e trombosi portale), del tumore (dimensioni di oltre 10 cm, coinvolgimento multinodulare bilobare esteso, tumori infiltranti) e della procedura stessa (poco selettiva, lobare o bilobare). Va ricordato che la TACE può

indurre insufficienza epatica nel 2% dei casi. Recentemente è stata messa a punto e proposta una nuova tecnica, la TACE-DEB (TACE con Drug-Eluting Beads) nella quale si impiegano microsfele embolizzanti che hanno la capacità di sequestrare e trattenere il chemioterapico al loro interno e rilasciarlo poi nell'arco di una settimana in modo controllato. Più costosa della TACE, rappresenta una notevole innovazione tecnologica, ma gli studi fino ad ora effettuati non hanno mostrato un effettivo vantaggio nel suo utilizzo, se non in termini di minore tossicità sistemica (più come percezione individuale per altro che come dato oggettivo emerso dagli studi). La TACE può essere ripetuta ad intervalli regolari, per un massimo di 6 mesi, fino a risposta completa, ma va interrotta in caso risultati non evidenti dopo 2-3 tentativi.

- 5) Radioembolizzazione (SIRT, Selective Internal Radio Therapy): consiste nell'infusione in arteria epatica di lipiodol marcato con ^{131}I o con microsfele contenenti ^{90}Y . Esiste un unico studio randomizzato che ha dimostrato che la TACE e la SIRT producono risultati sovrapponibili in termini di risposta tumorale e sopravvivenza globale; la radioembolizzazione può però essere utilizzata anche in pazienti con trombosi della vena porta e in alcuni casi può addirittura portare a riduzione del trombo neoplastico. Ovviamente come metodica richiede un elevato livello di specializzazione degli operatori e delle strutture e non può essere effettuata in malati con shunting polmonare > 20% e di anomalie vascolari che possano portare ad irradiazione di organi cavi come stomaco ed intestino, per il rischio di ulcere e/o infiammazioni severe⁴³⁻⁴⁵.
- 6) Sorafenib: l'efficacia di questa piccola molecola, inibitore multitarget delle tirosin-kinasi, nel trattamento HCC è stata dimostrata in due studi randomizzati in fase III, lo studio SHARP⁴⁶ e lo studio Asia-Pacific⁴⁷. In entrambi gli studi sono stati arruolati pazienti non eleggibili per alcun trattamento loco-regionale (condizione verificata al momento della diagnosi o dopo fallimento di eventuali precedenti trattamenti), con buona funzionalità epatica (Child-Pugh A); lo studio SHARP è stato condotto in Europa, America, Israele, Australia, mentre quello Asia-Pacific in Asia Orientale (Cina, Taiwan e Corea), in una popolazione con una quota più significativa rispetto all'altro di casi HBV, un'età media più giovane, una maggior incidenza di Performance Status scaduto, un maggior numero di siti di malattia e in generale una prognosi peggiore. In entrambi i gruppi di popolazione la terapia con Sorafenib

ha determinato un aumento di sopravvivenza globale ed un allungamento del tempo di progressione di malattia (in termini assoluti, nello studio SHARP l'aumento di sopravvivenza è stato di circa 3 mesi, nello studio Asia-Pacific di circa 2); in nessuno dei due studi tuttavia si è potuto constatare un significativo beneficio nel rallentare lo scadimento del Performance Status. Sulla base dei risultati ottenuti, dall'Ottobre 2007, l'EMA (European Medicines Agency) ha approvato il trattamento con Sorafenib nei malati oncologici di HCC: in Italia è riservato ai pazienti in classe Child-Pugh A, quindi con buona funzione epatica, che abbiano fallito o che non siano eleggibili per trattamenti loco-regionali⁶. Non deve essere invece mai impiegato nei malati gravemente compromessi (Child-Pugh C), perché non ci sono evidenze allo stato attuale che ne supportino e giustifichino l'impiego. Per i casi intermedi, in cui la funzionalità epatica rientra nel Child-Pugh B, la terapia con Sorafenib non è raccomandata, perché il rapido peggioramento della funzione epatica condiziona un minor tempo di utilizzo del farmaco rispetto a quella media dei pazienti Child-Pugh A, con riduzione dei benefici derivanti: l'evidenza relativa all'efficacia del farmaco in questa categoria di pazienti è comunque ricavata dai risultati osservati nella minoranza di pazienti inseriti negli studi precedentemente citati ancora in fase II, dall'esiguo numero di casi inseriti in violazione al protocollo SHARP e da una serie di casistiche non controllate in lavori pubblicati successivamente e rimane quindi ancora da verificare con studi più mirati (non si sa per esempio se il verificarsi di eventi avversi sia legato all'uso di Sorafenib o al deteriorarsi della funzione epatica più rapido rispetto alla classe Child-Pugh A).

- 7) Altri trattamenti sistemici. Studi condotti in vitro e nell'animale avevano suggerito che i trattamenti ormonali potessero avere un ruolo nella cura dell'HCC⁶, ma tali spunti iniziali non sono poi stati confermati da successivi lavori che hanno testato farmaci come il Tamoxifene (antiestrogeno), il Nilutamide (antiandrogeno) e il Goserelin (analogo dell'LHRH), non riportando vantaggi in termini di sopravvivenza. L'impiego di farmaci chemioterapici in pazienti con compromissione epatica di vario grado risulta potenzialmente associato ad elevato rischio di tossicità; per altro l'epatocarcinoma può essere annoverato tra i tumori intrinsecamente poco sensibili alla chemioterapia tradizionale; allo stato attuale, secondo le linee guida Aiom 2013⁶, il trattamento con la chemioterapia in pazienti cirrotici portatori di HCC non è supportato da un'evidenza scientifica solida, anche se lo schema FOLFOX4,

recentemente proposto da uno studio Asiatico⁴⁸ può essere impiegato come palliativo nei casi di malati oncologici non cirrotici.

Malati non cirrotici⁶: per questa categoria di pazienti la tolleranza ai trattamenti loco-regionali è migliore, tanto che la chirurgica resettiva rappresenta, quando possibile, la terapia di scelta, anche per tumori di grosse dimensioni perché questi malati tollerano anche estese ablazioni di parenchima. Il trapianto può essere proposto anche in questi casi, se la malattia è estremamente estesa e non resecabile, ma non devono esistere invasioni vascolari e linfonodali; inoltre è un'ipotesi da considerare in caso di recidiva localizzata al fegato, non resecabile, comparsa a distanza di almeno un anno dal primo intervento: in questi casi, è possibile ottenere tassi di sopravvivenza infatti fino all'80% a 5 anni. Il Sorafenib è indicato nei casi di HCC avanzato e in caso di mancata risposta o progressione dopo la sua somministrazione; la chemioterapia può svolgere un ruolo palliativo.

Anatomia Patologica

La classificazione anatomopatologica dell'epatocarcinoma, come riportato nelle indicazioni WHO più recenti⁴⁹, si basa fondamentalmente su caratteri morfologici, non includendo variabili molecolari e/o cliniche e distingue due grandi categorie di neoplasie, l'HCC "classico" e il gruppo degli istotipi "speciali".

Il carcinoma "classico" è caratterizzato da cellule che ricordano gli epatociti normali, organizzati in filiere più spesse delle usuali lamine epatocitarie (pattern trabecolare o plate-like), in aggregati similghiandolari (pattern acinare o pseudoghiandolare) o in strutture solide (pattern compatto); la lesione non presenta spazi portali, essendo la vascolarizzazione derivata da arterie "spaiate", cioè neoformate e non connesse alla triade tipica portale (arteria, vena, dotto biliare). Inoltre, tipicamente i sinusoidi della neoplasia sono "capillarizzati", cioè a differenza di quanto accade nel fegato normale, essi modificano la loro natura, divenendo più simili a capillari, cosa apprezzabile immunohistochimicamente con l'acquisizione dell'espressione di marker strutturali specifici vascolari quali CD34 (Cluster of Differentiation 34), fattore VIII, laminina e collagene tipo IV. L'HCC classico presenta le seguenti variabili citologiche: pleomorfo (con cellule e nuclei estremamente diverse per forma, dimensioni e cromasia); a cellule chiare (caratterizzate

da abbondante glicogeno intracitoplasmatico); a cellule fusate; "fatty changes"; con produzione di bile (sotto forma di depositi in canalicoli dilatati o in lumi pseudogliandolari); con corpi ialini (aggregati proteici intracitoplasmatici eosinofili); con "pale bodies" (aggregati proteici intracitoplasmatici blandamente eosinofili); con inclusioni "ground glass" (tipici dei pazienti HBV positivi).

Da un punto di vista immunoistochimico, l'HCC è positivo per le cheratine 8 (CK8) e 18 (CK18), negativo per le cheratine 19 (CK19) e 20 (CK20) e per l'EMA (Epithelial Membrane Antigen). Anticorpi come il CD10 (Cluster of Differentiation 10) e il CEA (Carcinoembryonic Antigen) marcano il versante apicale luminale delle cellule, con un pattern di tipo canalicolare. Positivo in più del 90% dei carcinomi è invece l'anticorpo HepPar1 (Hepatocyte Marker 1), particolarmente nelle forme più differenziate.

Il gruppo degli HCC "speciali" comprende i seguenti istotipi: fibrolamellare, scirroso, indifferenziato, linfoepitelioma-like e sarcomatoide. Fra essi merita menzione il carcinoma fibrolamellare: esso è una forma peculiare di neoplasia maligna tipica dei bambini e dell'età giovanile e del fegato non cirrotico; ha caratteri distintivi morfologici e probabilmente anche molecolari, presentando tipicamente una cicatrice centrale in $\frac{3}{4}$ dei casi, fibrosi di tipo lamellare, crescita con margini di tipo espansivo e una popolazione neoplastica di larghe cellule poligonali con nucleo vescicoloso, nucleolato (simil-oncocitarie). Per quanto riguarda le altre varianti "speciali", portano nel nome la loro peculiarità: sono caratterizzate rispettivamente da una marcata fibrosi che si snoda lungo i sinusoidi associata da un certo grado di atrofia cellulare (HCC scirroso); da una cellularità talmente atipica e sdifferenziata che solo la clinica e/o l'immunoistochimica permettono di riconoscere l'origine epatica del tumore (HCC indifferenziato); da una componente linfocitaria molto ben rappresentata e da una struttura simil-sinciziale dell'epitelio (HCC linfoepitelioma-like); da cellule fusate simil-sarcoma (HCC sarcomatoide). Sono tutte varianti rare, non di frequente riscontro nella pratica clinica e patologica routinaria.

Il grading dell'HCC è quadripartito, secondo quanto proposto da Edmonson e Steiner, classicamente diviso in G1, G2, G3 per le forme rispettivamente bene, moderatamente e scarsamente differenziate, con l'aggiunta della classe G4 per i casi indifferenziati. Va comunque sottolineato che gli epatocarcinomi variano notevolmente per morfologia e differenziazione all'interno dei singoli noduli, anche se di piccole dimensioni, con la particolarità che le zone meno differenziate si trovano spesso all'interno della lesione mentre quelle più a basso grado sono all'esterno, dove vengono progressivamente

confinante e sostituite dalla componente più ad alto grado che sta espandendosi dal centro verso la periferia (fenomeno della crescita neoplastica del "nodulo in nodulo").

Da ultimo va menzionata una categoria peculiare di HCC, il cosiddetto "early HCC" (riportato in letteratura anche come "vaguely nodular small HCC" e "small HCC with indistinct margins"). E' una lesione per definizione con un diametro < 2 cm e limiti indistinti e sfumati, difficile da riconoscere sia macro- sia microscopicamente: è caratterizzata da cellularità aumentata (densità almeno il doppio rispetto al parenchima circostante), cellule con alterato rapporto nucleo / citoplasma, pattern di crescita trabecolare irregolare, pseudoghiandole, fatty changes, arteriole spaiate e tratti portalari intratumorali. La diagnosi differenziale si pone essenzialmente con un nodulo displastico e non è sempre di facile approccio: la presenza di infiltrazione stromale e l'assenza di significativa reazione dutturale periferica (documentabile con l'immunocolorazione per le cheratine 7 (CK7) e per CK19) sono i tratti distintivi che fanno propendere per una neoplasia piuttosto che per una displasia. Non tutti gli HCC di piccole dimensioni sono "early HCC": accanto a lesioni con le caratteristiche istologiche sopra riportate, ci sono anche epatocarcinomi nodulari ben definiti di dimensioni ridotte. L'imaging sottolinea questa differenza: gli early HCC sono tipicamente iso- o ipovascolarizzati, mentre gli HCC nodulari in stadio precoce sono già ipervascolarizzati in fase arteriosa e ipovascolarizzati in quella venosa, data la differenza nel supporto vascolare delle due lesioni (vasi portalari presenti con numero variabile di arteriole spaiate nei primi e assenza di vasi portalari con elevato numero di arteriole spaiate nei secondi).

Basi genetiche e modelli interpretativi dell'HCC

Come in precedenza accennato, la cancerogenesi epatica è strettamente correlata alla presenza di una patologia cronica del fegato che, a prescindere dalla sua eziologia comporta continui cicli di distruzione-rigenerazione cellulare: tali cicli costituiscono il fattore di iniziazione più frequente ed unificante della tumorigenesi epatica⁵⁰. I noduli cirrotici sono il "cuore" di tale proliferazione e sono quindi visti come il punto di partenza di un processo cancerogenetico multistep, cui partecipano molteplici eventi molecolari responsabili del passaggio da nodulo cirrotico a nodulo displastico, HCC precoce, HCC franco e malattia neoplastica disseminata⁵¹.

Le basi molecolari di tale progressione neoplastica sono solo parzialmente note ed associate nello sviluppo e nella progressione della malattia ad eventi molteplici e differenti, sia genetici quali perdita di eterozigosi (Loss of Hetrozygosity, LOH), perdita e guadagno di regioni cromosomiche, instabilità microsatellitare, mutazioni genetiche e profili di trascrizione aberranti⁵², sia epigenetici, come l'iperpressione di fattori di crescita (Trasforming Growth Factor α o TGF α ; Insuline-like Growth Factor 2 o IGF-2) o la metilazione di promotori⁴⁹.

I geni coinvolti sono numerosi⁵²: mutazioni genetiche ed epigenetiche sono state descritte a carico di TP53 (codificante per la proteina p53), CTNNB1 (β -Catenina), geni della famiglia ErbB (recettori Her1, Her2, Her3, Her4), il proto-oncogene MET (Receptor Tyrosine Kinase, RTK) ed il suo ligando HGF (Hepatocyte Growth Factor), CDKN2A (p16 o INK4a), CDH1 (E-caderina), MT-CO2 (Cytochrome c Oxidase subunit II, COX2) per citarne alcuni; studi di ibridazione genomica comparativa (Comparative Genomic Hybridization, CGH) hanno evidenziato alterazioni genomiche ricorrenti come acquisizioni genomiche in 1q, 6p, 8q, 11q e 17q e perdite cromosomiche in 1p, 4q, 8p, 13q e 17p.

Tutti questi geni sono inseriti in diverse vie di trasduzione del segnale a livello intracellulare (figura 2)⁵², che possono essere riassunte in tre vie principali:

- vie embrionali e di differenziazione, come Wnt (Wingless) / β -catenina ed Hedgehog;
- vie legate a recettori tirosin-chinasici coinvolgenti mediatori di segnale come Ras (Rat Sarcoma) / MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase), P13K (Phosphoinositide3-Kinase) / AKT (o PKB, Protein Kinase B), Jak (Janus Kinase) / Stat (Signal Transducer and Activator of Transcription);
- via di p53, uno dei maggiori controllori del ciclo cellulare e il piú noto ormai degli oncosoppressori.

Recentemente uno studio di "whole genome sequencing" su quasi un centinaio di epatocarcinomi ha identificato nella β -catenina l'oncogene alterato piú frequentemente (quasi 16% dei casi), in p53 l'oncosoppressore piú diffusamente mutato (35% circa dei casi) e nelle vie di trasduzione del segnale di Wnt / β -catenina e JAK / STAT i maggiori "oncogenic drivers" (coinvolti rispettivamente nel 62% e nel 45% dei casi analizzati)⁵³.

Il gene CTNNB1 codifica per la β -catenina, una proteina che normalmente si trova a livello delle giunzioni aderenti della membrana cellulare, dove lega l'E-caderina e la fissa al citoscheletro; ha quindi un ruolo nell'interazione intercellulare e nel mantenimento della

forma della cellula stessa. Il suo turn-over prevede l'intervento di un complesso proteico di cui fanno parte l'axina, la proteina APC (Adenomatous Polyposis Coli) e le chinasi CK-1 (Casein Kinase 1) e GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase B): questo complesso fosforila la β -catenina su specifici residui di serina e di treonina, in modo che venga ubiquitinizzata e poi degradata con un meccanismo proteasoma-mediato. La sua forma libera a livello del citosol è strettamente regolata: infatti, se non vincolata al citoscheletro e non ubiquitinizzata, la β -catenina è in grado di traslocare nel nucleo cellulare dove funge da co-attivatore del complesso di trascrizione TCF-1 (T-cell Factor-1) / LEF (Lymphoid Enhancer-binding Factor 1), inducendo oncogeni come CCND1 (codificante per la Ciclina D1), MYC (Myc) e BIRCC5 (Baculoviral IAP Repeat Containing 5)^{49,54}, legati alla proliferazione cellulare, a meccanismi anti-apoptotici e all'angiogenesi. La sua attivazione in tal senso è dipendente da Wnt: quando Wnt infatti si lega ai suoi recettori di superficie (Frizzeld e LRP5/6 – Low Density Lipoprotein Receptor 5/6), porta ad un blocco della fosforilazione GSK3 β -mediata, bloccando quindi l'ubiquitinizzazione della β -catenina che si accumula nel citoplasma ed è libera di passare nel nucleo (figura 3). La via Wnt / β -catenina è frequentemente alterata nell'epatocarcinoma (nel 62% circa dei casi analizzati da Kan e colleghi⁵³), di solito per mutazioni a carico di CTNNB1 (localizzate prevalentemente a livello dell'esone 3, in corrispondenza del sito di fosforilazione della GSK3 β)⁵² o dell'axina1, per silenziamento epigenetico di CDH1 (E-caderina) o per iperespressione del recettore Frizzeld⁴⁹.

Le vie di segnale dipendenti da p53 e Rb1 (Retinoblastoma 1)⁴⁹, elementi chiave nel controllo del ciclo cellulare, sono anch'esse spesso modificate nell'HCC, la prima soprattutto nei casi di carcinogenesi da esposizione all'aflatossina B1, la seconda per mutazioni, perdita o silenziamento di RB1 (Rb1) o CDKN2A (p16) o per ridotta espressione di altri geni come CDKN1A (p21). Il pathway legato a PI3K / Akt è altrettanto comunemente mutato, solitamente per attivazione costitutiva di PI3K dovuta alla perdita di funzione dell'oncosoppressore PTEN (Phosphatase and Tensin Omolg). Anche KRAS (KRas), analogamente a quanto accade nel carcinoma del colon, è iperattivato nell'HCC: di solito però in casi con esposizione a vinil-cloride⁴⁹.

Numerosi tentativi sono stati fatti per integrare i dati biologici molecolari con le variabili epidemiologiche e cliniche, allo scopo di identificare gruppi omogenei di neoplasia, per

caratteri genetici e non genetici, con comportamento analogo in termini di decorso e sopravvivenza.

Un primo modello interpretativo⁵⁵ si basava sulla suddivisione degli HCC in due grandi categorie, la prima comprendente tumori con stabilità cromosomica, mutazioni di CTNNB1, perdita di 8p ed attivazione della via Wnt, grandi dimensioni e negativi per infezione da HBV. Nella seconda categoria erano invece raggruppati gli HCC con instabilità cromosomica, mutazioni di p53 ed Axina1, numerose e frequenti perdite di eterozigotà su 1p, 4q, 6q, 9p, 13q, 16p, 16q, 17p, infezione da HBV, scarsa differenziazione neoplastica e scarsa prognosi.

Questa distinzione in due grandi gruppi è stata validata successivamente da modelli su topi transgenici⁵⁶ e da studi di DNA microarray⁵⁷.

Alcuni anni più tardi il modello a due categorie è stato ampliato da Boyault⁵⁸ con l'introduzione e l'integrazione di ulteriori dati epidemiologici, clinici e molecolari, con una meta-analisi più globale, in modo da identificare nel complesso 6 gruppi di neoplasia, tutti il più omogenei possibili e tutti potenzialmente curabili nello stesso modo. Si veda a tal proposito la figura 4. I primi tre gruppi (G1, G2, G3) in base alla proposta di Boyault sono caratterizzati da instabilità cromosomica, con alcune LOH / mutazioni geniche ripetute e altre più specifiche e da incremento dell'attività mitotica del ciclo cellulare; essi si distinguono tra loro in base alla presenza di infezione da HBV, riscontrabile in G1 e G2 (anche se rispettivamente con bassi e alti livelli di copie genomiche virali) e assente in G3 e per l'attivazione della via di trasduzione del segnale AKT, documentabile anch'essa in G1 e G2 e non in G3, che invece presenta alterazioni a carico del sistema del poro nucleare. Anche l'epidemiologia e la clinica hanno un ruolo in questo schema a 6: infatti gli HCC G1 sono tipici di giovani donne africane, con elevata AFP nel sangue, mentre i G2 sono correlati maggiormente all'emocromatosi. Gli ulteriori 3 gruppi (G4, G5 e G6) sono invece caratterizzati da instabilità cromosomica, senza peculiari LOH: la categoria G4 è ancora poco definita, presentando come unica caratteristica quella di avere mutazioni a carico del gene TCF1; più circoscritti sono invece i gruppi G4 e G5, entrambi con mutazioni a carico della β -catenina ed attivazione del sistema di trasduzione del segnale Wnt: sembrano differire per meccanismi biologici supposti come "environment" in cui si è sviluppato il tumore che chiamano in causa stress e fattori immunologici per gli HCC di G5 e metabolismo aminoacidico per G6. Le citate vie di Wnt (G5 e G6) e di AKT (G1 e G2) costituiscono potenziali bersagli nell'ottica di una terapia molecolare.

Una meta-analisi di una serie di nove studi di "genome profiling" dell'HCC⁵⁹ ha recentemente permesso di identificare tre sottoclassi tumorali, S1, S2 e S3, ognuna delle quali con profili genetici distinti, validati anche ripetuti in altri studi analoghi⁵³. S1 e S2 identificano gruppi di neoplasia con alti livelli di espressione di geni coinvolti nel controllo del ciclo e della proliferazione cellulare: nei carcinomi S1 si ha anche elevata espressione anche dei geni coinvolti nella risposta immune e nell'angiogenesi, mentre gli S2 invece mostrano la più alta frequenza di mutazioni di p53 e i livelli assai marcati di AFP ematica. In una parte di questi HCC (S1 e S2) è stata dimostrata infine l'integrazione del genoma con il virus dell'epatite B (in un locus specifico, KMT2B). Di solito i tumori S1 e S2 sono di dimensioni maggiori e con elevata probabilità di recidivare. S3 categorizza invece una serie di HCC bene o moderatamente differenziati con un profilo di espressione genica che riflette quello del normale tessuto epatico ed una frequenza relativamente alta di mutazioni di CTNNB1 e di JAK1. Nei casi associati a HBV, l'integrazione del genoma è in un diverso locus genico rispetto alle classi precedenti (TERT). Questi epatocarcinomi hanno solitamente una buona sopravvivenza.

Questi approcci "globali" clinico - molecolari all'epatocarcinoma, più recentemente ampliati da ulteriori studi di DNA micro-array e altre "high-throughput technologies" con un'analisi trascrizionale globale delle cellule⁵⁷, hanno permesso di perfezionare la diagnosi e selezionare specifici biomarkers per la diagnosi precoce, dare informazioni sulla prognosi e sulla risposta al trattamento dell'HCC, identificare geni "up-regulated" nell'epatocarcinoma come potenziali target terapeutici, integrare i dati istologici per migliorare la diagnosi differenziale e fornire le basi per creare una nuova classificazione molecolare degli HCC con suddivisione in sottogruppi omogenei di malattia dal punto di vista biologico e clinico.

SCOPO DELLO STUDIO

Un recente lavoro⁶⁰ ha messo in evidenza che l'espressione del marcatore immunoistochimico Glutamina Sintasi (GS) è associata a tumori epatocellulari con morfologia caratteristica e con sopravvivenza migliore rispetto ad altri HCC dopo trattamento percutaneo con radiofrequenza. La GS è un indicatore indiretto dell'attivazione della via di segnale Wnt che identifica, in base anche a quanto precedentemente detto, un'importante meccanismo di carcinogenesi con caratteristici tratti epidemiologici, molecolari e di profilo d'espressione genica^{58,59}. I tumori GS positivi tendono ad avere dimensioni maggiori ed un aspetto al microscopio riconoscibile: sono infatti organizzati in pseudoacini, con nuclei di basso grado, modificazioni idropiche, presenza di bile, senza evidenza di steatosi e fibrosi.

Sulla scia di queste importanti osservazioni si sono delineati il razionale di questo studio e le sue finalità, qui di seguito riportate:

- caratterizzare istologicamente una serie chirurgica peculiare (espianti ed epatectomie) di HCC per definire entità morfologiche specifiche, con particolare attenzione agli aspetti suggestivi per attivazione molecolare del pathway Wnt;
- saggiare la validità della GS come marker immunoistochimico dell'attivazione Wnt;
- verificare le correlazioni clinico - patologiche ed in particolare la sopravvivenza del / dei gruppi di epatocarcinoma così identificati.

L'identificazione di gruppi di HCC diversi potrebbe migliorare la comprensione dell'eterogeneità di questo tipo di patologia neoplastica, stratificare meglio la prognosi, la predizione di risposta alla terapia e rendere più efficace la divisione dei pazienti in classi di rischio⁶⁰. L'approccio morfologico ed immunoistochimico da soli, considerati come epifenomeno di una realtà genetica estremamente complessa ma in parte riconducibile a categorie definite, sono due metodiche a basso costo e riproducibili, diffuse in quasi tutte le Anatomie Patologiche, che potrebbero permettere questo.

Avere a disposizione una casistica costituita prevalentemente da trapiantati è l'aspetto peculiare dello studio: si tratta di pazienti selezionati in partenza come eleggibili ad un tale trattamento, quindi in stadi non avanzati di malattia (secondo il BCLC in classe A), guaribili dopo trapianto sia dalla neoplasia che dalla patologia epatica sottostante e dalla cirrosi, seguiti necessariamente nel tempo da un'equipe specializzata e con un follow-up anche a lungo termine.

MATERIALI E METODI

Per questo studio è stata esaminata in modo retrospettivo una serie consecutiva di resezioni epatiche ed espianti di fegato fornita dall'Azienda Ospedaliera (A.O.) Papa Giovanni XXIII di Bergamo, risalente ad un periodo compreso tra il dicembre del 1998 e il gennaio del 2009, per un totale iniziale complessivo di 102 pazienti (86 espianti e 16 epatectomie).

Studio istologico

La valutazione al microscopio dei casi è stata effettuata sui preparati istologici allestiti al tempo della diagnosi presso L'Anatomia Patologica dell'A.O. Papa Giovanni XXIII, dopo fissazione in formalina tamponata al 10%, processazione standard ed inclusione in paraffina. Ai fini dello studio sono state esaminate inizialmente le sezioni originali in Ematossilina & Eosina; tra i vari vetrini osservati si sono scelti i più rappresentativi della lesione neoplastica, per i quali si sono recuperati i relativi inclusi in paraffina, da cui ricavare sezioni in bianco per le indagini immunohistochimiche. La stessa procedura di recupero del materiale in paraffina è stata utilizzata per riallestire sezioni in Ematossilina & Eosina, là dove le originali fossero ormai degradate. In questa fase si è proceduto ad eliminare gli interventi per patologia neoplastica non carcinomatosa (es. epatoblastoma) e quindi tutti i casi di noduli displastici e/o i casi dubbi, per un totale definitivo di HCC pari a 98 noduli, distribuiti su 84 pazienti (n: 68 malati espiantati e n: 16 epatectomizzati); il totale dei noduli ristretto ai soli espianti è stato di 79.

Ognuno di questi noduli neoplastici è stato valutato con lettura consensuale di due anatomopatologi, di cui uno esperto in patologia epatica, in base ad una serie predefinita di variabili istologiche, architetturali e citologiche, qui di seguito riportate: struttura mono- o multinodulare del tumore, presenza o meno di capsula neoplastica, di fibrosi e/o cicatrici e di lesioni preneoplastiche precoci, pattern di crescita, struttura della proliferazione, invasione vascolare, presenza di satelliti, aspetto dei sinusoidi, necrosi, reazione infiammatoria, differenziazione pseudoacinare, dimensioni delle cellule, aspetto dei citoplasmici, steatosi e ballooning, inclusi citoplasmatici, presenza di ialina di Mallory, produzione di bile, pleomorfismo e grado nucleare e rapporto nucleo/citoplasma. Per una

più precisa descrizione di tali variabili si rimanda al capitolo dei risultati ed alla tabella 2. Alcuni esempi della morfologia sopra citata sono riportati nella figura 5.

Tutti i dati ricavati sono stati tabulati in un foglio elettronico. Il tessuto non neoplastico è stato valutato, ove possibile, nei vari campioni, indipendentemente dall'eziologia dell'epatopatia, in base al riscontro di lesioni necro-infiammatorie, alla fibrosi e alle lesioni metaboliche^{61,62}.

Studio immunoistochimico

Sulle inclusioni più rappresentative dei vari noduli tumorali sono state allestite sezioni di tessuto dello spessore di circa 3-4 μm , raccolte poi su vetrini silanizzati ed utilizzate per lo studio immunoistochimico. La reattività immunologica è stata testata per i seguenti anticorpi primari: β -catenina (CTNBB1) [clone 14/beta-catenin; produttore BD Trasdution Laboratories; diluizione 1:1000] e Glutamina Sintasi (GS) [clone 6/glutamine synthetase; produttore BD Trasdution Laboratories; diluizione 1:10000].

Le reazioni immunoistochimiche sono state eseguite secondo procedure standardizzate: 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 d'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; il sistema di rivelazione utilizzato ha previsto l'uso di un sistema polimerico (DAKO, ADVANCE-HRP) coniugato a perossidasi e successivamente con 3,3' diaminobenzidina (DAB). I preparati così ottenuti sono stati controcolorati con ematossilina.

Per ognuno dei due anticorpi sono stati necessariamente stabiliti dei criteri di valutazione, che vengono qui di seguito riportati:

- β -catenina: è stata considerata significativa se nucleare (e non di membrana o citoplasmatica) e definita positiva se presente in più del 5% dei nuclei;
- GS: è stata considerata significativa se citoplasmatica e definita positiva se espressa in modo intenso ed uniforme da tutte le cellule (positività diffusa intensa) o se espressa intensamente ma a "mosaico", cioè con cellule molto positive commiste ad altre negative (positività diffusa mista); sono invece stati considerati negativi i casi con espressione debole pur in tutte le cellule neoplastiche (positività debole

diffusa), zonale (cioè debole e presente solo in una porzione di cellule neoplastiche) o assente.

Dati clinici

I dati clinici sono stati forniti dall'A.O. di Bergamo, dall'equipe del Centro Trapianti della Chirurgia Generale III che si occupa del follow-up dei malati trapiantati ed in parte anche dal Servizio dell'Anatomia Patologica: dati più completi sono stati resi disponibili per i pazienti espiantati, mentre informazioni assai più limitate sono state ricavate per i casi di epatectomia. Oltre ai dati anagrafici (età alla diagnosi di malattia, sesso disponibili per tutti) è stato possibile ottenere informazioni riguardo all'eziologia dell'epatopatia di base (n: 72 pazienti; 86% dei casi), sullo stato di funzionalità epatica al momento dell'intervento espressa come classe di Child-Pugh (n: 64; 76% dei casi, solo espianti), sullo stadio TNM postoperatorio (n: 68; 81% dei casi, solo espianti), sul tempo di follow-up dei vari pazienti (n: 68; 81% dei casi, solo espianti) e sulle cause di morte (n: 24; 35% dei casi, solo espianti; 100% dei deceduti).

Analisi statistica

Le variabili quantitative sono state espresse come media e deviazione standard o, in assenza di una distribuzione normale, come mediane, range e interquartile ranger (IQR). Numeri e percentuali sono stati utilizzati per le variabili qualitative. Le variabili categoriche sono state confrontate mediante test chi-quadrato su tabelle di contingenza. Le variabili continue sono state confrontate con il test T di Student.

La mortalità è stata considerata come tumore-specifica se causata da recidiva neoplastica, in base ai dati clinici forniti. Nel calcolo della mortalità totale sono stati considerati rischi competitori ed esclusi i pazienti deceduti per altra causa, epatica od extraepatica^{63,64}.

L'analisi della sopravvivenza è stata condotta mediante curve di Kaplan-Meier; la significatività nella differenza fra due curve è stata calcolata con test dei ranghi logaritmici (logrank test). La significatività statistica è stata considerata per $p < 0,05$; tutti i test sono a due code.

RISULTATI

Caratteristiche cliniche

I principali parametri clinici degli 84 pazienti (98 noduli) della serie e dei 68 espunti (79 noduli) in essa compresi sono dettagliati nelle tabelle 3 e 4. Rispetto a tali parametri in generale non sono emerse peculiari diversità tra i casi di neoplasie positivi per GS all'immunoistochimica (GS+) e tutti gli altri HCC (GS- o non valutabili). Si osservano tuttavia quattro aspetti con una differenza significativa dal punto di vista statistico. Il primo è l'aumento della prevalenza nel sesso maschile dei noduli GS+ rispetto agli altri HCC, evidente sia nella serie completa dei casi (85% nei maschi; 92% nei GS+ vs 82% negli altri HCC; $p < 0,05$) sia in quella ristretta ai soli espunti (85% nei maschi; 94% nei GS+ vs. 82 % negli altri HCC; $p < 0,05$). Il secondo è la tendenza a formare noduli singoli dei GS+ (62% dei GS+ vs 47% degli altri HCC della serie completa; 65% dei GS+ vs 47% degli altri HCC degli espunti; $p < 0,05$). Il terzo riguarda la classe di funzionalità epatica Child-Pugh (disponibile solo per gli espunti): la somma delle classi B e C passa dal 59% dei GS+ all'87% degli altri HCC ($p < 0,05$). A questi dati infine va aggiunta l'eziologia dell'epatopatia sottostante: sembrerebbe esserci una maggior associazione con il virus dell'epatite C nei casi GS+, in particolare nella serie completa (46% dei GS+ vs. 42% negli altri HCC; $p < 0,05$) e una maggior frequenza dell'HBV negli altri HCC (25% dei GS+ vs. 31% degli altri; $p < 0,05$). Quest'ultimo parametro va però guardato in modo prudente, perché i dati clinici incompleti riguardo alla genesi dell'epatopatia incidono nel 15% dei noduli e ciò potrebbe inficiare il risultato.

Va segnalata inoltre la prevalenza dello stadio TNM T1 nei casi espuntati GS+ rispetto agli altri HCC (47% vs. 29%; $p < 0,05$; tabella 4).

La maggior parte degli HCC sono infine insorti in un contesto di cirrosi: essa infatti è documentabile nell'87% degli HCC totali e nel 76% degli espuntati, in linea con quanto presente in letteratura e già riportato in precedenza.

Il follow-up è stato valutato solo per il gruppo degli espunti: all'interno di questa categoria (68 pazienti) si contano 24 decessi, dei quali 12 (50%) per neoplasia epatica.

Caratteristiche morfologiche

La maggior parte delle variabili morfologiche analizzate sono risultate statisticamente diverse negli HCC GS+ rispetto agli altri HCC. Sono state prese in considerazione:

- la nodularità (intesa come multi- o mononodularità);
- la presenza o meno di una capsula fibrosa a circondare il tumore, indipendente dallo spessore della stessa;
- la presenza o meno di una componente periferica morfologicamente di tipo "epatocarcinoma early";
- il pattern di crescita della neoplasia ("early", espansivo con margini tondeggianti di tipo "pushing" o infiltrativo);
- l'architettura complessiva in micro- o macrotrabecole, definita in funzione dello spessore delle lamine epatocitarie che solitamente aumenta negli HCC più sdifferenziati, considerando anche i casi in cui si potevano riconoscere entrambi i modelli (micro-macrotrabecolare);
- la presenza di invasione vascolare;
- la presenza di noduli satelliti limitrofi al principale;
- la conformazione dei sinusoidi (aperti o chiusi);
- la presenza o assenza di necrosi (comprendendo nella categoria anche la necrosi su base iatrogena);
- la flogosi linfoplasmacellulare d'accompagnamento (categorizzata in base alla presenza e all'intensità crescente con un punteggio da 0 a 4);
- la presenza o meno di strutture pseudoacinari (cioè pseudoghiandole derivate da canalicoli biliari anomali che si formano tra le cellule neoplastiche, alla cui presenza è stato dato un punteggio crescente da 0 a 2);
- la tipologia eventuale della fibrosi d'accompagnamento (assente, organizzata in bande collagene, di tipo desmoplastico o prevalente a livello sinusoidale);
- le dimensioni delle cellule (piccole, medie o grandi);
- la qualità dei citoplasmi (chiarificati, eosinofili, idropici, variabile o non specifica NAS);
- la presenza o meno di steatosi e il grado (assente, lieve, moderata o severa);
- la degenerazione balloniforme delle cellule;

- la presenza o meno di inclusi citoplasmatici e di aggregati di filamenti intermedi o "ialina di Mallory" (variabili a cui è stato attribuito un punteggio crescente da 0 a 2 in funzione del loro riscontro e della loro intensità);
- la presenza o meno di bile;
- il grado nucleare (classicamente tripartito, da G1 a G3);
- il pleomorfismo nucleare ed il rapporto nucleo/citoplasma (variabili cui è stato attribuito un punteggio di 1 o 2).

I confronti sono dettagliati nelle tabelle 5 e 6.

Tra le caratteristiche architetture sono risultate significative la presenza di una capsula peritumorale (79% nei GS+ e 59% negli altri HCC della serie complessiva; 76% nei GS+ e 53% negli altri HCC della serie degli espianti; $p < 0,05$); il pattern di crescita espansivo (84% vs. 57%; 76% vs. 52%; $p < 0,05$); la struttura microtrabecolare (50% vs. 28%; 52% vs. 29%; $p < 0,05$); l'assenza di fibrosi (92% vs. 69%; 88% vs. 65%; $p < 0,05$); il pattern sinusoidale "aperto" (92% vs. 49%; 88% vs. 44%; $p < 0,05$); la struttura pseudoacinare (54% vs. 11%; 47% vs. 10%; $p < 0,05$); l'assenza di flogosi linfo-plasmacellulare (79% vs. 65%; 82% vs. 63%; $p < 0,05$); la presenza di earlyHCC alla periferia della lesione (38% vs. 28%; 41% vs. 31%; $p < 0,05$), l'assenza di invasione vascolare (38% vs. 47%; 29% vs. 45%; $p < 0,05$).

Le principali caratteristiche citologiche significative sono: cellule di medie e piccole dimensioni (71% nei GS+ vs. 50% negli altri HCC della serie complessiva; 71% nei GS+ vs. 47% negli altri HCC della serie degli espianti; $p < 0,05$); citoplasmici con aspetti ossifili (21% vs. 1%; 29% vs. 2%; $p < 0,05$) ed idropici (25% vs. 15% nella serie complessiva; $p < 0,05$); l'assenza di steatosi (92% vs. 70%; 94% vs. 66%; $p < 0,05$); la presenza di bile (88% vs. 43%; 88% vs. 42%; $p < 0,05$); l'assenza di degenerazione balloniforme (92% vs. 65%; 88% vs. 60%; $p < 0,05$); l'assenza di ialina di Mallory (88% vs. 65%; 82% vs. 60%; $p < 0,05$) e di altri inclusi citoplasmatici (88% vs. 66%; 88% vs. 61%; $p < 0,05$); il grado nucleare 2 (50% vs. 23%; 41% vs. 21%; $p < 0,05$) ed il monomorfismo cellulare (88% vs. 58%; 88% vs. 55%; $p < 0,05$).

Nel solo gruppo degli espianti hanno mostrato rilevanza statistica anche l'assenza di satelliti neoplastici peritumorali (76% nei GS+ vs. 11% negli altri HCC; $p < 0,05$) e il ridotto pleomorfismo nucleare (grado 1 nel 88% dei GS+ vs. 19% negli altri HCC; $p < 0,05$).

Un discorso a parte va fatto per la necrosi: essa infatti è risultata presente nel 6% dei GS+ vs. 15% degli altri HCC nella serie degli espianti e nel 33% dei GS+ nella serie completa

vs. l'11% degli altri HCC ($p < 0,05$). Tali risultati, pur statisticamente significativi, appaiono parzialmente contrastanti e verosimilmente non attendibili per la presenza di una rilevante quota di casi non valutabili (26% dei noduli totali e 25% dei soli espianti).

Caratteristiche immunoistochimiche

L'espressione nucleare di β -catenina è stata identificata in 4 (4%) degli HCC totali (espanti ed epatectomie), tutti con morfologia caratteristica e suggestiva per attivazione della via Wnt; l'espressione di GS invece è risultata positiva in 24 noduli (24%; 3 (3%) con pattern a mosaico e 21 (21%) con pattern diffuso e intenso), dei quali 18 (52%) con morfologia caratteristica e 6 (9%) aspecifica ($p < 0,05$).

Nella casistica ristretta ai soli espanti invece, un solo caso è risultato β -catenina positivo, mentre il totale dei GS+ è stato di 17 noduli (22% del totale), 15 (19%) con positività intensa e diffusa e 2 (3%) con quadro a mosaico. Tra essi, 12 (50% dei casi) avevano pattern morfologico suggestivo per l'attivazione della via Wnt ($p < 0,05$).

I risultati completi della valutazione immunoistochimica sono riportati nella tabella 7.

Analisi di sopravvivenza

L'analisi di sopravvivenza è stata possibile solo per la serie degli espanti (68 pazienti).

All'analisi delle curve di Kaplan-Meier la mortalità complessiva, indipendentemente dalle cause del decesso, non è risultata statisticamente diversa tra i casi GS+ e gli altri HCC, con curve di sopravvivenza sostanzialmente sovrapponibili. Anche correggendo la casistica da altri rischi competitori e calcolandola quindi in funzione della mortalità specifica (correlata a documentata recidiva neoplastica), non si è evidenziata una differenza significativa tra i due gruppi. Le curve di sopravvivenza sono riportate nelle figure 7 e 8.

La sopravvivenza è stata valutata anche in funzione delle dimensioni dei noduli, sia per quanto riguarda la mortalità generale che quella tumore specifica. In questo caso sono stati distinti tumori di dimensioni < 2 cm da tutti gli altri. Pazienti con noduli piccoli hanno una migliore sopravvivenza rispetto a quelli con noduli di dimensioni maggiori sia per la mortalità generale che tumore specifica (figure 9 e 10).

Combinando le variabili di sopravvivenza con le dimensioni dei noduli e la positività immunoistochimica alla GS sia per la mortalità generale che quella tumore specifica (figure

11 e 12), il parametro della dimensione discrimina indipendentemente dell'espressione della GS. Addirittura, i tumori GS+ sembrano presentare una peggiore sopravvivenza rispetto agli altri HCC che sono tendenzialmente più piccoli.

DISCUSSIONE

Diversamente da quanto accade per altri tumori, il ruolo dell'anatomia patologica negli HCC è sostanzialmente ridotto al mero aspetto della diagnosi su biopsia / pezzo operatorio, quando questa peraltro non si possa ottenere attraverso metodi alternativi. Inoltre, se si prende in considerazione il sistema di stadiazione più completo attualmente a disposizione per l'inquadramento clinico, prognostico e terapeutico del malato, il BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer)²⁹, si nota come le classi di malattia siano categorizzate in base a variabili cliniche di funzionalità epatica, performance status del paziente, numero e dimensioni dei noduli, senza alcun riferimento all'analisi tissutale e genetica del tumore.

Ci sono in realtà molteplici fattori che in parte giustificano il ruolo secondario del patologo nella diagnosi e nel management clinico dell'HCC, primo fra tutti il fatto che la classificazione dell'epatocarcinoma riportata nei testi più recenti (anche dalla World Health Organization⁴⁹) è basata su criteri morfologici non validati, solo descrittivi e risalenti agli anni '50. Solamente il grading neoplastico e la presenza di angioinvasione hanno un valore prognostico indipendente, ma rimangono il primo una variabile spesso soggettiva ed il secondo un elemento non sempre valutabile con sicurezza⁶⁵⁻⁶⁷. Peraltro, solo negli ultimi anni la classificazione delle lesioni proliferative del fegato è stata codificata secondo schemi più rigidi, aumentando la riproducibilità e diminuendo la variabilità interpersonale che avevano portato in passato ad una serie troppo corposa di nomenclature con criteri diagnostici non sempre coerenti tra loro⁶⁸.

La storia naturale del tumore è intimamente connessa a quella dell'epatopatia sottostante, per cui necessariamente nell'approccio al malato le due variabili vanno considerate insieme: non basta solo l'istologia neoplastica; bisogna anche tenere presente che di solito il tumore rimane confinato al fegato anche in fasi avanzate⁶⁹, compromettendo con la sua crescita un organo già mal funzionante.

Da ultimo va ricordato che, in generale, il carcinoma del fegato è un tumore dalla prognosi sconsigliata: a 5 anni è vivo il 12-15% dei pazienti⁶; anche se diagnosticati precocemente, con dimensioni dei noduli inferiori ai 2 centimetri, nel 40% dei casi i tumori hanno già angioinvasione documentabile⁷⁰ e le varianti istologicamente più favorevoli recidivano in oltre il 50% dei pazienti⁷¹.

Tutto questo potrebbe spiegare in parte perché l'epatocarcinoma sia stato sempre considerato come "orfano" dal punto di vista della ricerca³³ e quindi non si sia mai avvertita la necessità di approfondirne e modificarne la classificazione istologica.

Il BCLC Staging System non è l'unico sistema disponibile per l'approccio al paziente: ne esistono altri per la stadiazione del tumore, circa una decina, ma tutti sono inadatti a soddisfare appieno le esigenze dei clinici ed in ogni caso non riservano alcun ruolo rilevante per l'anatomia patologica⁷². Anche il BCLC, per quanto valido, ha dei limiti: è, infatti, sempre più evidente che la variabilità biologica e clinica dell'HCC non possano essere più sottintese, affidate impropriamente a parametri come la vascolarizzazione o la dimensione del nodulo, ma si debba trovare un modo per esplicitarle. Questo potrebbe portare ad un miglioramento della stratificazione prognostica degli HCC: se si guardano gli stadi precoci di malattia infatti, le percentuali di sopravvivenza sono variabili in ampio range (25-80% a 3 anni e 40-70% a 5 anni), cosa che indica una classificazione dei pazienti imprecisa, con inserimento nella categoria dei casi in fase iniziale anche di HCC biologicamente più aggressivi, indipendentemente dalle dimensioni o dalla vascolarizzazione. Sarebbe quindi utile integrare la stadiazione BCLC con dati ricavati anche dall'istologia e dalla biologia molecolare per evitare questo tipo di misclassificazioni ed arrivare ad una stratificazione prognostica e di predizione clinica più precisa⁷³.

Quanto detto è ancora più importante e rilevante se si tiene conto che oggi è possibile la diagnosi di HCC in fase iniziale nel 30-60% dei casi³³, quando i tumori sono di dimensioni molto piccole; e che viviamo in un'epoca di target therapy, cioè di trattamenti personalizzati e differenziati, basati su determinanti biologici che rendono ogni tumore potenzialmente diverso dall'altro, anche a parità di stadio, dimensioni, clinica ed istologia e quindi queste nuove classi di farmaci "a bersaglio molecolare" possono e devono avere un ruolo anche per l'HCC (come gli inibitori molecolari delle tirosin-kinasi o TKI)³².

Un aspetto interessante e curioso è dato dal fatto che, proprio sulla spinta dei progressi degli ultimi decenni nell'analisi genetica dei tumori, si è passati da una classificazione vecchia, basata su una casistica essenzialmente autoptica di Edmonson degli Anni 50, ad una classificazione molecolare^{74,75}, quasi senza considerare un livello intermedio, auspicabile, di ridefinizione della morfologia in associazione ai dati biologici emergenti. Altri tumori, più studiati e più codificati per la loro frequenza ed il loro impatto sulla popolazione (come il carcinoma del colon, quello della mammella o la patologia neoplastica ematologica), hanno mostrato come attraverso le moderne tecniche high-

throughput dal genoma neoplastico si possa ricavare una grande quantità di informazioni, che poi però debbono essere comprese oltre che descritte. Questa comprensione deve passare anche dall'integrazione e dalla correlazione con l'istologia.

In parte alcuni passi in questo senso si sono già fatti: lo studio dell'epatocarcinogenesi iniziale nell'uomo⁷⁶, la definizione di caratteri istologici e di una corretta nomenclatura per i noduli neoplastici soprattutto precoci⁶⁸, l'identificazione di criteri morfologici utili a differenziare tumori multicentrici da metastasi intraepatiche⁷⁷ e l'integrazione della morfologia con marcatori molecolari basati su determinanti biologici (come i test immunohistochimici per GS e β -catenina)⁷³ sono tutte evidenze della direzione che ha preso la ricerca attuale, cioè quella di combinare dati clinici, morfologici e molecolari. Solo l'analisi patologica accurata e sistematica dei tessuti tumorali, supportata dalla comprensione delle basi biologiche, integrata dall'utilizzo di marcatori tissutali e correlata ai dati clinici può portare ad ottenere informazioni preziose e di rapido trasferimento sul piano diagnostico, come recentemente è accaduto per gli HCC correlati all'attivazione di Wnt^{52,59,60,74,78}.

L'attivazione della via Wnt / β -catenina può essere indagata, oltre che con l'analisi mutazionale del gene, anche con l'immunohistochimica di espressione della β -catenina stessa o di un gene o proteina a valle della catena di attivazione della via, come la Glutamina Sintasi (GS)⁷⁸. In particolare il saggio anticorpale per l'espressione della β -catenina ha una sensibilità del 63% e una specificità del 98%, mentre quello per la GS ha valori di sensibilità pari al 90% e di specificità pari al 98%. Dati in letteratura hanno correlato gli HCC GS+ ad alcune caratteristiche morfologiche ripetibili, quali il pattern microtrabecolare, il basso grado nucleare e la colestasi che da sole possono predire l'attivazione della via di Wnt⁷⁸. Uno studio italiano⁶⁰, pubblicato nel 2010 e condotto presso l'Università di Pavia su un'ampia serie di agobiopsie di HCC trattati con ablazione per radiofrequenza, ha mostrato come anche l'assenza di steatosi, la formazione di acini, l'aspetto idropico dei citoplasmi, l'assenza di fibrosi o di altri inclusi citoplasmatici (ialina di Mallory), l'aspetto dei sinusoidi possano essere ulteriori aspetti istologici che definiscono ancora di più questo sottogruppo di epatocarcinomi GS+. Sempre nello stesso studio è stata trovata una correlazione statisticamente significativa in termini di mortalità ridotta (sia generale che tumore specifica) di questi HCC GS+ rispetto agli altri tumori.

Sulla scia dei risultati di tale lavoro, in una casistica prevalentemente costituita da espianti di fegato per HCC, effettuati presso l'A.O. Papa Giovanni XXIII di Bergamo, abbiamo voluto identificare tumori morfologicamente simili e con caratteri ripetitivi e riproducibili che facessero pensare all'attivazione della via di segnale di Wnt come meccanismo base della carcinogenesi, testandoli poi immunohistochimicamente per l'espressione di β -catenina e di GS.

Una volta separato nella casistica il gruppo di epatocarcinomi GS+ dagli altri, abbiamo cercato correlazioni significative con i dati clinici ed epidemiologici a disposizione; per quanto riguarda gli espianti, sono state ottenute le curve di sopravvivenza per valutare se anche in una popolazione di pazienti trapiantati tali tumori GS+ fossero a prognosi migliore rispetto agli altri e se questo potesse essere un fattore predittivo indipendente.

In base ai dati ricavati, abbiamo validato la possibilità di identificare i tumori da attivazione della via Wnt / β -catenina solo con la morfologia e l'immunohistochimica, sottolineando come determinate caratteristiche microscopiche siano più indicative rispetto ad altre dell'attivazione di tale via: nella nostra casistica, pur limitata dalla presenza di necrosi neoplastica associata o meno a trattamenti ablativi del tumore, circa il 50% degli HCC GS+ in esame aveva anche una morfologia tipica, sia nella serie complessiva che in quella degli espianti. Le principali caratteristiche morfologiche discriminanti per tali GS+ sono state: la presenza di una capsula peritumorale, il pattern di crescita espansivo, la struttura microtrabecolare, il pattern sinusoidale "aperto", la struttura pseudoacinare, l'assenza di flogosi linfo-plasmacellulare, la presenza di early HCC alla periferia della lesione, il monomorfismo, cellule di medie e piccole dimensioni con citoplasmi con aspetti ossifili ed idropici, l'assenza di steatosi, la presenza di bile, l'assenza di degenerazione balloniforme, di ialina di Mallory e di altri inclusi citoplasmatici, il grado nucleare 2, l'assenza di satelliti neoplastici peritumorali, di invasione vascolare ed infine il ridotto pleomorfismo nucleare. Facendo un confronto con il lavoro precedentemente citato⁶⁰, la nostra casistica ha mostrato una quota percentuale complessiva di GS+ inferiore (24% nella serie completa e 21,5% in quella degli espianti vs. 43,9% della serie considerata nel suddetto lavoro). Inoltre, sono emerse alcune differenze rispetto ai parametri morfologici: come già anticipato, nello studio di Pavia la popolazione GS+ era diversa in maniera statisticamente significativa per alcuni tratti microscopici peculiari (pattern microtrabecolare, presenza di pseudo acini, sinusoidi aperti, assenza di steatosi e di fibrosi, presenza di bile, dimensioni cellulari ridotte, citoplasmi idropici e basso grado nucleare). Nelle nostre serie, sia in quella

completa che in quella ristretta ai soli espanti, una percentuale maggiore di tumori GS+ ha mostrato pattern sinusoidale aperto (92% dei GS+ nella serie completa e 88% di GS+ negli espanti vs. 54% dei GS+ della casistica agobiologica pavese), presenza di fibrosi (8% e 12% vs. 6,1%) e di bile (88% e 88% vs. 33,3%), grado nucleare 3 (42% e 47% vs. 24,2%). Una quota percentuale di tumori sovrapponibile tra le serie dei due studi ha presentato steatosi (8% e 7% vs. 8,1%) e cellule di dimensioni ridotte (21% e 24% vs. 21,2%). Infine, meno tumori GS+ della casistica bergamasca presentavano in percentuale pattern microtrabecolare (50% e 52% vs. 66,7%) e strutture pseudoacinari (54% e 47% vs. 59%).

Va sottolineato che molti HCC della nostra casistica avevano cellule di medie dimensioni (50% dei GS+ nella serie completa e 47% dei GS+ negli espanti) e che la valutazione dei citoplasmici ha riportato percentuali significative, anche se minori rispetto allo studio di Pavia, per la categoria "idropico" (25% e 18% vs. 49,5%). Più dirimente nel presente studio è stata la categoria "citoplasma ossifilo" (21% dei GS+ nella serie totale e 29% dei GS+ negli espanti). Rispetto allo studio citato, infine, sono qui risultate significative ulteriori variabili, già elencate in precedenza (vedi Risultati).

Probabilmente serviranno altri studi per definire meglio il significato delle differenze riportate tra i due lavori, per esempio per validare anche i citoplasmici ossifili oltre all'aspetto idropico come tratto morfologico collegato all'attivazione della via Wnt.

Vale la pena di sottolineare che le valutazioni dello studio attuale sono state fatte su una consistente quota di tessuto e non su materiale agobiologico, per cui il giudizio è stato compiuto un bilancio complessivo dei diversi aspetti morfologici emersi; la biopsia è sostanzialmente "una parte per il tutto", per cui può non essere sufficientemente rappresentativa di tutti i diversi caratteri della lesione.

Per quanto riguarda la ricerca di peculiarità clinico - epidemiologiche specifiche per gli HCC GS+, l'unico dato interessante e in certa misura atteso emerso da questo lavoro, ricavato dagli espanti, è che lo stadio postoperatorio T1 sembrerebbe più rappresentato nella popolazione GS+: tale stadio indica tumori singoli e non angioinvasivi, in linea con quanto riportato in letteratura fino ad ora^{52,58,74,78} per tumori con attivazione della via Wnt.

Contrariamente a quanto riportato dallo studio di Pavia⁶⁰, la mortalità (generale e specifica) non è risultata inferiore nella nostra casistica di tumori GS+ rispetto agli altri HCC. Più significativa in tal senso, nella popolazione in esame, è risultata la dimensione del nodulo (cut-off: 2 cm), che influenza la sopravvivenza in maniera indipendente, rispetto

alla positività o meno per la GS. Sembrerebbe quindi che una diagnosi precoce di neoplasia, quando il nodulo è ancora di dimensioni ridotte e inferiori a 2 cm, rappresenti un fattore dirimente per la sopravvivenza, più che l'eventuale attivazione della via Wnt.

Si può supporre che in una popolazione di malati trattati con ablazione per radiofrequenza⁶⁰ i tumori GS+ siano destinati ad andare meglio perché hanno meno probabilità di essere angioinvasivi e di avere noduli satelliti e sono capsulati; questi segni sono interpretabili come espressione di una malattia più "contenuta" e localizzata. Nella popolazione degli espiantati probabilmente tale vantaggio si perde e contano di più altre caratteristiche, quali le dimensioni del nodulo.

I limiti principali di questo studio sono rappresentati essenzialmente dalla mancanza di notizie cliniche complete, peraltro recuperabili solo per la casistica degli espianti e non per quella delle epatectomie, che avrebbe potuto fungere da serie di confronto ed il fatto di non aver potuto eseguire indagini genetiche, non necessarie per confermare l'attivazione della via di segnale Wnt (già validata attraverso l'immunoistochimica), ma che avrebbero potuto fornire ulteriori dati da correlare alla clinica e alla morfologia. Essendo inoltre il lavoro del patologo per definizione influenzato dalla variabilità soggettiva, per quanto questa sia stata ridotta dalla valutazione in doppio dei casi secondo uno schema codificato con categorie definite, è comunque d'obbligo annoverare tra i limiti la mancanza di marcatori oggettivi che evitino eventuali misclassificazioni. Da ultimo e più strettamente correlato al materiale in esame, va sottolineato che parte degli HCC considerati erano necrotici e quindi più difficilmente valutabili al microscopio, sia dal punto di vista morfologico che immunofenotipico.

Se invece vogliamo considerare i vantaggi, il primo e più importante è la numerosità degli espianti compresi nella serie: ciò elimina in partenza eventuali bias nella valutazione della mortalità dovuti per esempio a recidiva per resezione incompleta di neoplasia. Il fatto di avere campioni chirurgici da analizzare ha fornito quantitativamente più materiale su cui effettuare le valutazioni, con possibilità di ripeterle più volte su preparati nuovamente allestiti in caso di dubbio, aumentando l'accuratezza senza incorrere nel rischio dell'esaurimento del campione stesso come può accadere per la biopsia. Ulteriore vantaggio rispetto a studi analoghi è l'aver utilizzato una tabella con variabili morfologiche quantitative e qualitative definite, percorse e valutate in doppio e con l'ausilio di un

epatopatologo esperto e l'aver avuto la possibilità di utilizzare l'immunoistochimica a supporto dell'interpretazione morfologica e della definizione delle classi di tumori.

CONCLUSIONI

Nello specifico dello studio condotto, possiamo trarre due conclusioni principali. Innanzitutto, si è confermata l'associazione statisticamente significativa tra espressione di GS (come epifenomeno dell'attivazione della via Wnt) e caratteristiche morfologiche peculiari. La morfologia al microscopio e l'immunoistochimica per GS sono metodiche di basso costo e quindi in linea teorica disponibili in tutte le Anatomie Patologiche: anche su biopsie di lesioni precoci di dimensioni ridotte, nelle quali molti dei parametri morfologici non sono sempre di facile valutazione, si potrebbero riconoscere comunque le neoplasie da attivazione della via Wnt. In un'epoca di target therapy, identificare un gruppo di HCC con caratteristiche ripetibili suggestive per l'attivazione della via molecolare Wnt fornisce il razionale per cercare nuovi farmaci specifici.

Inoltre, nella nostra casistica relativa ai pazienti espiantati, i tumori GS+ non hanno mostrato una migliore prognosi in termini di sopravvivenza generale e tumore specifica. Tale vantaggio è stato invece dimostrato per noduli più piccoli, indipendentemente dalla positività o meno per GS. Il nostro lavoro sembra suggerire quindi che in caso di trapianto di fegato l'attivazione della via di segnale Wnt e la positività per GS non siano da considerare un fattore prognostico favorevole, a differenza di quanto è emerso da altre casistiche su materiale di natura diversa (biopsie)⁶⁰, ma che sia più importante la dimensione della neoplasia. Altri studi sono necessari per confermare questa evidenza: se effettivamente si dovesse validare in futuro quanto emerso da questa casistica, si potrebbe pensare i tumori GS+ mantengano un vantaggio in termini di prognosi *quoad vitam* se di dimensioni ancora contenute e pertanto passibili di trattamento localizzato; del resto, sono carcinomi che tendono ad essere capsulati e meno angioinvasivi rispetto ad altri. In caso di espianto, tale vantaggio verrebbe meno e le dimensioni ritornerebbero ad essere il fattore di maggior significato prognostico.

BIBLIOGRAFIA

- 1: Ishak KG. Atlas of tumor pathology. In: Rosai J, ed. Vol. Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts: AFIP, 2001:199-230.
- 2: Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004, 127:S5-S16.
- 3: Bosch FX, Ribes J, Cleries R, Diaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Disease* 2005, 9:191-211.
- 4: Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002, 155 (4):323-31.
- 5: El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007, 132:2557-76.
- 6: Aiom, Linee guida EPATOCARCINOMA; edizione 2013.
- 7: Tiribelli C, Melato M, Crocè LS, Giarelli L, et al. Prevalence of hepatocellular carcinoma and relation to cirrhosis: comparison of two different cities of the world. *Hepatology* 1989, 10:998-1002.
- 8: Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991, 325:675-80.
- 9: Donato MF, Arosio A, Del Ninno E. High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity. *Hepatology* 2001, 34:523-8.
- 10: Ganne-Carrié N, Chastang C, Chapel F. Predictive score for the development of hepatocellular carcinoma and additional value of liver large cell dysplasia in Western patients with cirrhosis: a prospective study. *Gastroenterology* 1996, 112:1112-8.
- 11: El-Sarag HB. Hepatocellular carcinoma: Recent trends in the United States. *Gastroenterology* 2004, 127:S27 – S34.
- 12: Nair J, Sone H, Nagao M, et al. Copper-dependent formation of miscoding etheno-DNA adducts in the liver of LEC rats developing hereditary hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1996, 56:1267-71.
- 13: Di Bisceglie AM, Carithers RL, Jr, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998, 28:1161-5.
- 14: Stroffolini T, Sagnelli E, Mariano A, et al. Characteristics of HCV positive subjects referring to hospitals in Italy: a multicentre prevalence study on 6999 cases. *J viral Hepat* 2006, 13:351-4.
- 15: Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007, 13:2436-41.
- 16: El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999, 340:745-50.
- 17: El-Serag HB, Davila JA, Petersen NJ, McGlynn KA. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann Intern Med* 2003, 139:817-23.
- 18: Bruno S, Crosignani A, Maisonneuve P, Rossi S, Silini E, Mondelli MU. 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.
- 19: Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004, 127:S35 - S50.
- 20: Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002, 123:134-40.
- 21: Mazzanti R, Gramantieri L, Bolondi L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspects. *Mol Aspects Med* 2008, 29:130-43.
- 22: Yuan JM, Govindarajan S, Arakawa K, Yu MC. 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.
- 23: Yu MC, Yuan JM. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004, 127:S72-8.

- 24: Yu MW, Hsieh HH, Pan WH, Yang CS, CJ CH. Vegetable consumption, serum retinol level, and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1995, 55:1301-5.
- 25: Talwalkar JA, Gores GJ. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004, 127:S126-32.
- 26: Bruix J, Sherman M, Llovet JM, 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.
- 27: Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005, 42:1208-36.
- 28: Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *J Hepatol* 2005, 42:S110-S107.
- 29: Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999, 19:329-38.
- 30: Llovet JM, Real MI, Montana X, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controller trial. *Lancet* 2002, 359:1734-9.
- 31: Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006, 24:4293-300.
- 32: Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New Engl J Med* 2008, 359: 378-90.
- 33: Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 2008, 48 Suppl 1:S20-37.
- 34: Beaugrand M, N'Kontchou G, Seror O, Ganne N, Trinchet JC. Local/regional and systemic treatments of hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005, 25:201-11.
- 35: Forner A, Hessheimer AJ, Isabel real M, Bruix J. Treatment of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006, 60:89-98.
- 36: Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantations for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996, 334:693-9.
- 37: Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol* 2009, 10:35-43.
- 38: Siegler M, Simmerling MC, Siegler JM, et al. Recipient deaths during donors surgery: a new ethical problem in living donor liver transplantation (LDLT). *Livertranspl* 2006, 12:358-60.
- 39: Ghobrial RM, Freise CE, Trotter JF, et al. Donor morbidity after living donation for liver transplantation. *Gastroenterology* 2008, 135:468-76.
- 40: Brown RS, Jr. Liver donors in liver transplantation. *Gastroenterology* 2008, 134: 1802-13.
- 41: Livraghi T. Guidelines for treatment of liver cancer. *Eur J Ultrasound* 2001, 13:167-76.
- 42: Lencioni R, Cioni D, Crocetti L, et al. Early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: long-term results of percutaneous image-guided radiofrequency ablation. *Radiology* 2005, 234:961-7.
- 43: Kulik LM, Carr BI, Mulcahy MF, et al. Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *Hepatology* 2008, 47:71-81.
- 44: Salem R, Lewandowski RJ, Mulcahy MF, et al. Radioembolisation for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroenterology* 2010, 138:52-64.
- 45: Hilgard P, Hamami M, Fouly AE, et al. Radioembolisation with yttrium-90 glass microspheres in hepatocellular carcinoma: European experience on safety and long-term survival. *Hepatology* 2010, 52: 1741-9.
- 46: Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008, 359:378-90.
- 47: Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009, 10:25-34.

- 48: Qin S, Bai Y, Lim HY, et al. Randomized, multicenter, open-label study of oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin versus doxorubicin as palliative chemotherapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2013, 31:3501-8.
- 49: WHO classification of tumors of digestive system (IARC WHO Classification of Tumor), October 26, 2010.
- 50: Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006, 6:674-87.
- 51: Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002, 31:339-46.
- 52: Villanueva A. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007, 27:55-76.
- 53: Kan Z, Zheng H, Liu X, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res* 2013, 23:1422-33.
- 54: Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T. Wnt signalling inside the nucleus. *Cancer Sci* 2008, 99:631-7.
- 55: Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinoma define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2001, 120:1763-73.
- 56: Calvisi DF, Factor VM, Ladu S, Conner EA, Thorgeirsson SS. Disruption of beta-catenin pathway or genomic instability define two distinct categories of liver cancer in transgenic mice. *Gastroenterology* 2004, 126:1374-86.
- 57: Lemmer ER, Friedman SL, Llovet JM. Molecular diagnosis of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma: the potential of gene expression profiling. *Semin Liver Dis* 2006, 26:373-84.
- 58: Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, et al. Transcriptome classifications of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007, 45:42-52.
- 59: Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009, 69: 7385-92.
- 60: Dal Bello B, Rosa L, Campanini N, 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.
- 61: Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *AM J Gastroenterol* 1999, 94:2467-74.
- 62: Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005, 41:1313-21.
- 63: Vardhan R, Weiss CO, Segal JB, et al. Evaluating health outcomes in the presence of competing risks: a review of statistical methods and clinical applications. *Med Care* 2010, 48:S96-105.
- 64: Kim WR, Poterucha JJ, Benson JT, Therneau TM. The impact of competing risks on the observed rate of chronic hepatitis C progression. *Gastroenterology* 2004, 127:749-55.
- 65: Lauwers GY, Terris B, Balis UJ, et al. Prognostic histologic indicators of curatively resected hepatocellular carcinoma: a multi-institutional analysis of 425 patients with definition of a histologic prognostic index. *Am J Surg Pathol* 2002, 26:25-34.
- 66: Vauthey JN, Lauwers GY, Esnaola NF, et al. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2002, 20:1527-36.
- 67: Ikai I, Arii S, Kojiro M, et al. Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey. *Cancer* 2004, 101: 796-802.
- 68: Wanless IR. Terminology of nodular hepatocellular lesions. International Working Party. *Hepatology* 1995, 22:983-93.
- 69: Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003. 362:1907-17.
- 70: Tsai TJ, Chau GY, Lui WY, et al. Clinical significance of microscopic tumor venous invasion in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2000, 127:603-8.

- 71: Inoue K, Takayama T, Higaki T, et al. Clinical significance of early hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2004, 10S16-9.
- 72: Sala M, Forner A, Varela M, Briux J. Prognostic prediction in patients with hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005, 25:171-80.
- 73: Libbrecht L, Roskams T. Molecular diagnostic approach to liver tissue as an ancillary tool for liver histopathology. *Semin Liver Dis* 2006, 26:328-36.
- 74: Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, et al. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis* 2010, 30:35-51.
- 75: Edmonson HA. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48900 necroscopies. *Cancer* 1954: 462-503.
- 76: Kojiro M, Roskams T. early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis* 2005, 25:133-42.
- 77: Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, et al. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* 2003, 38:200-7.
- 78: Audard V, Grimber G, Elie C, et al. Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations. *J Pathol* 2007, 212:345-352.

LEGENDA ICONOGRAFICA

Figure

Figura 1: BCLC Staging System.

Figura 2: vie di segnale implicate nella cancerogenesi epatica.

Figura 3: via del segnale Wnt / β -catenina

Figura 4: modello di Boyault.

Figura 5: alcune caratteristiche morfologiche degli epatocarcinomi.

Figura 6: pattern di espressione immunohistochemica di β -catenina e GS.

Figura 7: curve K-M, mortalità complessiva in relazione all'espressione di GS.

Figura 8: curve K-M, mortalità tumore specifica in relazione all'espressione di GS.

Figura 9: curve K-M, mortalità complessiva in relazione alle dimensioni.

Figura 10: curve K-M, mortalità tumore specifica in relazione alle dimensioni.

Figura 11: curve K-M, mortalità complessiva in relazione a GS e dimensioni, combinate.

Figura 12: curve K-M, mortalità tumore specifica in relazione a GS e dimensioni, combinate.

Tabelle

Tabella 1: classificazione di Child-Pugh.

Tabella 2: variabili istologiche valutate.

Tabella 3: variabili cliniche della serie completa di HCC.

Tabella 4: variabili cliniche della serie degli espianti.

Tabella 5: variabili morfologiche della serie completa di HCC.

Tabella 6: variabili morfologiche della serie degli espianti.

Tabella 7: variabili immunohistochemiche.

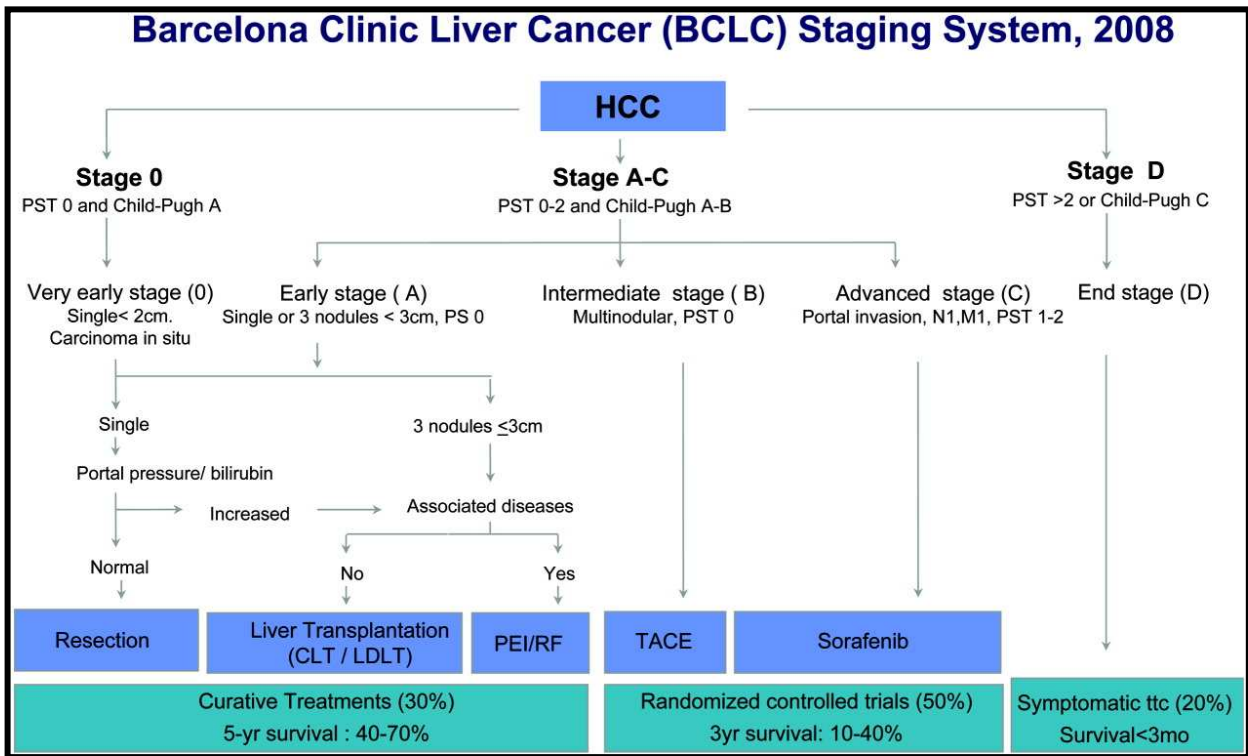


Figura 1: BCLC Staging System (Llovet JM et al. Semin Liver Dis 1999)

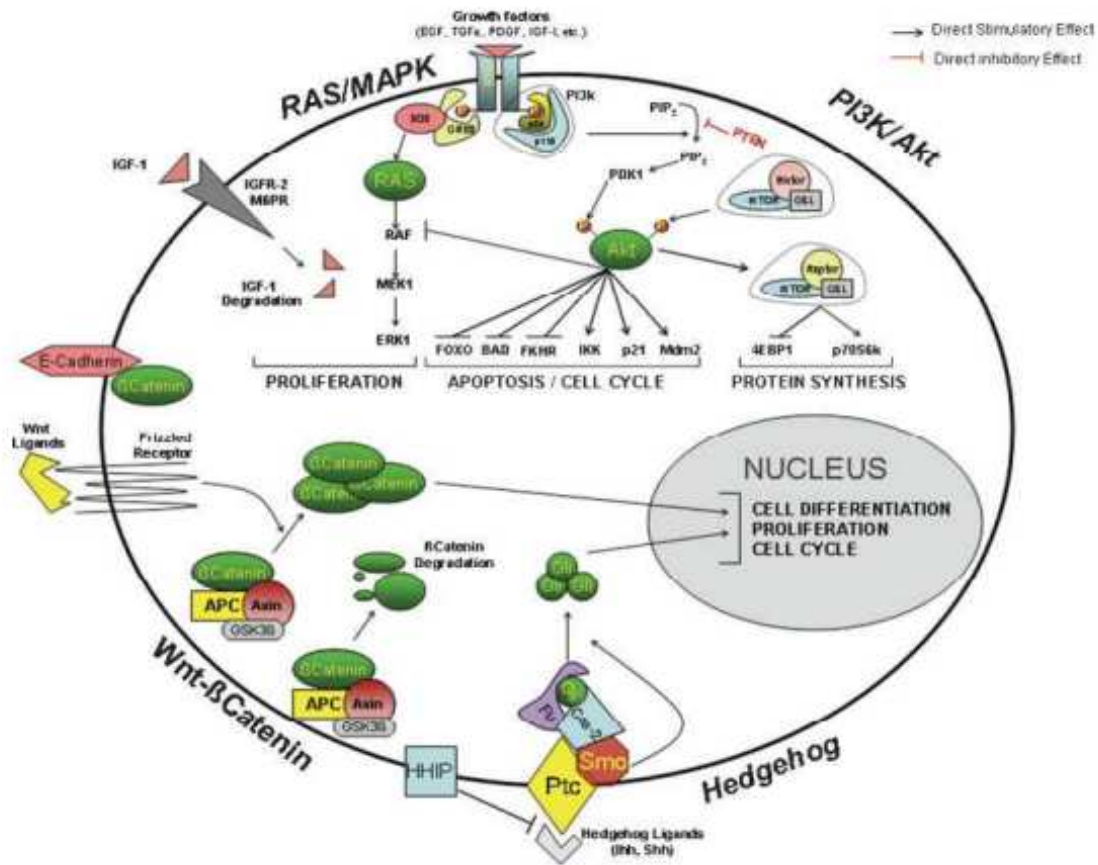


Figura 2: vie di segnale implicate nella cancerogenesi epatica (Villanueva A et al. Semin Liver Dis 2007)

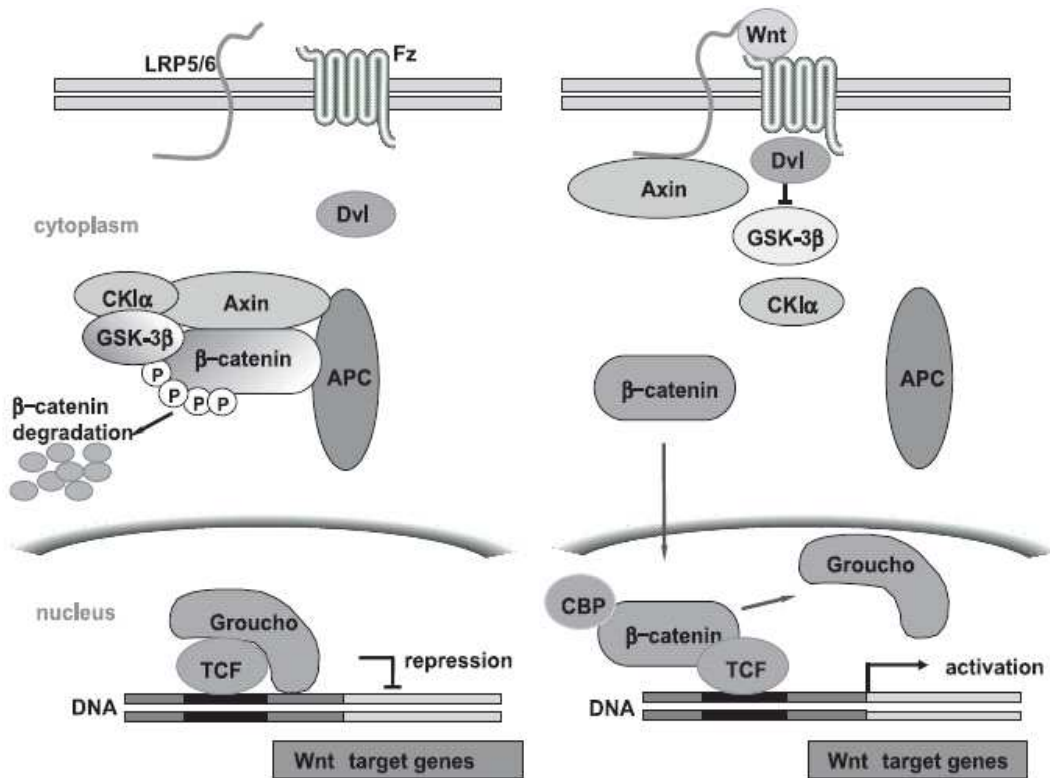


Figura 3: via del segnale Wnt / β -catenina (Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. J Pharmacol Sci 2007)

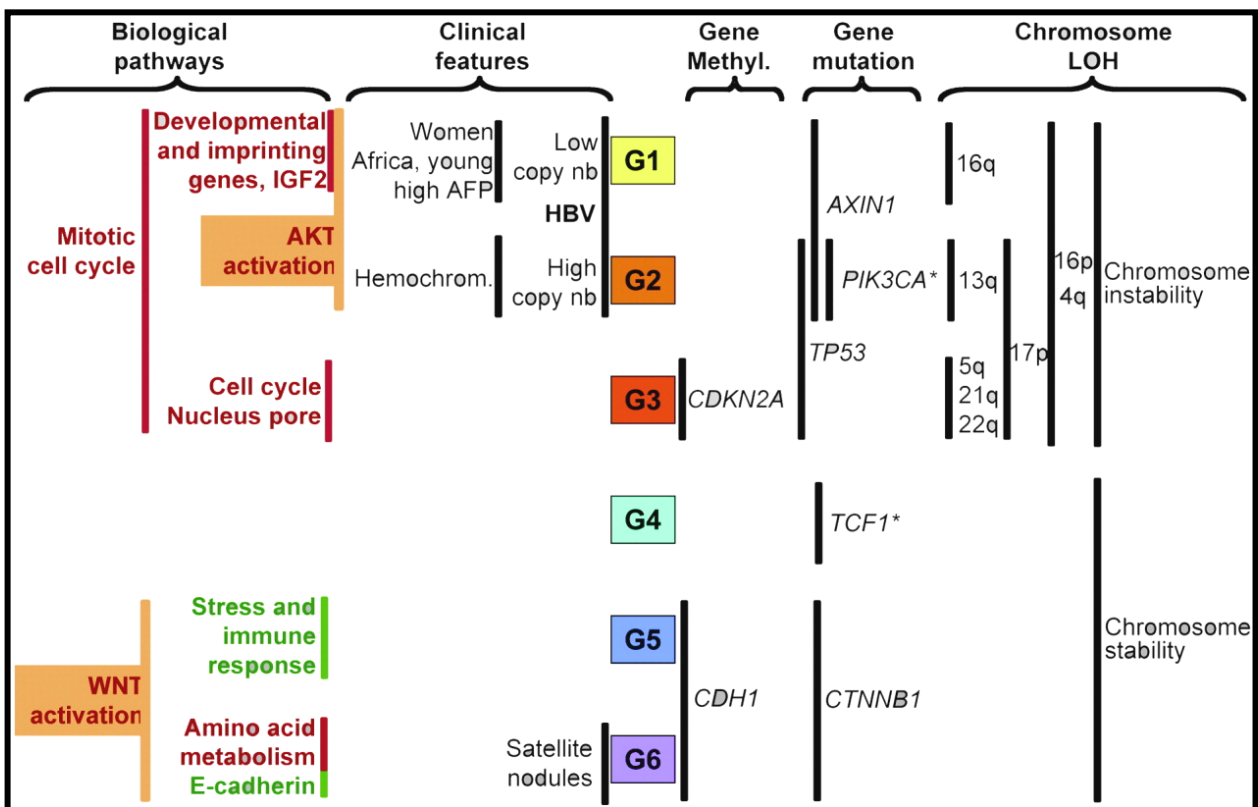


Figura 4: modello di Boyault (Boyault et al. Hepatology 2007)

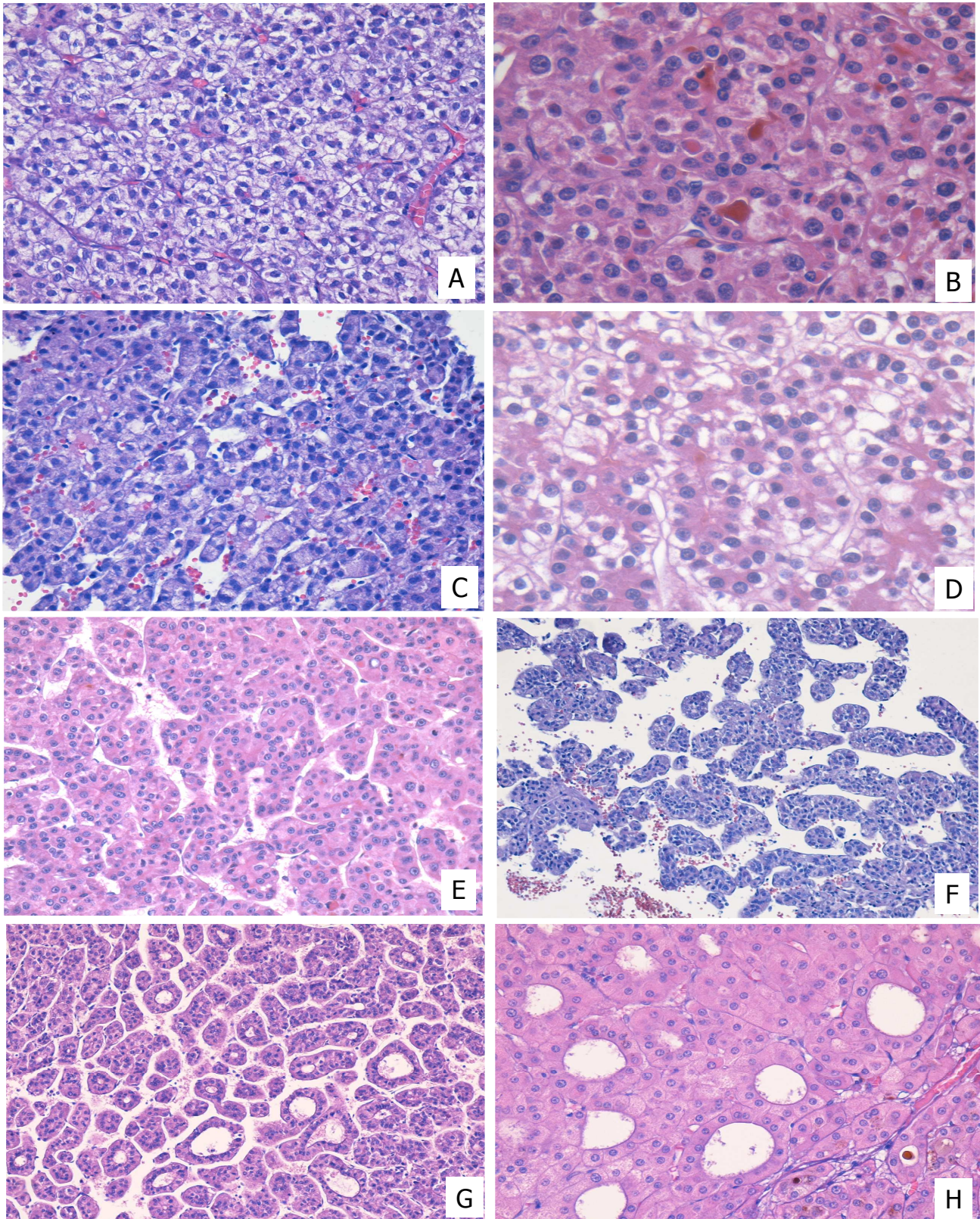


Figura 5: alcune caratteristiche morfologiche degli epatocarcinomi. A, modificazioni idropiche dei citoplasmi; B, presenza di bile; C, monomorfismo nucleare con cellule di piccola taglia; D, basso grading nucleare; E, microtrabecole; F, sinusoidi "aperti"; G ed H, pseudoacini.

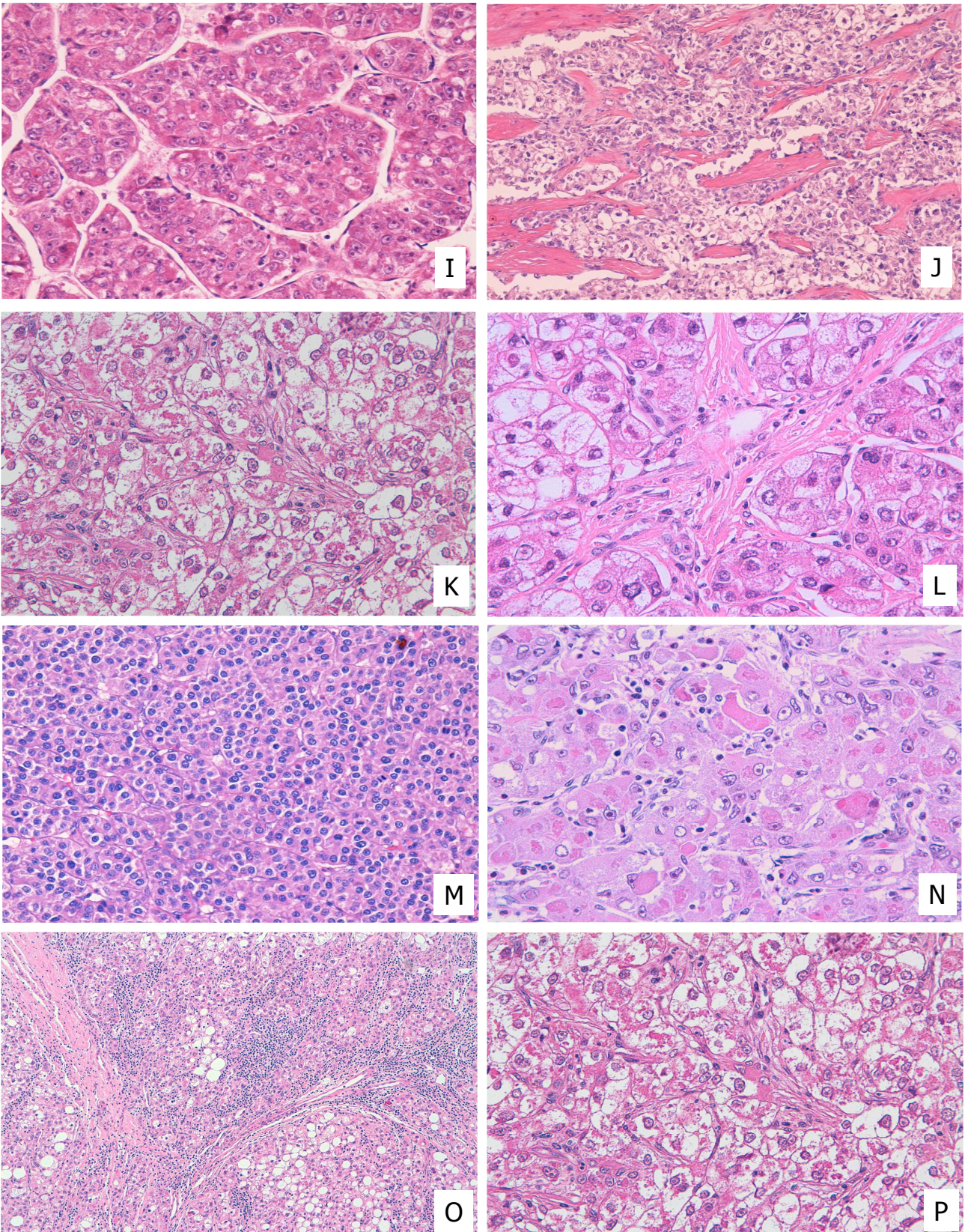


Figura 5 (cont.): alcune caratteristiche morfologiche degli epatocarcinomi. I, macrotrabecole; J e K, fibrosi; L, fibrosi perisinusoidale; M, sinusoidi "chiusi"; M, infiltrato linfocitario; O, steatosi; P, ballooning.

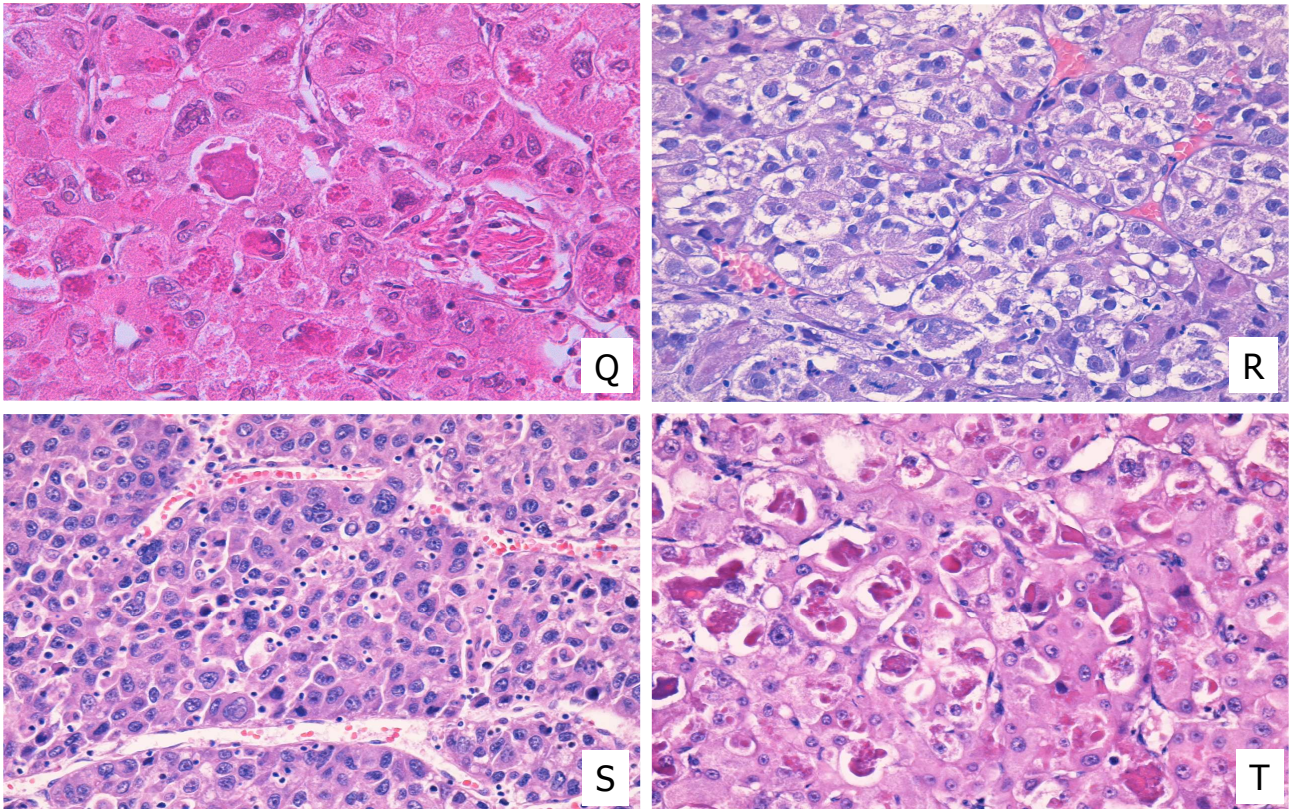


Figura 5 (cont.): alcune caratteristiche morfologiche degli epatocarcinomi. Q, ialina di Mallory; R, inclusi citoplasmatici; S, alto grado nucleare; T, pleomorfismo.

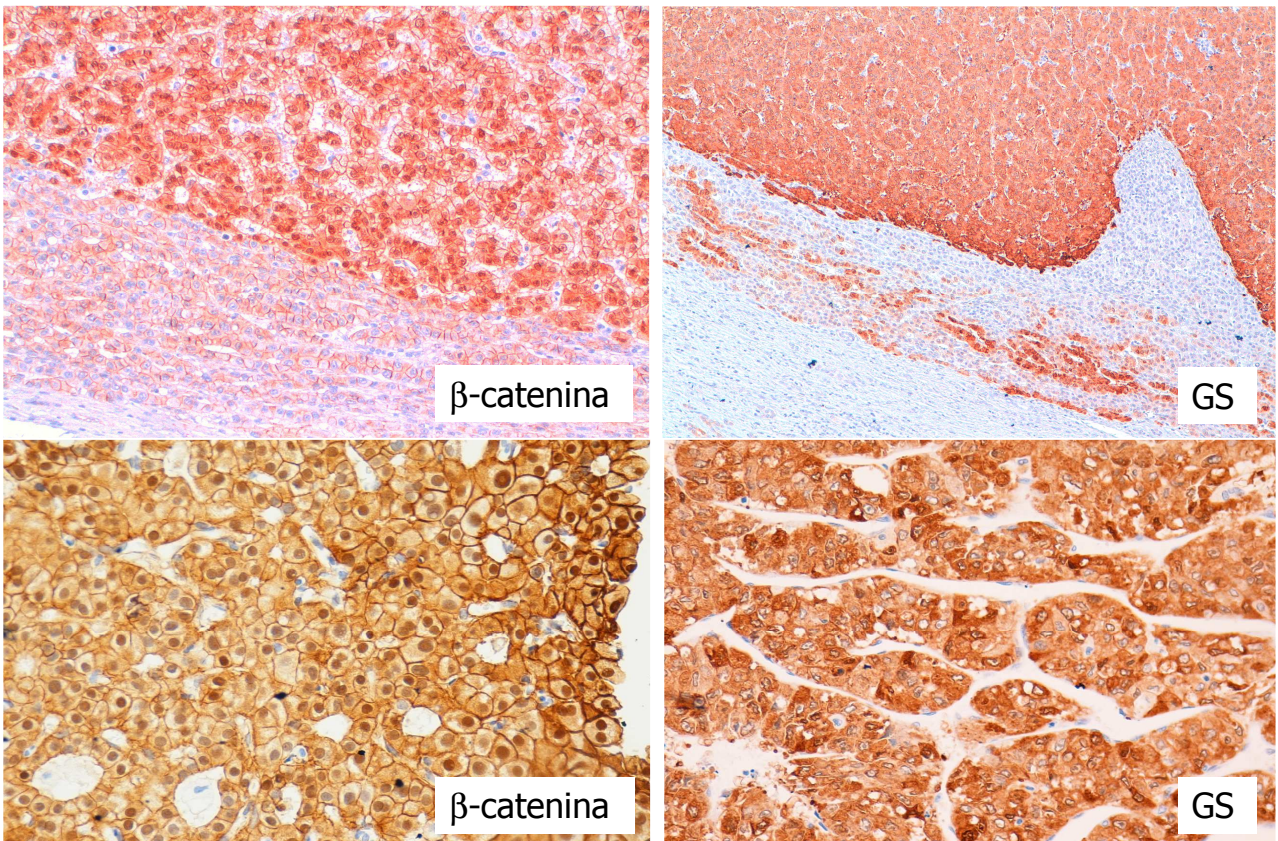


Figura 6: pattern di espressione immunoistochimica di β -catenina e GS.

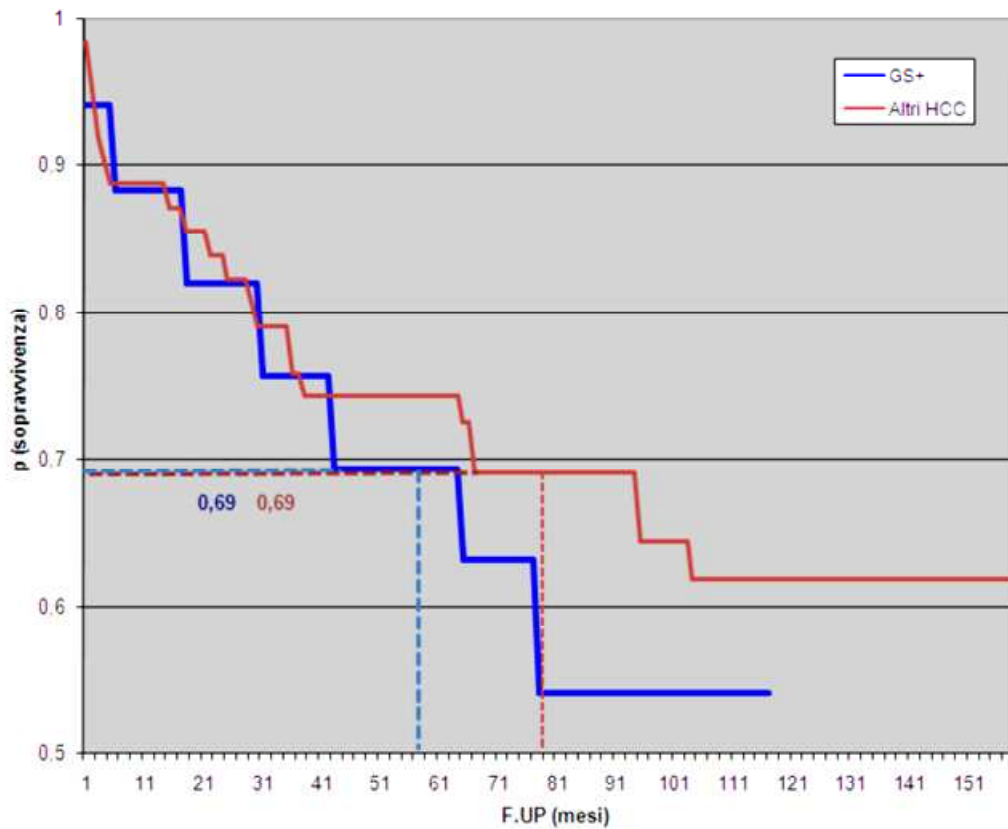


Figura 7: curve K-M, mortalità complessiva in relazione all'espressione di GS. Logrank test: $p > 0,05$.

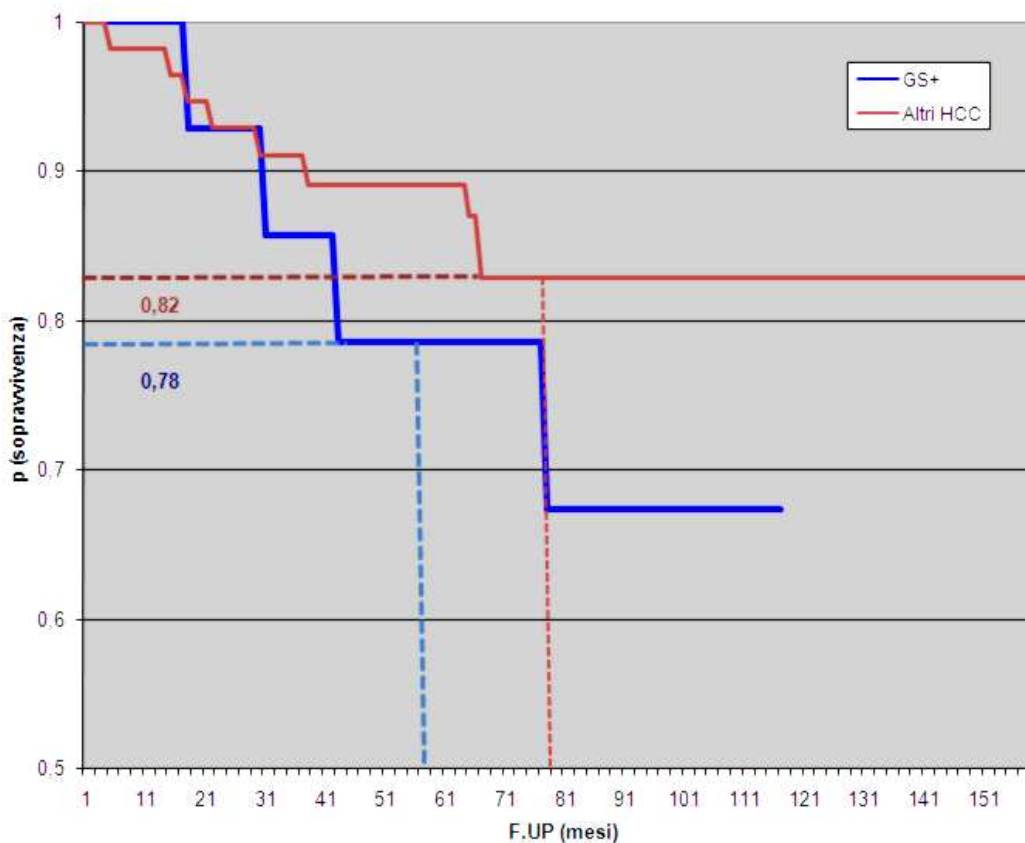


Figura 8: curve K-M, mortalità tumore specifica in relazione all'espressione di GS. Logrank test: $p > 0,05$.

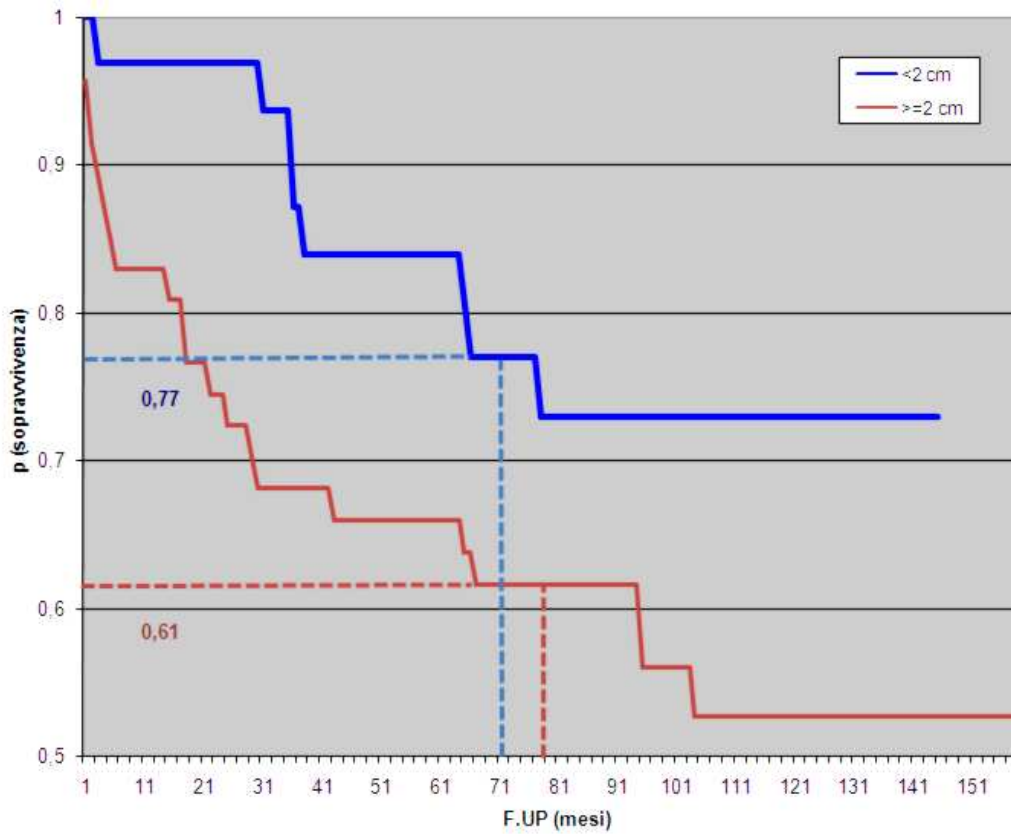


Figura 9: curve K-M, mortalità complessiva in relazione alle dimensioni. Logrank test: $p < 0,05$.

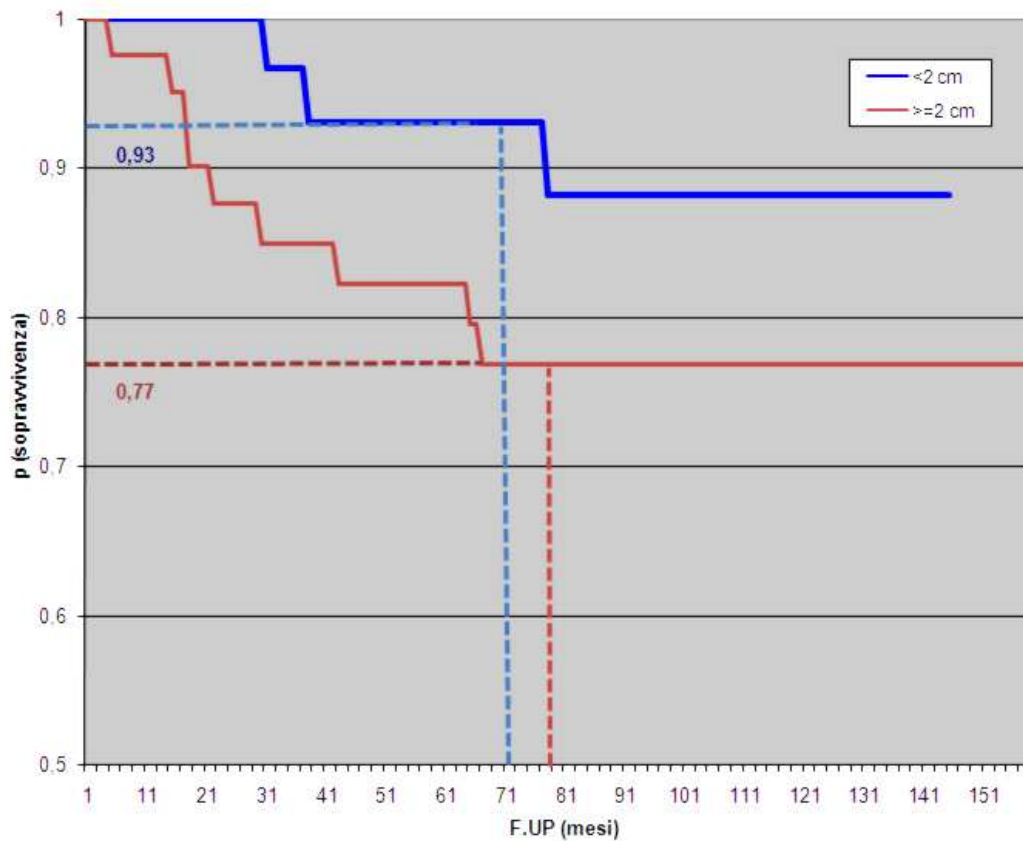


Figura 10: curve K-M, mortalità tumore specifica in relazione alle dimensioni. Logrank test: $p < 0,05$.

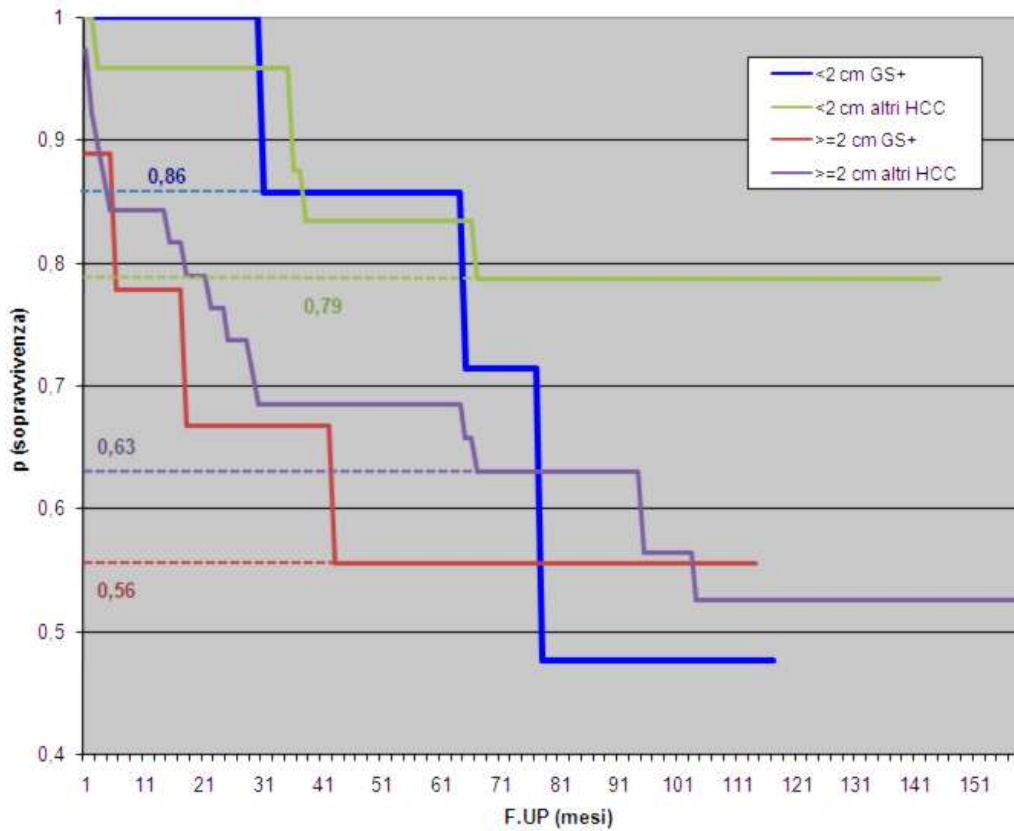


Figura 11: curve K-M, mortalità complessiva in relazione a GS e dimensioni, combinate. Logrank test: $p < 0,05$ solo in relazione alle dimensioni dei noduli.

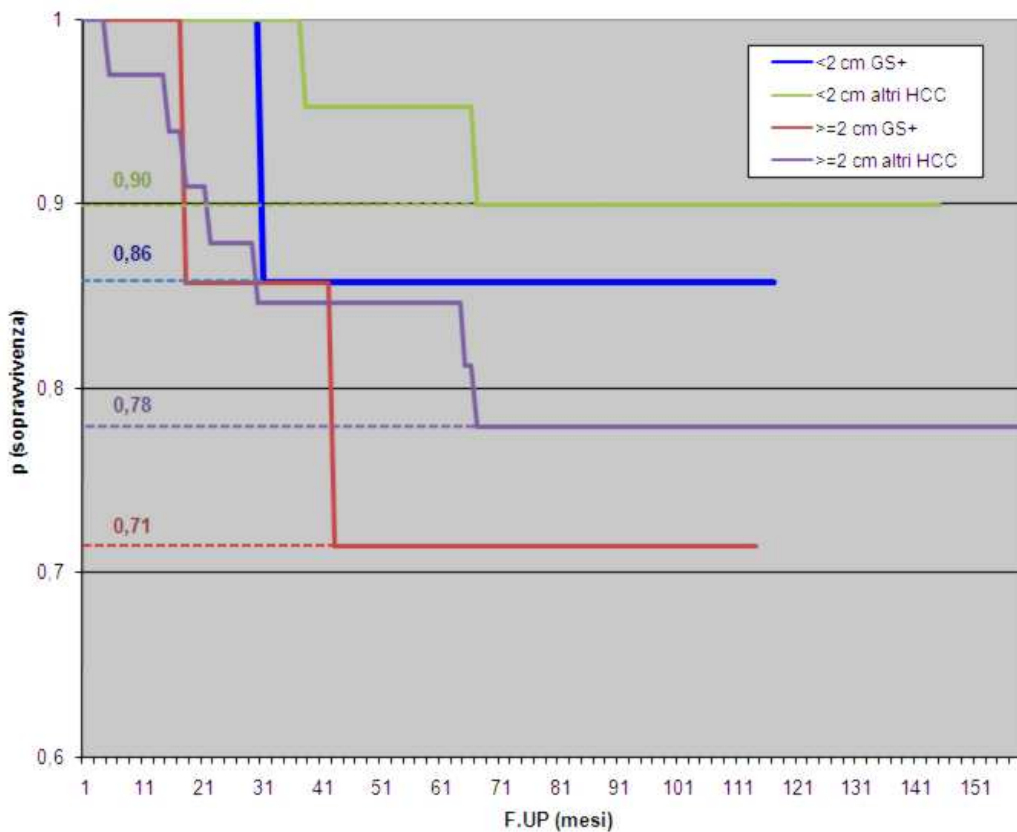


Figura 12: curve K-M, mortalità specifica in relazione a GS e dimensioni, combinate. Logrank test: $p < 0,05$ solo in relazione alle dimensioni dei noduli.

Score	1	2	3
Bilirubina totale	<2 mg/dl	2-3 mg/dl	>3 mg/dl
INR tempo di protrombina	INR <1.7	INR 1.7-2.3	INR >2.3
Albumina	>3.5 gr/dl	3.5-2.8 gr/dl	<2.8 gr/dl
Ascite clinica	Assente	Scarsa o ben controllata	Moderata/severa
Encefalopatia epatica	Assente	Lieve	Moderata/severa

Tabella 1: classificazione di Child-Pugh (Aiom, Linee guida EPATOCARCINOMA; edizione 2013)

<i>Variabile</i>	<i>Categorie – score numerico</i>
Nodulare	multi o mononodulare
Capsula peritumorale	presente, assente
Componente di eHCC	presente, assente
Pattern di crescita	early, espansiva, infiltrativa
Architettura	macrotrabecolare, microtrabecolare, macro/microtrabecolare
Invasione vascolare	si, no
Satelliti	si, no
Sinusoidi	aperti, chiusi
Necrosi	presente, assente
Flogosi	0, 1, 2, 3
Strutture pseudoacinari	0, 1, 2
Fibrosi	assente, bande, desmoplastica, sinusoidale
Dimensioni cellulari	grandi, medie, piccole
Citoplasmici	NAS, chiari, eosinofili, idropici, variabili
Steatosi	assente, lieve, moderata severa
Balloning	0, 1, 2
Inclusi citoplasmatici	0, 1, 2
Ialina di Mallory	0, 1, 2
Bile	presente, assente
Grado nucleare	1, 2, 3
Pleomorfismo nucleare	1, 2
Rapporto N/C	1,2

Tabella 2: variabili istologiche valutate.

n = 98

Variabile	Categoria	HCC tot	%	GS +	%	Altri HCC	%	p (χ²)
Sesso	M	83	85%	22	92%	61	82%	<0,05
	F	15	15%	2	8%	13	18%	
Età media alla diagnosi	Anni ± dev.st.	60,2 ± 11,8		62,9 ± 9,4		59,6 ± 12,5		n.s.
Eziologia	HBV	29	30%	6	25%	23	31%	<0,05
	HCV	42	43%	11	46%	31	42%	
	Alcool	6	6%	2	8%	4	6%	
	Altro	6	6%	0	0%	6	8%	
	Ignota	15	15%	5	21%	10	13%	
Dimensione media noduli	cm ± dev.st.	3,32 ± 3,06		4,4 ± 4,16		2,92 ± 2,58		n.s.
Numero noduli	1	50	51%	15	62%	35	47%	<0,05
	>1	48	49%	9	38%	39	53%	

Tabella 3: variabili cliniche della serie completa di HCC.

n = 79

Variabile	Categoria	HCC tot	%	GS +	%	Altri HCC	%	p (χ²)
Sesso	M	67	85%	16	94%	51	82%	<0,05
	F	12	15%	1	6%	11	18%	
Età media alla diagnosi	Anni ± dev.st.	57,4 ± 10,8		59,1 ± 4,6		57,2 ± 12,1		n.s.
Classe di Child-Pugh	A	24	30%	5	29%	19	41%	<0,05
	B	30	38%	6	36%	24	51%	
	C	21	27%	4	23%	17	36%	
	Non nota	4	5%	2	12%	2	4%	
Eziologia	HBV	26	32%	5	29%	21	34%	n.s.
	HCV	41	52%	10	59%	31	50%	
	Alcool	6	8%	2	12%	4	6%	
	Non nota	6	8%	0	0%	6	10%	
Dimensione media noduli	cm ± dev.st.	2,56 ± 1,33		2,85 ± 1,49		2,48 ± 1,28		n.s.
Numero noduli	1	40	51%	11	65%	29	47%	<0,05
	>1	39	49%	6	35%	33	53%	
Mediana Follow-up	Mesi	81		90		77		n.d.
TNM	T1	26	33%	8	47%	18	29%	<0,05
	T2	48	61%	9	53%	39	63%	
	T3	1	1%	0	0%	1	2%	
	n.d.	4	5%	0	0%	4	6%	

Tabella 4: variabili cliniche della serie degli espianti.

n=98

Variabile	Categoria	HCC tot	%	GS +	%	Altri HCC	%	p (χ^2)
Variab. Citologica	Monomorfo	64	65%	21	88%	43	58%	<0,05
	Pleomorfo	25	26%	3	12%	22	30%	
	NV	9	9%	0	0%	9	12%	
Early HCC	Presente	30	31%	9	38%	21	28%	<0,05
	Assente/nv	68	69%	15	62%	53	72%	
Capsula	Presente	63	64%	19	79%	44	59%	<0,05
	Assente	32	33%	4	17%	28	38%	
	NV	3	3%	1	4%	2	3%	
Pattern crescita	Early	12	12%	2	8%	10	14%	<0,05
	Espansiva	63	64%	20	84%	43	57%	
	Infiltrante	21	21%	2	8%	19	26%	
	NV	2	2%	0	0%	2	3%	
Inv. Vascolare	Presente	44	45%	9	38%	35	47%	<0,05
	Assente	49	50%	15	62%	34	46%	
	NV	5	5%	0	0%	5	7%	
Strutt. Trabecolare	Macro	39	40%	6	25%	33	45%	<0,05
	Micro	33	34%	12	50%	21	28%	
	Macro/micro	24	24%	6	25%	18	24%	
	NV	2	2%	0	0%	2	3%	
Pseudoacini	0	44	45%	4	17%	40	54%	<0,05
	1	29	30%	7	29%	22	30%	
	2	21	21%	13	54%	8	11%	
	NV	4	4%	0	0%	4	5%	
Fibrosi	Assente	73	74%	22	92%	51	69%	<0,05
	In bande	16	16%	0	0%	16	22%	
	Desmoplastica	5	5%	1	4%	4	5%	
	Sinusoidale	2	2%	1	4%	1	1%	
	NV	2	2%	0	0%	2	3%	
Sinusoidi	Aperti	58	59%	22	92%	36	49%	<0,05
	Chiusi	33	34%	2	8%	31	42%	
	NV	7	7%	0	0%	7	9%	
Flogosi	0	67	69%	19	79%	48	65%	<0,05
	1	20	20%	4	17%	16	22%	
	2	3	3%	0	0%	3	4%	
	3	1	1%	0	0%	1	1%	
	NV	7	7%	1	4%	6	8%	
Necrosi	Presente	16	16%	8	33%	8	11%	<0,05
	Assente	56	57%	13	54%	43	58%	
	NV	26	27%	3	13%	23	31%	
Dim. Cellule	Grandi	42	43%	7	29%	35	47%	<0,05
	Medie	40	41%	12	50%	28	38%	
	Piccole	14	14%	5	21%	9	12%	
	NV	2	2%	0	0%	2	3%	
Caratt. Citoplasmici	NAS	56	58%	10	42%	46	62%	<0,05
	Chiarificati	4	4%	0	0%	4	5%	
	Ossifili	6	6%	5	21%	1	1%	
	Schiumosi	2	2%	0	0%	2	3%	
	Eosinofili	9	9%	2	8%	7	9%	
	Idropici	17	17%	6	25%	11	15%	
	Variabili	1	1%	1	4%	0	0%	
	NV	3	3%	0	0%	3	5%	
Steatosi	Assente	74	76%	22	92%	52	70%	<0,05
	Lieve	16	16%	2	8%	14	19%	
	Moderata/severa	6	6%	0	0%	6	8%	
	NV	2	2%	0	0%	2	3%	

Tabella 5: variabili morfologiche della serie completa di HCC.

Variabile	Categoria	HCC tot	%	GS +	%	Altri HCC	%	p (χ^2)
Bile	Presente	53	54%	21	88%	32	43%	<0,05
	Assente	38	39%	3	12%	35	48%	
	NV	7	7%	0	0%	7	9%	
Ballooning	0	70	71%	22	92%	48	65%	<0,05
	1	19	19%	2	8%	17	23%	
	2	7	7%	0	0%	7	9%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Ialina di Mallory	0	69	70%	21	88%	48	65%	<0,05
	1	11	11%	2	8%	9	12%	
	2	16	16%	1	4%	15	20%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Inclusi citoplasm.	0	70	71%	21	88%	49	66%	<0,05
	1	17	17%	2	8%	15	20%	
	2	9	9%	1	4%	8	11%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Grado nucleare	1	16	16%	2	8%	14	19%	<0,05
	2	29	29%	12	50%	17	23%	
	3	51	52%	10	42%	41	55%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Pleomorf. Nucleare	1	34	34%	10	42%	24	32%	n.s.
	2	62	63%	14	58%	48	65%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Rapp. Nucleo/Citop.	0	2	3%	1	4%	1	1%	n.s.
	1	24	23%	6	25%	18	24%	
	2	70	71%	17	71%	53	72%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Satelliti	Presenti	27	27%	8	33%	19	26%	n.s.
	Assenti	69	70%	16	67%	53	72%	
	NV	2	3%	0	0%	2	2%	

Tabella 5 (cont.): variabili morfologiche della serie completa di HCC.

n=79

Variabile	Categoria	HCC tot	%	GS +	%	Altri HCC	%	p (χ²)
Variab. Citologica	Monomorfo	49	62%	15	88%	34	55%	<0,05
	Pleomorfo	21	27%	2	12%	19	31%	
	NV	9	11%	0	0%	9	15%	
Early HCC	Presente	26	33%	7	41%	19	31%	<0,05
	Assente/nv	53	67%	10	59%	43	69%	
Capsula	Presente	46	58%	13	76%	33	53%	<0,05
	Assente	30	38%	3	18%	27	44%	
	NV	3	4%	1	6%	2	3%	
Pattern crescita	Early	11	13%	2	12%	9	15%	<0,05
	Espansiva	45	57%	13	76%	32	52%	
	Infiltrante	21	27%	2	12%	19	31%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Inv. Vascolare	Presente	33	42%	5	29%	28	45%	<0,05
	Assente	41	52%	12	71%	29	47%	
	NV	5	6%	0	0%	5	8%	
Strutt. Trabecolare	Macro	32	41%	4	24%	28	45%	<0,05
	Micro	27	34%	9	52%	18	29%	
	Macro/micro	18	22%	4	24%	14	23%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Pseudoacini	0	37	47%	3	18%	34	55%	<0,05
	1	24	30%	6	35%	18	29%	
	2	14	18%	8	47%	6	10%	
	NV	4	5%	0	0%	4	6%	
Fibrosi	Assente	55	70%	15	88%	40	65%	<0,05
	In bande	15	18%	0	0%	15	24%	
	Desmoplastica	5	6%	1	6%	4	6%	
	Sinusoidale	2	3%	1	6%	1	2%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Sinusoidi	Aperti	42	53%	15	88%	27	44%	<0,05
	Chiusi	30	38%	2	12%	28	45%	
	NV	7	9%	0	0%	7	11%	
Flogosi	0	53	67%	14	82%	39	63%	<0,05
	1	16	20%	2	12%	14	23%	
	2	2	3%	0	0%	2	3%	
	3	1	1%	0	0%	1	2%	
	NV	7	9%	1	6%	6	10%	
Necrosi	Presente	10	13%	1	6%	9	15%	<0,05
	Assente	43	54%	8	47%	35	56%	
	NV	26	33%	8	47%	18	29%	
Dim. Cellule	Grandi	36	46%	5	29%	31	50%	<0,05
	Medie	31	38%	8	47%	23	37%	
	Piccole	10	13%	4	24%	6	10%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Caratt. Citoplasmici	NAS	43	53%	7	41%	36	58%	<0,05
	Chiarificati	3	4%	0	0%	3	5%	
	Ossifili	6	8%	5	29%	1	2%	
	Schiumosi	2	3%	0	0%	2	3%	
	Eosinofili	7	9%	1	6%	6	10%	
	Idropici	14	18%	3	18%	11	18%	
	Variabili	1	1%	1	6%	0	0%	
	NV	3	4%	0	0%	3	5%	
Steatosi	Assente	57	72%	16	93%	41	66%	<0,05
	Lieve	14	17%	1	7%	13	21%	
	Moderata/severa	6	8%	0	0%	6	10%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	

Tabella 6: variabili morfologiche della serie degli espianti.

Variabile	Categoria	HCC tot	%	GS +	%	Altri HCC	%	p (χ^2)
Bile	Presente	41	52%	15	88%	26	42%	<0,05
	Assente	31	39%	2	12%	29	47%	
	NV	7	9%	0	0%	7	11%	
Ballooning	0	52	65%	15	88%	37	60%	<0,05
	1	18	23%	2	12%	16	26%	
	2	7	9%	0	0%	7	11%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Ialina di Mallory	0	51	64%	14	82%	37	60%	<0,05
	1	11	14%	2	12%	9	14%	
	2	15	19%	1	6%	14	23%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Inclusi citoplasm.	0	53	67%	15	88%	38	61%	<0,05
	1	15	19%	1	6%	14	23%	
	2	9	11%	1	6%	8	13%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Grado nucleare	1	14	18%	2	12%	12	19%	<0,05
	2	20	25%	7	41%	13	21%	
	3	43	54%	8	47%	35	57%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Pleomorf. Nucleare	1	27	34%	15	88%	12	19%	<0,05
	2	50	63%	2	12%	48	78%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Rapp. Nucleo/Citop.	0	2	3%	1	6%	1	2%	n.s.
	1	21	27%	5	29%	16	26%	
	2	54	67%	11	65%	43	69%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	
Satelliti	Presenti	57	72%	4	24%	53	86%	<0,05
	Assenti	20	25%	13	76%	7	11%	
	NV	2	3%	0	0%	2	3%	

Tabella 6 (cont.): variabili morfologiche della serie degli espianti.

Immunoistochimica nella serie completa (n=98)

<i>Variabile</i>	<i>Categoria</i>	<i>HCC tot</i>	<i>%</i>	<i>Morfologia BCAT</i>	<i>%</i>	<i>Altri HCC</i>	<i>%</i>	<i>p (χ²)</i>
Beta-catenina	Negativa	89	91%	28	80%	61	97%	<0,05
	Positiva	4	4%	4	11%	0	0%	
	NV	5	5%	3	9%	2	3%	
Glutamina Sintasi	Negativo	56	57%	12	34%	44	70%	<0,05
	Debole	15	15%	3	9%	12	19%	
	Mosaico	3	3%	1	3%	2	3%	
	Diffuso intenso	21	21%	17	49%	4	6%	
	NV	3	4%	2	5%	1	2%	

Immunoistochimica nella serie degli espianti (n=79)

<i>Variabile</i>	<i>Categoria</i>	<i>HCC tot</i>	<i>%</i>	<i>Morfologia BCAT</i>	<i>%</i>	<i>Altri HCC</i>	<i>%</i>	<i>p (χ²)</i>
Beta-catenina	Negativa	73	92%	20	83%	53	96%	n.s.
	Positiva	1	2%	1	4%	0	0%	
	NV	5	6%	3	13%	2	4%	
Glutamina Sintasi	Negativo	46	58%	7	29%	39	71%	<0,05
	Debole	13	16%	3	13%	10	18%	
	Mosaico	2	3%	1	4%	1	2%	
	Diffuso intenso	15	19%	11	46%	4	7%	
	NV	3	4%	2	8%	1	2%	

Tabella 7: variabili immunoistochimiche.

Ringrazio sentitamente il Prof. Enrico M. Silini per il tempo dedicatomi in questi anni e soprattutto, cosa che ritengo preziosa, per aver contribuito alla mia formazione come patologo.

Ringrazio il Dott. Andrea Gianatti e il Dott. Aurelio Sonzogni dell'Anatomia Patologica dell'A.O. Papa Giovanni XXIII di Bergamo per aver condiviso il materiale istologico su cui questo studio è stato condotto e il Dott. Domenico Pinelli del Centro Trapianti di fegato e polmone, Chirurgia Generale III del medesimo Ospedale per avermi fornito i dati clinici necessari.

Ringrazio tutto il personale dell'Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e soprattutto la Dott.ssa Nicoletta Campanini per l'allestimento dei preparati standard e delle colorazioni immunoistochimiche.

Infine ringrazio tutti coloro che non ho citato ma che hanno in diverso modo avuto un ruolo nello svolgimento di questa tesi e che mi hanno aiutato in questi anni: un sincero grazie.