



**Università di Pisa**

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia**

**“VALUTAZIONE MEDIANTE TC DI PERFUSIONE DELLA RISPOSTA  
DELL’EPATOCARCINOMA AVANZATO AL TRATTAMENTO CON SORAFENIB”**

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. Carlo BARTOLOZZI**

**Candidata:**

**Francesca PANCRAZI**

**Anno Accademico 2009/2010**

## INDICE

Riassunto analitico

Introduzione

Epatocarcinoma: Epidemiologia e fattori di rischio, Prevenzione, Eziopatogenesi, Carcinogenesi

Anatomia Patologica

Sorveglianza

Diagnosi

1. Strumentale- Ecografia
2. Risonanza Magnetica
3. Tomografia Computerizzata

Stadiazione

Prognosi e storia naturale

Opzioni terapeutiche:

1. Trattamenti curativi: resezione, trapianto
2. Trattamenti percutanei: alcolizzazione percutanea, embolizzazione e chemioembolizzazione intrarteriosa, precision-TACE

Evoluzione tecnologica della TC

TC di perfusione delle lesioni epatiche focali

Ruolo del sorafenib nella terapia dell'HCC in fase avanzata

Razionale per l'uso clinico e studi sull'utilizzo del sorafenib per carcinoma epatocellulare

Considerazioni concernenti l'utilizzo del sorafenib nel carcinoma epatocellulare avanzato

Combinazioni a base di sorafenib

Chemioterapia sistemica per il carcinoma epatocellulare

Tabelle

Scopo della tesi

Materiali e Metodi

Protocollo TC

Post processing dei dati perfusionali

Risultati

Discussione

Bibliografia

## RIASSUNTO ANALITICO

Scopo della tesi è valutare l'applicabilità di un protocollo per lo studio perfusionale quantitativo con TC a 64 canali dell'HCC avanzato in pazienti sottoposti a terapia antiangiogenetica con sorafenib, al fine di predire la risposta precoce al trattamento utilizzando il valore di alfafetoproteina plasmatica come marcatore biochimico di riferimento.

Lo studio sperimentale ha coinvolto 7 pazienti (6 maschi, 1 femmina; età compresa fra 48 e 83 anni, media 69 anni) con diagnosi di HCC sottoposti a valutazione del parenchima epatico con TC a 64 canali, per un totale di 13 HCC. Tutti i pazienti hanno effettuato TC perfusionale immediatamente prima di iniziare il trattamento con sorafenib (tempo zero); sono stati inoltre effettuati controlli mediante lo stesso protocollo TC perfusionale sulle stesse lesioni di interesse dopo uno e/o tre mesi. In tutti i pazienti, inoltre, è stato misurato il valore di alfafetoproteina ( $\alpha$ FP) plasmatica al tempo zero e in occasione dei successivi controlli TC. Utilizzando un software dedicato sono stati calcolati sulle lesioni HCC e sul parenchima epatico circostante i seguenti parametri perfusionali: Blood Flow (BF), Blood Volume (BV), Mean Transit Time (MTT), Hepatic Arterial Fraction (HAF) e Permeability-Surface Product (PS). Tali parametri, misurati al tempo zero rispettivamente sulle lesioni HCC e nel parenchima epatico circostante, sono stati confrontati fra loro; sono stati quindi confrontati fra loro gli stessi parametri perfusionali misurati al tempo zero e ai successivi controlli TC. È stata infine calcolata la correlazione fra ciascun parametro perfusionale al tempo zero e la variazione di  $\alpha$ FP fra l'ultimo controllo TC e il valore di essa misurato al tempo zero.

Al tempo zero i valori di BV, BF, HAF e PS erano significativamente maggiori nelle lesioni HCC rispetto al parenchima epatico circostante, mentre MTT è risultato significativamente minore. Dopo terapia con sorafenib i valori di MTT erano significativamente aumentati rispetto al tempo zero. Inoltre, si è trovata una correlazione inversa statisticamente significativa fra MTT al tempo zero e variazione di  $\alpha$ FP dopo terapia, nonché una correlazione significativa fra quest'ultima e BF.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che lesioni HCC presentano un significativo allungamento di MTT dopo terapia con sorafenib e che il valore di MTT al tempo zero correla inversamente con la riduzione di  $\alpha$ FP dopo terapia. Ciò suggerisce che MTT possa essere utilizzato sia come marcatore della risposta terapeutica, sia come predittore di risposta pre-trattamento in pazienti con HCC avanzato candidati a terapia con sorafenib.

## **INTRODUZIONE**

### **Epatocarcinoma: Epidemiologia e fattori di rischio**

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è il più frequente tumore primitivo del fegato (80-90%); rappresenta più del 5% di tutte le neoplasie, con un'incidenza maggiore di 500.000 nuovi casi/anno su base mondiale [1].

La sua incidenza subisce notevoli variazioni in relazione all'area geografica considerata (*Tabella 1*): in Stati Uniti, Australia e Nord - Europa, è inferiore a 5 casi/100.000 abitanti, mentre risulta più elevata, in Africa ed Asia, con un'incidenza di 20-28 casi/100.000 abitanti [2].

In Italia, la morbilità per HCC, è di 10-12 nuovi casi/100.000 abitanti/anno con mortalità annua di 8 decessi/100.000 abitanti [3].

L'incidenza di HCC aumenta progressivamente con l'età e la variazione geografica della frequenza di malattia è probabilmente in relazione con la diversità dei fattori eziologici implicati (fattori genetici, alimentari ed infettivi).

Il fattore di rischio più significativo risulta essere la cirrosi epatica, specie se secondaria ad infezioni virali o ad abuso di alcol, affiancata di recente dalle forme di steatoepatite non alcolica. Fattori di rischio di minore importanza risultano essere l'emocromatosi e la cirrosi biliare primitiva. È stata osservata, inoltre, una associazione significativa con l'esposizione ad arsenico, cloridrato di vinile e Aflatossina B1, una micotossina elaborata dall'*Aspergillus flavus* che può trovarsi nel grano, nella soia, nell'orzo, nel granturco, nel riso e in prodotti della panificazione, latticini e arachidi.

In Africa ed in Asia Meridionale l'Aflatossina B1, e l'infezione da HBV, alla nascita o nei primi anni di vita, rappresentano i principali fattori di rischio nello sviluppo di HCC; in questi casi la neoplasia si sviluppa in giovane età ed in assenza di cirrosi. In Giappone, Egitto e Sud - Europa è l'HCV a svolgere un ruolo predominante; in questo caso l'HCC si sviluppa in età più avanzata ed in

soggetti cirrotici o con fibrosi in stadio avanzato. Nell'Europa centrale e del Nord i principali fattori di rischio sono rappresentati dall'infezione da HCV e dall'abuso di alcool.

La diversa eziopatogenesi nelle diverse aree geografiche rende ragione della variabilità sia nell'incidenza, che nella presentazione clinica delle patologie. Si rileva una differenza significativa dell'epoca della diagnosi tra i Paesi a bassa e ad alta incidenza: nei primi, infatti, l'HCC è individuato frequentemente ancora in fase asintomatica grazie ai routinari controlli strumentali cui vengono sottoposti i pazienti a rischio, nei secondi invece la diagnosi è spesso più tardiva, sia per l'assenza di controlli regolari, che per la precocità delle condizioni di rischio, con conseguente riscontro di HCC infiltrante o in fase avanzata.

### **Prevenzione**

La migliore strategia di prevenzione per l'HCC è impedire lo sviluppo delle epatopatie e la loro progressione verso la cirrosi.

La principale causa di HCC al mondo è rappresentata dall'infezione da HBV: la vaccinazione nelle aree non ancora coperte potrebbe risultare un metodo efficace di prevenzione. Risultati incoraggianti sono stati ottenuti in alcuni Paesi ad alta incidenza, dove la vaccinazione dei bambini ha portato ad un decremento drastico della neoplasia con un risultato estremamente positivo in termini di rapporto costo/beneficio [4].

In altre aree geografiche dove l'incidenza dell'HCC è correlata all'abuso di alcool ed all'infezione da HCV, si cerca di attuare la prevenzione dell'infezione virale mediante sterilizzazione degli strumenti chirurgici odontoiatrici e di utilizzo estetico e, inoltre, si cerca di effettuare un'individuazione precoce dei soggetti a rischio. Nel mondo occidentale la prevenzione primaria dell'HCC è indicata nei pazienti cirrotici o con fibrosi avanzata, risulta quindi rilevante l'impiego di uno screening per malattie epatiche come la cirrosi, che continua ad essere una patologia non diagnosticata precocemente.

Tuttora dibattuto è il ruolo di eventuali terapie farmacologiche preventive allo scopo di ridurre l'epatocarcinogenesi in soggetti con epatite cronica attiva [5].

### **Eziopatogenesi**

Molti studi epidemiologici hanno dimostrato che l'epatocarcinoma insorge a seguito di infezione virale cronica da HBV o HCV.

L'epatite da virus B (Hepadnavirus a dsDNA) è caratterizzata da un quadro di iniziale fibrosi del parenchima, seguita da franca cirrosi, con accumulo a livello cellulare di molteplici alterazioni genetiche. L'HBV agisce integrando il proprio genoma, nel DNA epatocitario, spesso a livello di geni implicati nella regolazione del ciclo cellulare, determinando instabilità genomica e provocando delezioni, mutazioni e traslocazioni cromosomiche. L'inserimento nel genoma determina alterazione della proliferazione cellulare con continua necrosi epatocitaria, in modo tale da determinare ulteriori alterazioni genetiche critiche da sommare alle precedenti [6,7,8]. Per quanto riguarda il virus C (Flaviviridae a ssRNA) la sua azione è sovrapponibile a quella del virus B, così come per quanto concerne le epatopatie croniche di altra natura [9,10]. Ultimamente si è osservato un continuo aumento dell'infezione da HBV e HCV in concomitanza con l'infezione da HIV: l'associazione comporta una più rapida progressione verso la cirrosi e di conseguenza verso il carcinoma [11].

### **Carcinogenesi**

La trasformazione maligna è un processo multistep in cui l'agente infettivo agisce con meccanismi diretti ed indiretti diversi, a seconda della propria natura, portando alla formazione di un clone neoplastico attraverso alterazioni genetiche [12]. Grazie ad evidenze accumulate negli ultimi due decenni, è ormai accertata l'esistenza di una sequenza di eventi, nell'ambito delle nodularità displasiche, che precedono l'insorgenza dell'HCC; tale continuum di eventi, che da nodulo pre-

maligno comporta la dedifferenziazione in senso maligno, fa sì che le nodularità displasiche, ed in particolare quelle ad alto grado, siano considerate a buon diritto quali precursori dell'HCC [13].

### **Anatomia Patologica**

Il fegato cirrotico è caratterizzato da un totale e completo sovvertimento dell'architettura del parenchima epatico: ne risultano perdita di funzione, noduli di rigenerazione, fibrosi e riduzione della vascolarizzazione, che si associano ad aree di necrosi, di degenerazione grassa e noduli rigenerativi, displastici o neoplastici.

Sebbene nel corso degli anni siano state formulate numerose classificazioni al fine di rendere omogenea la valutazione anatomo-patologica delle nodularità insorte nell'ambito di parenchimi cirrotici, tali classificazioni non sono risultate esenti da critiche [14] e ancora oggi non si è raggiunta una classificazione di riferimento. Allo stato dell'arte, la classificazione utilizzata è quella della letteratura orientale, che suddivide i noduli in rigenerativi, displastici e neoplastici. Tuttavia vi sono ancora molti dubbi nei riguardi del nodulo displastico, inteso come forma intermedia tra nodulo rigenerativo (risposta allo stimolo cronico infettivo) e nodulo neoplastico. Nei riguardi dei noduli displastici la letteratura risulta essere complessa: autori giapponesi classificano i noduli displastici in noduli a basso grado (LGDN) e ad alto grado (HGDN) di malignità, riprendendo la classificazione OMS che rispettivamente li suddivide in iperplasia adenomatosa tipica ed iperplasia adenomatosa atipica [15].

Il concetto di *early HCC* come HCC iniziale (<2cm, privo di capsula) dall'aspetto vagamente nodulare rispetto all'HCC iniziale dal tipico aspetto nodulare (<2cm, capsulato), divide ulteriormente le opinioni degli autori asiatici, che lo considerano appunto una forma iniziale di epatocarcinoma [16], mentre gli autori americani ed europei lo raggruppano tra le lesioni HGDN (francamente maligne) insorte su noduli displastici [17]. La caratterizzazione delle lesioni epatiche, dal punto di vista anatomopatologico, è l'unica in grado di discernere tra le varie forme di HCC: il



nodulo rigenerativo, il nodulo displasico di basso grado, il nodulo displasico di alto grado, l'*early HCC* e l'*HCC* (ben differenziato e moderatamente differenziato).

Al fine di ottenere un generale ed aggiornato consenso internazionale sulle diagnosi istopatologiche delle lesioni nodulari epatiche nell'ambito di un parenchima cirrotico, è stata elaborata e redatta una nuova classificazione dall'International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia (ICGHN, 2009) [18]. In base a tale revisione, sono ad oggi considerate le seguenti forme nodulari:

- nodulo displasico di basso grado (LGDN)
- nodulo displasico di alto grado (HGDN)
- HCC (suddiviso, a sua volta in HCC ben differenziato e moderatamente differenziato).

Per completezza si riporta, insieme alla descrizione di queste lesioni, anche la descrizione del nodulo rigenerativo e dell'*early HCC*.

### ***Nodulo rigenerativo***

Il nodulo rigenerativo è alla base delle alterazioni del fegato cirrotico. Esso si presenta come nodulo capsulato di modeste dimensioni (4mm) che ha tendenza alla confluenza, dando origine a macronoduli rigenerativi (40mm) [19]. Da un punto di vista microscopico è caratterizzato da normali cellule epatocitarie che mantengono intatte le loro funzioni; sono presenti gli spazi portali, è conservato il sistema dei dotti biliari [19,20] e sono rappresentate nel suo contesto anche le cellule del sistema reticolo-endoteliale (cellule di Kupffer). La formazione di tali noduli nel fegato cirrotico fibroso determina, tuttavia, l'alterazione dell'architettura lobulare a causa della compressione da parte del nodulo sul parenchima circostante ed il continuo stimolo proliferativo dato dalla *noxa* patogena. La vascolarizzazione del nodulo ricalca quella del parenchima sano, ovvero la quota dell'irrorazione portale è nettamente superiore (75%) a quella dell'arteria epatica (25%) [21].

### ***Nodulo displasico***

Il nodulo displasico mostra dimensioni maggiori di quello rigenerativo (comprese tra 8mm e 20mm) e da un punto di vista anatomopatologico viene suddiviso in due gruppi: ad alto (HGDL) e basso (LGDL) grado di malignità, in base alle atipie cellulari presenti nel suo contesto [14].

### ***Nodulo displasico di basso grado – LGDN***

Per LGDN si intende una nodularità che macroscopicamente è ben distinta dal parenchima circostante, grazie alla presenza di tralci fibrosi periferici, esiti di processi di cicatrizzazione, particolarmente frequenti nell'ambito dei parenchimi cirrotici.

A livello microscopico si rileva un modesto incremento della densità cellulare; gli epatociti non presentano atipie cellulari né alterazioni strutturali diverse da quelle osservate nell'ambito delle nodularità rigenerative. La loro vascolarizzazione è prevalentemente di origine portale, anche se la quota proveniente dall'arteria epatica rispetto ai noduli rigenerativi risulta aumentata [22]. La funzione biliare è conservata sia in senso metabolico intracellulare, sia in senso escretivo, a livello del canalicolo biliare ed è ancora ben rappresentata nell'ambito di tali noduli.

È opinione comune che i noduli displastici di basso grado di malignità non siano da considerare forme preneoplastiche.

### ***Nodulo displasico di alto grado - HGDN***

I noduli di alto grado di malignità, al contrario, sono ritenuti vere e proprie forme preneoplastiche.

Dal punto di vista microscopico, gli HGDN sono caratterizzati da cellule di ridotte dimensioni con atipie cellulari maggiori [23] (spiccata eosinofilia, aumentato rapporto nucleo-citoplasma, nucleoli evidenti, maggior frequenza di mitosi, aumento della densità cellulare, degenerazione grassa) [24,25], che tuttavia sono insufficienti per porre diagnosi di HCC. Generalmente, l'atipia più frequentemente osservata nell'HGDN consiste nella presenza di “piccole cellule” (questa forma è

conosciuta anche come displasia a piccole cellule), ovvero di epatociti di dimensioni ridotte rispetto alla normale filiera cellulare. Le variazioni a grandi cellule possono essere presenti oppure no nell'ambito di un HGDN.

L'elemento peculiare delle forme displasiche di alto grado è l'aumento della vascolarizzazione arteriosa, dovuto alla presenza delle cosiddette *unpaired arteries*, ovvero arteriole non accompagnate da dotto biliare e ramo portale, con conseguente perdita della struttura del lobulo epatico [26,27,28]. L'HGDN può avere una struttura a carattere nettamente o vagamente nodulare; inoltre, rispetto all'LGDN, non presenta fibrosi perinodulare.

Sebbene nell'ambito degli HGDN sia presente un numero variabile di *unpaired arteries*, maggiore di quanto non riscontrato nei LGDN, tale percentuale risulta inferiore rispetto a quella apprezzabile nell'ambito dei noduli francamente carcinomatosi. L'incremento della componente arteriolare è responsabile della maggiore vascolarizzazione di tali nodularità rispetto al parenchima circostante ed è causa dei fenomeni di ipervascolarizzazione visibili con le metodiche di imaging dinamico. Il criterio attuale di distinzione tra HGDN e *early HCC* è rappresentato dall'assenza di invasione vascolare e settale da parte delle cellule neoplastiche nodulari [29,30]. Inoltre, nei noduli HGDN non sono evidenti shunt artero-venosi, che rappresentano un elemento istologico tipico per la diagnosi di HCC.

### ***Early HCC***

L'*early HCC* si presenta come una lesione di dimensioni inferiori ai 2cm, poco demarcata rispetto al parenchima circostante, dalla forma vagamente nodulare. A livello microscopico le cellule neoplastiche possono presentarsi secondo un pattern trabecolare o ghiandolare. Le cellule mostrano le caratteristiche delle atipie cellulari maggiori, analogamente alle cellule dei noduli displastici di alto grado ma, diversamente dall'HGDN, sono presenti invasione vascolare e settale da parte delle cellule neoplastiche nodulari, che tuttavia non sono facilmente visibili. Per questo motivo l'*early*

*HCC* non è stato considerato dalla dall'International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia (ICGHN, 2009) [18].

Per quanto concerne la vascolarizzazione si assiste sempre più ad un'aumentata quota di “unpaired arteries” [31] rispetto ai noduli displastici ad alto grado di malignità, che contribuiscono all'aumento della vascolarizzazione arteriosa rispetto a quella portale; tale alterazione della vascolarizzazione, però, non risulta ancora essere visibile con le normali indagini diagnostiche, per questo motivo a tale livello risulta difficoltosa la diagnosi differenziale con l'HGDN. Nel 95% dei casi, infatti, l'*early HCC* vagamente nodulare appare isodenso in fase arteriosa nello studio TC contrastografico [31]. Al contrario, all'imaging dinamico l'HCC decisamente nodulare (5%) si presenta iperdenso in fase arteriosa, possedendo una più spiccata vascolarizzazione arteriosa.

### ***Epatocarcinoma - HCC***

Allo stato dell'arte, la diagnosi di HCC si basa, da un punto di vista microscopico, su alcuni cardini quali:

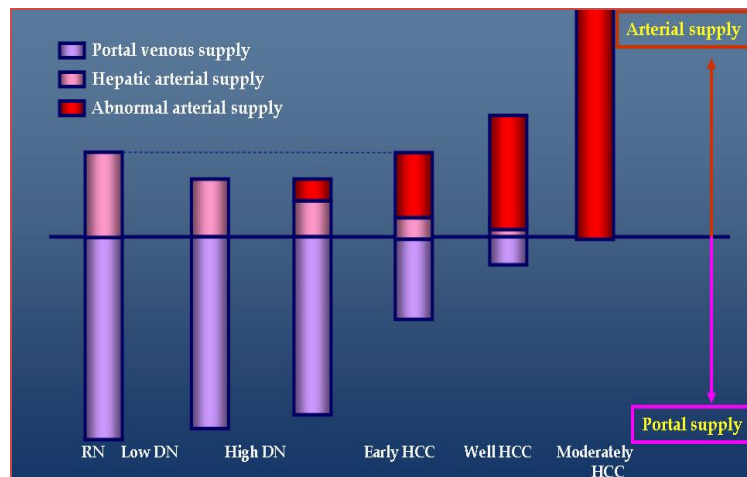
- ✓ incremento della densità cellulare intranodulare maggiore di due volte rispetto al parenchima circostante, con aumento del rapporto nucleo/citoplasma e un pattern cellulare trabecolare sottile e irregolare;
- ✓ tratti portalici di numero variabile all'interno dei noduli;
- ✓ pattern pseudogliandolare delle cellule intranodulari;
- ✓ presenza di “unpaired arteries” in numero variabile.

L'HCC in fase iniziale si presenta nel 60% dei casi come moderatamente differenziato, nel 20% come ben differenziato e nel restante 20% come scarsamente differenziato.

L'HCC in fase avanzata è caratterizzato da caratteristiche morfologiche peculiari: ha forma nodulare, capsula periferica che lo separa dal parenchima circostante e nel suo contesto vi sono setti ed aree necrotico/emorragiche. La classificazione di Eggleston prevedeva la suddivisione dell'HCC

avanzato in una forma nodulare, solida ed infiltrante [32], ma negli ultimi anni, data l'aumentata quota di HCC passibili di terapia chirurgica radicale, la vecchia classificazione è divenuta inadeguata. Ad oggi la classificazione vigente è quella del Liver Study Group of Japan, che ha suddiviso la neoplasia avanzata in neoplasia nodulare semplice, nodulare semplice con crescita extranodale e tipo multinodulare confluyente [33]. Da un punto di vista microscopico l'HCC avanzato può essere suddiviso in ben differenziato, moderatamente differenziato, scarsamente differenziato e indifferenziato o anaplastico. Nelle forme moderatamente e ben differenziate, le cellule sono riconoscibili come derivanti da epatociti e si dispongono secondo pattern trabecolari, acinari o pseudoghiandolari. Nelle forme scarsamente differenziate e anaplastiche le cellule assumono aspetti pleomorfi (da cellule giganti plurinucleate a cellule di piccole dimensioni, totalmente indifferenziate); tali sottotipi di HCC sono difficili da riconoscere. Indipendentemente dal grado di differenziazione l'aspetto comune - e più importante - che contraddistingue l'HCC avanzato rispetto a quello iniziale è la vascolarizzazione: l'angiogenesi diviene preponderante, la capillarizzazione raggiunge il limite massimo e si documenta quindi incremento dei vasi arteriosi e degli shunt artero-venosi, che all'imaging contrastografico dinamico determinano enhancement in fase arteriosa seguito da precoce wash-out di mezzo di contrasto [34].

A differenza di quanto accade in neoplasie di altra origine tissutale, l'attività mitotica e le atipie cellulari non sono particolarmente significative per porre diagnosi di HCC. Per tali motivi, nonostante i molteplici aggiornamenti e le varie rivisitazioni delle classificazioni proposte, a tutt'oggi non esiste un consenso unanime tra i patologi riguardo la diagnosi differenziale tra HGDN e HCC. Si denota, infatti, la presenza di una zona grigia nella diagnosi differenziale tra forme evolute in senso maligno (seppur molto ben differenziate) e forme pre-maligne di alto grado.



**Schema 1:** Caratterizzazione del flusso ematico nella progressione dell'epatocarcinoma [35].

RN, nodulo rigenerativo;

Low DN, nodulo displasico di basso grado;

High DN, nodulo displasico di alto grado;

Early HCC, *early HC*;

Well HCC, HCC ben differenziato;

Moderately HCC, HCC moderatamente differenziato;

## Sorveglianza

Le procedure di sorveglianza clinica e strumentale hanno il duplice scopo di ridurre la mortalità malattia-specifica e di aumentare la sopravvivenza, attraverso la diagnosi precoce della malattia in esame, in modo da fornire al paziente la miglior strategia terapeutica possibile.

L'HCC presenta tutte le caratteristiche che giustificano l'impegno in un programma di sorveglianza, e pertanto lo screening dell'HCC è diventato un aspetto condiviso della gestione dei pazienti con malattie epatiche in stadio avanzato. Per "screening" si intende l'esecuzione di un test che permetta la diagnosi di una patologia ad uno stadio in cui l'intervento terapeutico possa aumentare significativamente la sopravvivenza del paziente. La "sorveglianza" consiste nell'applicazione ripetuta di tale test nel tempo. I test di screening più comunemente utilizzati per l'HCC sono il dosaggio dell'alfafetoproteina sierica ( $\alpha$ FP) e l'esame ecografico [36].

**$\alpha$ FP.** È stato il marcatore più utilizzato nei primi studi condotti sulla sorveglianza dell'epatocarcinoma. Un aumento dei livelli plasmatici di  $\alpha$ FP, tuttavia, si verifica anche per patologie epatiche aspecifiche, quali epatite virale e esacerbazione di patologia cronica: infatti, individui con infezione virale ma senza HCC possono presentare livelli di  $\alpha$ FP elevati in modo transitorio, persistente o intermittente.

Questi incrementi sono da attribuire ad una esacerbazione dell'epatite, in maniera più certa quando si accompagnano ad un aumento concomitante dei livelli di transaminasi, indicativo di infezione attiva o di sierconversione. Nel caso in cui non vi sia aumento delle transaminasi, diventa difficile fare diagnosi differenziale tra infezione virale ed HCC. Tuttavia i livelli di  $\alpha$ FP, in presenza di epatocarcinoma, tendono ad aumentare in modo più cospicuo ed il loro intervallo statistico supera quello osservato in assenza di tumore. Attualmente non esiste un preciso intervallo di valori per cui si possa considerare che il paziente sia o meno affetto da epatocarcinoma, poiché i valori risultano diversi in gruppi di pazienti rispettivamente con cirrosi HBV-correlata e HCV-correlata e – cosa più importante – la specificità non va di pari passo con la sensibilità del test [37]: in altri termini, se il livello soglia dell' $\alpha$ FP per la diagnosi dell'HCC aumenta per esempio, da 20 mg/L a 100 mg/L, la sensibilità del test diminuisce dal 39% al 13%, mentre la specificità aumenta [37].

Le caratteristiche del dosaggio dell' $\alpha$ FP come screening sono state riportate in tre studi, nei quali è stata ottenuta una sensibilità dal 39% al 64%, una specificità dal 76% al 91% ed un valore predittivo positivo dal 9% al 32% [37,38,39].

Il dosaggio dell' $\alpha$ FP viene utilizzato per lo screening, come indice di risposta alla terapia e di recidiva di malattia. Tuttavia, il dosaggio del marcatore ha valore diagnostico solo nel caso in cui in un paziente cirrotico, in presenza di nodulo epatico, si eleva al di sopra di 200 ng/mL [40]. In tal caso, comunque, le linee guida prevedono l'esecuzione di un altro test diagnostico a confermare la diagnosi di malattia.

**Ecografia.** L'ecografia è la tecnica più utilizzata per lo "screening" nei pazienti cirrotici, è dotata di elevata sensibilità e di facile riproducibilità, e, inoltre, permette di identificare lesioni minori di 1-2cm. Attraverso l'ecografia è possibile individuare alcuni aspetti tipici dell'epatocarcinoma: la presenza della capsula e l'invasione neoplastica - della vena porta, delle vene epatiche o della vena cava superiore - mediante l'individuazione di trombi neoplastici e la presenza di shunt artero-venosi.

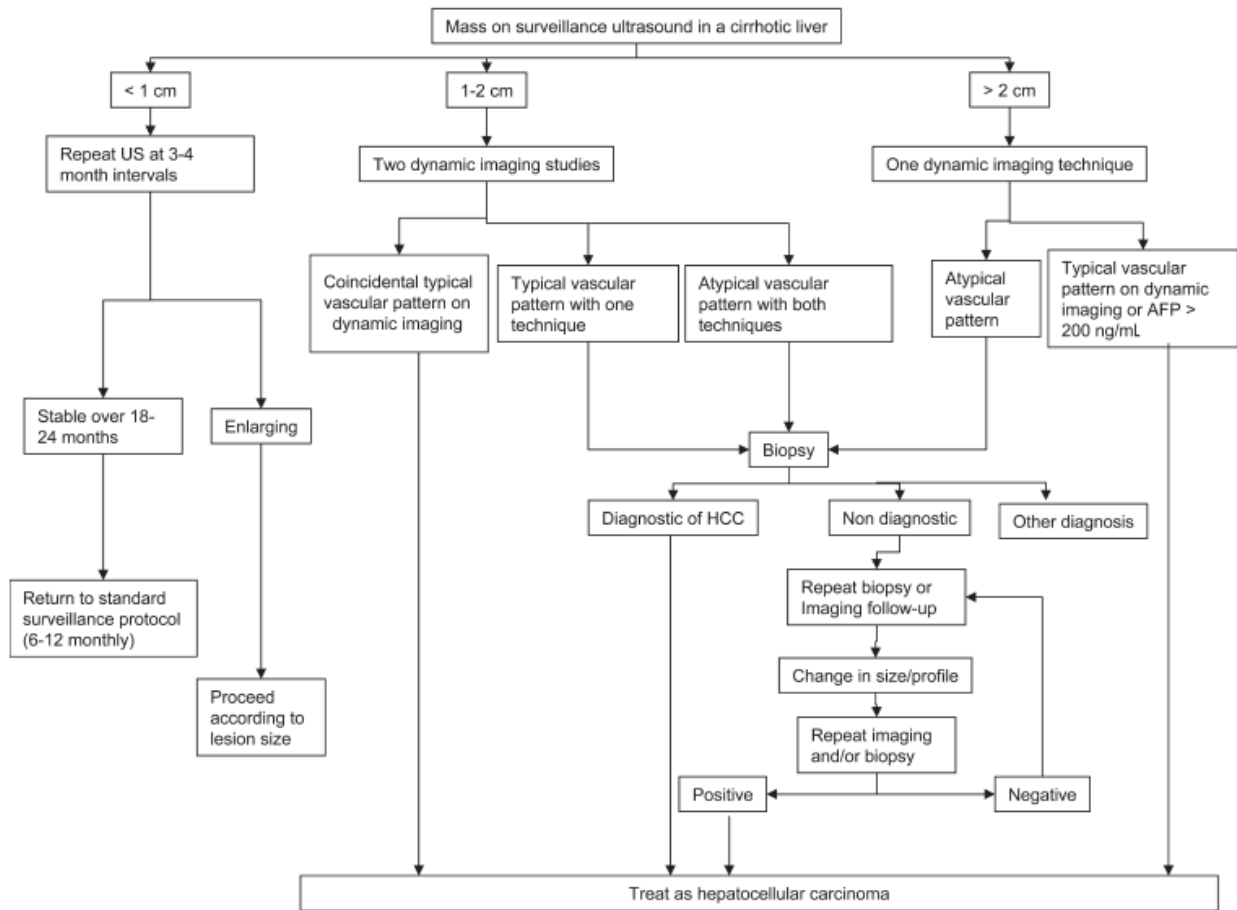
Sono stati condotti vari studi clinici, allo scopo di individuare la popolazione target della sorveglianza: in uno studio su 463 soggetti cirrotici, monitorati per una media di 38 mesi, hanno identificato quali fattori di rischio per lo sviluppo di HCC il sesso maschile, l'età superiore a 55 anni, la positività per HCV e l'alterazione degli indici di funzionalità epatica [41].

Le caratteristiche dello studio ecografico come test di screening per l'HCC sono state definite sia in pazienti cirrotici che in portatori sani dell'antigene di superficie HbsAg, positivi anche per HbeAg: sono pazienti in cui l'infezione non ha avuto esito ed è stata risolta (l'avvenuta infezione si distingue dalla vaccinazione perché i soggetti vaccinati hanno solo l'HBsAg). È stata riportata una sensibilità del 78% e del 71%, rispettivamente, ed una specificità del 93%. Il valore predittivo positivo è stato del 14% e del 73% [38,39]. Nei diversi studi, gli intervalli di sorveglianza variano da 3 mesi ad 1 anno, ma, sulla base dei dati di accrescimento tumorale, sembra adeguato un intervallo di 6 mesi. Infatti, il tempo che una lesione neoplastica impiega a divenire evidenziabile strumentalmente, tempo di evidenza clinica del tumore (diametro di almeno 2cm) è compreso tra i 4 e i 12 mesi [42], con un tempo medio di raddoppiamento del tumore di 117 giorni [43].

Le più recenti linee guida propongono l'utilizzo associato di ecografia e dosaggio di  $\alpha$ FP da eseguire ogni 6-12 mesi in pazienti cirrotici [44].

In presenza di un nodulo sospetto indagato con l'ecografia, l'iter comunemente applicato nella scelta del successivo iter diagnostico è quello suggerito nelle Linee Guida di riferimento, redatte nel 2005 dall'EASL [44], che dipende dalle dimensioni del nodulo, secondo il seguente algoritmo:





**Schema 2:** Schema di trattamento redatto dalla Consensus Conference di Barcellona nel 2005 (criteri EASL, European Association for the Study of the Liver) 2005 [45].

- i noduli di dimensione inferiore al cm vengono seguiti ogni 3-6 mesi almeno per 2 anni consecutivi e - se non si documenta un aumento della dimensione - la sorveglianza si svilupperà come da linee guida ogni 6-12 mesi, questo poiché presentano una bassa percentuale di viraggio nella forma neoplastica nonostante l'ipervascolarizzazione in fase arteriosa documentata alla TC o alla RM. [46].

- Al contrario i noduli di 1-2cm devono essere indagati almeno con due tecniche di imaging scelte tra US, TC e RM: se la lesione presenta il tipico pattern contrastografico si fa diagnosi di HCC, altrimenti se le indagini non sono dirimenti ovvero il pattern contrastografico risulta essere diverso

dal reperto tipico di HCC, la lesione verrà ulteriormente indagata tramite biopsia. Qualora la biopsia sia negativa, la sorveglianza della lesione prevede un intervallo temporale ristretto rispetto a quello consigliato nelle linee guida (2-3 mesi).

- Infine, per porre diagnosi nei confronti di noduli superiori ai 2cm, se caratterizzati da un comportamento contrastografico tipico, sarà sufficiente ricorrere ad un solo studio di imaging; qualora invece l'enhancement risultasse dubbio o atipico si dovrà procedere a tecniche invasive come la biopsia.

## **Diagnosi**

Il miglior modo di effettuare diagnosi precoce è inserire i pazienti epatopatici in protocolli di screening. La maggior parte delle diagnosi nel mondo occidentale viene posta in fase asintomatica, nella valutazione pretrapianto di pazienti epatopatici cronici o durante lo screening nei pazienti cirrotici. L'HCC viene generalmente diagnosticato da epatologi o gastroenterologi e la diagnosi viene posta considerando la clinica, le caratteristiche di imaging, il dosaggio dell' $\alpha$ FP ed eventualmente la biopsia epatica [47].

L'epatocarcinoma, dal punto di vista clinico, dà segno di sé in fase avanzata; i sintomi precoci sono aspecifici e solitamente vengono attribuiti all'epatopatia di base, che provoca una insufficienza epatica secondaria e maschera la presenza della neoplasia.

Tale neoplasia può diventare sintomatica per varie cause: una rapida crescita neoplastica può determinare dolore se il tumore è superficiale e distende la glissoniana rapidamente; purtroppo c'è necessità che il tumore raggiunga dimensioni discrete per dare sintomo di sé e le considerevoli capacità di riserva del fegato rendono manifesta un'insufficienza epatica solo quando avvenga la sostituzione della maggior parte del parenchima; inoltre i sintomi possono essere il risultato della diffusione metastatica. L'esordio clinico dell'HCC è quindi insidioso e la malattia decorre silente nei primi stadi rendendo difficile una diagnosi precoce. I sintomi classici sono rappresentati da:

malessere generale, astenia profusa, dolore sordo, profondo ed ingravescente in ipocondrio destro ed in epigastrio, sensazione di distensione addominale ed altri sintomi aspecifici quali febbre, anoressia, senso di ripienezza postprandiale e calo ponderale. Altri sintomi di minor frequenza sono da riferire a localizzazioni peculiari della neoplasia: ittero, se la massa tumorale comprime le vie biliari principali; forti dolori addominali, se vi è distensione della capsula glissoniana o coinvolgimento del peritoneo. I reperti obbiettivi sono anch'essi aspecifici e da considerare sovrapponibili all'epatopatia di base, anche se in aree endemiche la presenza di epatomegalia e dolore possono portare al sospetto della patologia.

In uno studio condotto su un campione di 461 pazienti con HCC i sintomi di presentazione erano così distribuiti: 23% asintomatici, 32% dolore addominale, 9% malessere, 8% febbre, 8% ascite, 6% anoressia, 4% calo ponderale, 4% emorragia, 2% encefalopatia [48].

Per effettuare la diagnosi di HCC, oltre al sospetto clinico, risulta fondamentale un accurato studio di imaging mediante acquisizioni dinamiche dopo somministrazione endovenosa di mezzo di contrasto, in cui è possibile vedere i noduli con scansioni in fase arteriosa, portale e tardiva.

La diagnosi di HCC si basa, sia per l'indagine ecografica che per TC e RM, sull'identificazione dell'impregnazione del contrasto in fase arteriosa (ritardo di scansione di 30-40 secondi) con successiva dismissione in fase portale (ritardo di scansione di 70-80 secondi) e tardiva (ritardo di scansione di 180 secondi). Infatti, mentre il normale parenchima epatico è vascolarizzato prevalentemente (75%) dal sangue portale e per la restante quota (25%) dall'arteria epatica, l'HCC ha una vascolarizzazione prevalentemente arteriosa: rispetto al restante parenchima, la quota di sangue proveniente dall'arteria epatica è molto maggiore, in proporzione, per la neoangiogenesi contestuale, tale peculiarità risulta sufficiente a porre diagnosi di certezza [49]. L'identificazione del tipico pattern contrastografico permette di fare diagnosi di HCC con un valore predittivo positivo di circa il 90-100%, sostanzialmente equiparabile per le tre metodiche di imaging sopra menzionate [50,51,52].

## 1.ECOGRAFIA

All'indagine ecografica, i noduli si presentano con ecogenicità diversa in funzione delle dimensioni: noduli minori di 3cm sono di solito ipoecogeni, omogenei ed a margini ben definiti; le lesioni maggiori di 3cm appaiono più spesso disomogenee, per l'alternarsi di aree di necrosi, emorragia e fibrosi interstiziale. Quando visibile, la capsula appare come una rima ipoecogena [53].

Per quanto riguarda la valutazione del flusso sanguigno, a livello delle lesioni tumorali, il Color Doppler permette una valutazione in tempo reale dell'emodinamica dei tumori epatici, mentre la modalità di Power Doppler contribuisce ad una migliore valutazione del flusso sanguigno [54,55]. Le limitazioni nell'individuazione del flusso lento e dei vasi profondi si sono opposte, tuttavia, alla diffusione di questa metodica su vasta scala, per la valutazione dell'emodinamica tumorale [55,56]. Ulteriori artefatti causati dal movimento cardiaco e/o respiratorio risultano modificare la valutazione precisa delle informazioni emodinamiche.

I mezzi di contrasto (mdc) ecografici hanno reso possibile la valutazione più accurata del wash-in e del wash-out della lesione, con conseguente aumento della specificità della metodica nel porre diagnosi differenziale tra nodularità preneoplastica e *early HCC* [57]. Fra questi si annoverano l'aria, impiegata inizialmente; successivamente il Levovist (Schering, Germany) [58], a base di galattosio; micro bolle di seconda generazione come il SonoVue (Bracco, Italy), sospensione acquosa stabilizzata di microbolle contenenti esafluoruro di zolfo; oppure il Sonazoid (Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan), sospensione lipidica stabilizzata di microbolle contenenti perfluorobutano.

Le microbolle attualmente utilizzate in ecografia rappresentano una classe unica di materiali: esse sono contenute in membrane biologicamente inerti, hanno diametro più piccolo di 7micron, attraversano il letto capillare rimanendo all'interno del compartimento vascolare e raggiungono indenni il circolo polmonare, dal quale vengono eliminate con la respirazione. La loro rilevazione mediante interazione con ultrasuoni è strettamente correlata alle proprietà fisiche delle microbolle

che, aumentando le interfacce ultrasonore all'interno del lume vasale, determinano un aumento della riflessione del fascio US.

Le microbolle vengono meglio individuate rispetto ai tessuti stazionari e un indice meccanico di 0.2 è ottimale per lo studio ecocontrastografico, che avviene rilevando la frequenza fondamentale del segnale oppure (attraverso appositi filtri) sue armoniche.

L'utilizzo delle microbolle nell'imaging ad US è stato considerato di recente come mezzo di misurazione del volume e del flusso ematico [59]. Il volume ematico calcolato correlando la curva dell'enhancement contrastografico con un modello esponenziale è stato scoperto correlare bene con le misure assolute di flusso sanguigno in studi su fantoccio e in esperimenti di flusso miocardico, condotti su animali, utilizzando microsferi radiomarcate. Tuttavia, la limitata profondità di penetrazione, l'elevata dipendenza dall'operatore e la scarsa disponibilità di software di elaborazione rimangono un limite alla diffusione universale degli US per l'imaging vascolare [60,61].

Infine, microbolle legate a ligandi facilitano il legame di questi ultimi con il loro target a molecole specifiche di membrana: ciò permette il loro utilizzo per il trasporto selettivo di farmaci (*drug delivery*) [62,63].

## **2.RM**

La RM è un'indagine di secondo livello, maggiormente tollerata dal paziente rispetto alla TC, sia per i differenti mezzi di contrasto applicati, sia per l'assenza di radiazioni ionizzanti.

A differenza di quanto accade nell'indagine TC, allo studio RM, la visualizzazione dei noduli risulta influenzata da molteplici fattori quali composizione molecolare della lesione, dimensioni, vascolarizzazione, stato del parenchima perilesionale; questi fattori essendo variabili da paziente a paziente, rendono difficile prevedere il comportamento dell'HCC e delle forme pre-maligne [64,65]. Tipicamente le lesioni HCC, caratterizzate da un'alta concentrazione cellulare ed un

maggior apporto vascolare rispetto al parenchima circostante, sono ipointense in T1 ed iperintense in T2, tuttavia, la presenza di glicogeno, cellule chiare, rame, ferro o degenerazione grassa, sono alla base della variabilità di segnale dell'HCC [66].

All'analisi RM, i piccoli noduli HCC appaiono ipointensi nelle sequenze T1 pesate e, in quota minore, possono risultare iso o iperintensi, mentre, nelle sequenze T2 pesate si presentano in ordine decrescente di frequenza come iperintensi, ipointensi, e iso-intensi [67]. Al contrario, le nodularità displasiche, dati i differenti componenti intracellulari, mostrano intensità di segnale quanto mai variabili.

È stato ormai accertato che l'intensità di segnale delle nodularità, nel contesto di un parenchima cirrotico, risulta correlata con il grado istologico di differenziazione [68,69]:

La iperintensità in T1 delle lesioni potrebbe essere legata alla presenza di degenerazione grassa, glicogeno o rame intranodulare [66], queste sono componenti caratteristiche dei noduli aventi displasia di basso grado, che vanno riducendosi a mano a mano che il nodulo evolve in senso pre-maligno (HGDN) e maligno (HCC). Al contrario, la iperintensità nelle sequenze T2 cresce negli HCC moderatamente e scarsamente differenziati [70] mentre i noduli di basso e alto grado risultano, rispettivamente, ipo- o iso-intensi rispetto al parenchima circostante. La presenza di depositi intracellulari di ferro può ridurre l'intensità del segnale, soprattutto in T2; mentre una bassa intensità di segnale nelle sequenze T1 pesate può essere presente in relazione alla presenza di tessuto fibroso.

Questi dati indicano che l'intensità di segnale delle lesioni, nelle acquisizioni basali, può aiutare nella diagnosi differenziale tra nodularità maligne e premaligne. Tuttavia allo stato dell'arte non sono riportate valutazioni a riguardo che siano effettuate su un ampio numero di pazienti cirrotici [71] e pertanto si rende necessario, per indagare meglio la lesione, l'utilizzo di un mezzo di contrasto paramagnetico.

I mezzi di contrasto hanno la caratteristica di determinare una modifica dei tempi di rilassamento dei tessuti, responsabile della variazione dell'intensità di segnale delle strutture permeate. Un esempio è rappresentato dal Gd-BOPTA (MultiHance®) o dal Gd-DTPA (Magnevist®), la cui applicazione permette di ottenere studi post contrastografici ottimali per l'individuazione e la caratterizzazione delle focalità epatiche [72].

I mezzi di contrasto disponibili sono di due diversi tipi:

- a distribuzione intravascolare-interstiziale, si distribuiscono in maniera simile al mezzo di contrasto iodato;
- epato-specifici (reticolo-endoteliali ed epatobiliari).

La scelta del mezzo di contrasto dipende sostanzialmente dal quesito clinico per il quale il paziente giunge all'esame RM e condiziona notevolmente l'esito, in termini di sensibilità e specificità diagnostiche, dell'esame:

1. i mezzi di contrasto intravascolari-interstiziali vengono introdotti per via endovenosa e si distribuiscono nel torrente circolatorio nella prima fase post iniezione, passando successivamente nello spazio intercellulare e determinando quindi una impregnazione dello stroma pericellulare, dal quale vengono richiamate secondo un processo di osmosi, quando la loro concentrazione intravascolare si riduce rispetto a quella stromale. L'effetto paramagnetico di tali sostanze si esplica mediante l'accorciamento del tempo di rilassamento T1 e le immagini acquisite per visualizzare l'effetto del farmaco sono immagini T1 pesate [73,74]. Tali mezzi di contrasto vengono successivamente escreti per via renale, così come i mezzi di contrasto iodati applicati nel corso degli studi TC;
2. i mezzi di contrasto epato-specifici rappresentano un gruppo peculiare di mezzi di contrasto, formulati appositamente per lo studio del parenchima epatico. Tali sostanze vengono captate mediante trasporto attivo a livello intracellulare epatico e successivamente metabolizzate. Ne sono esempi i mezzi di contrasto reticolo-endoteliale e quelli ad escrezione epatobiliare.

Nel corso degli ultimi anni sono stati proposti mezzi di contrasto a distribuzione intravascolare-epatobiliare: il Gd-BOPTA (MultiHance®) ed il Gd-EOB-DTPA (Primovist®). Entrambi presentano sia la fase intravascolare che una fase intracellulare data la captazione attiva della molecola da parte del polo vascolare dell'epatocita. Questi mezzi di contrasto combinano le proprietà di un agente extracellulare con quelle di un target epato-specifico [75,76]; entrambi permettono di ottenere una valutazione accurata e affidabile dell'enhancement lesionale e una valutazione della funzionalità metabolica dell'epatocita nelle immagini acquisite in fase tardiva [77].

Il Gd-EOB-DTPA (Primovist®) ha una captazione epatocitaria non saturabile e una eliminazione fecale non elevata, in più ha una peculiarità che lo distingue dal Gd-BOPTA, infatti, la quota di questo mezzo di contrasto escreta per via biliare ammonta a circa il 50% della quantità totale di mezzo iniettato, a differenza di quanto accade per il Gd-BOPTA, per il quale la quota escreta nella bile è di circa il 2-4% [78]. Tale differenza rende il picco di enhancement da parte del parenchima epatico più precoce (20 minuti dopo l'iniezione) rispetto a quello del Gd-BOPTA. Mediante uno studio RM condotto con mezzo di contrasto epato-specifico a tre differenti dosi (12,5; 25 e 50 µmol per kg di peso corporeo) e acquisizione di immagini T1 pesate dopo 20 e 45 minuti dalla somministrazione, sia in condizioni basali, sia dopo somministrazione di mezzo di contrasto, è stato determinato da Reimer et al, nella fase II dello studio, un incremento nella frequenza di rilevamento di lesioni focali epatiche con conseguente miglioramento diagnostico grazie all'utilizzo di Gd-EOB-DTPA. Tipicamente, infatti, le lesioni epatiche maligne sia primitive sia secondarie, risultano prive di epatociti funzionanti o sono costituite da masse cellulari di origine non epatocitaria. Essendo il mezzo di contrasto captato selettivamente dagli epatociti funzionanti, esso non viene captato e/o metabolizzato dalle cellule, determinando assenza di segnale nella fase di acquisizione dedicata.

Anche in questo caso, nelle acquisizioni con mezzo di contrasto, vengono acquisite immagini in fase arteriosa precoce, arteriosa, portale e tardiva, come in TC, in modo da valutare l'enhancement



della lesione nelle sequenze utili per porre diagnosi differenziale [79]. Inoltre, è stato dimostrato come il Gd-EOB-DTPA venga completamente eliminato dal corpo attraverso le urine e le feci entro 24 ore dalla iniezione intravenosa.

L'attuale protocollo RM a 1,5 Tesla prevede di acquisire immagini basali e con mezzo di contrasto pesate sia in T1 che in T2 in modo da chiarire le differenti componenti della lesione e capirne meglio la natura. Sono comprese nel protocollo sequenze ad eco di gradiente (GRadient Echo, GRE) in fase e fuori fase, nonché sequenze GRE 3D con preparazione dell'impulso di magnetizzazione con soppressione del segnale del grasso [80].

L'acquisizione delle immagini T1 e T2 basali è fortemente consigliato, in particolare nei casi in cui si voglia fare una diagnosi differenziale tra nodularità pre-neoplastiche/neoplastiche; le immagini T2 pesate permettono di valutare la presenza di fluidi, tessuto fibroso e contenuto di ferro sia nel parenchima epatico che intralesionale (rispettivamente correlato con una intensità di segnale alta, bassa, e molto bassa) [81]. Riguardo alle sequenze T1 pesate in condizioni basali, esse sono utili per evidenziare la presenza di grasso intralesionale (in particolare, a tal fine sono applicate le sequenze SPGR) o di glicogeno, responsabili di una alta intensità di segnale delle nodularità [82]. Da un punto di vista diagnostico, si è documentato un incremento sensibile nella detezione lesionale nelle sequenze ottenute in fase epatobiliare rispetto alle sequenze ottenute nelle differenti fasi post contrastografiche dinamiche.

Grazie alla introduzione di apparecchi ad alto campo (1,5-3T) ed alla introduzione di sequenze 3-D ultrafast, è oggi possibile acquisire numerose fasi post contrastografiche in tempi molto ravvicinati, ottenendo una valutazione dinamica sovrapponibile a quella ottenuta con uno studio TC. Lo studio dinamico del parenchima epatico viene eseguito con sequenze T1 pesate 3D-GRE breath-hold (a respiro trattenuto), con spessori di strato tra 3 o 5mm, e sezioni contigue o parzialmente sovrapposti [83]. La valutazione dello studio post contrastografico termina infine con la acquisizione di una sequenza 3D- GRE breath-hold in fase epatobiliare dopo circa 20-40 minuti, a seconda del mezzo di

contrasto epatospecifico utilizzato, al fine di valutare la captazione del mezzo di contrasto in fase epatobiliare.

### 3.TC

Lo sviluppo dell'ecocontrastografia, della TC multidetettore e la diffusione di mezzi di contrasto epatospecifici e di sequenze ad alta risoluzione spaziale e temporale in RM, hanno permesso un incremento di sensibilità e specificità delle metodiche di imaging, rendendo il ricorso alla biopsia sempre più raro. Pertanto, mentre nel 2000 veniva consigliato l'esame istologico per la diagnosi di HCC [2], le linee guida del 2005 fanno ricorso alla biopsia solo in caso di lesioni con pattern contrastografico atipico, prive pertanto della tipica impregnazione in fase arteriosa [83]. Tali noduli possono infatti essere espressione di ciò che è stato definito come *very early HCC* (HCC precocissimo) in cui istologicamente si riconoscono solo alcuni foci di degenerazione neoplastica ed il cui trattamento precoce incrementa notevolmente la sopravvivenza del paziente.

La TC multidetettore è, tra queste, l'indagine principe per la diagnosi di HCC, questo perché garantisce un'alta risoluzione delle immagini in un tempo di acquisizione sempre più breve e una caratterizzazione specifica delle lesioni focali epatiche [84]. È una metodica utilizzata per diagnosi, stadiazione loco-regionale, follow-up dopo trattamento e per lo staging anche in caso di recidive. Lo studio TC prevede, dopo l'acquisizione di una serie precontrastografica, una valutazione del parenchima epatico dopo somministrazione endovenosa di mdc in fase arteriosa, porto-venosa e tardiva, ottenuta rispettivamente 30-40 secondi, 70-80 secondi e 180 secondi dopo l'inizio dell'introduzione di mdc. La fase arteriosa è fondamentale nell'imaging dell'HCC, che presenta netto enhancement contrastografico rispetto al parenchima epatico circostante, in quanto la vascolarizzazione del tumore è prettamente derivante dall'arteria epatica anziché dalla vena porta

come nel parenchima circostante: questo è in accordo con la fisiopatologia dell'HCC, i cui circoli neoangiogenetici sono normalmente sostenuti soltanto da rami dall'arteria epatica [85,86].

Oltre a questo per porre diagnosi di HCC è necessario dimostrare il precoce e aumentato wash-out della lesione nella fase porto-venosa e di equilibrio, dovuto alla presenza di shunt artero-venosi che riducono nettamente il tempo di transito del sangue all'interno della lesione e di conseguenza anche del mezzo di contrasto.

La fase tardiva è utile per aumentare la sensibilità dell'individuazione del wash-out di mdc e può consentire di identificare la pseudocapsula perilesionale [87], la presenza di un alone iperdenso (corona) è da considerarsi diagnostico, anche in assenza di iperdensità in fase arteriosa tardiva o di ipodensità in fase venoso- portale, esso riflette negli HCC moderatamente differenziati il drenaggio venoso principale che non è più a carico delle venule epatiche ma delle venule portali a livello della capsula, ed è presente in circa il 20% delle neoplasie [35,88].

La notevole rapidità di acquisizione delle moderne apparecchiature TC multistrato (fino a 64 strati e oltre) rende possibile l'acquisizione, prima della fase arteriosa parenchimale per l'individuazione e la caratterizzazione di focalità ipervascolari epatiche, di una fase arteriosa precoce (o angiografica), ottenuta in corrispondenza del picco di enhancement aortico [89], che permette di ottenere un accurato mapping pretrattamento dell'anatomia arteriosa del fegato.

Per la temporizzazione delle fasi contrastografiche è possibile utilizzare tempi di ritardo fissi calcolati sulla media statistica della popolazione oppure, in maniera più precisa, è possibile effettuare acquisizioni con ritardi di scansione dipendenti dal tempo di circolo del singolo paziente.

Quest'ultimo processo si realizza, una volta iniettato il bolo di contrasto, posizionando una ROI su un vaso di riferimento (tipicamente l'aorta) e programmando l'inizio delle varie acquisizioni contrastografiche a ritardi dipendenti dal tempo di arrivo del mdc all'interno del vaso di riferimento, rilevabile visivamente o mediante misura automatica della densità intravascolare ad intervalli

temporali ravvicinati su una sezione fissa predefinita con modalità a bassissima dose radiante (tecnica fluoroscopica).

Detto questo, un *HCC ben differenziato* risulterà isodenso o ipodenso in fase porto-venosa e tardiva rispetto al parenchima circostante, dato che la vascolarizzazione portale al suo interno sarà ridotta, ma non del tutto assente [90]. E' possibile anche riscontrare HCC non ipervascolari nella fase arteriosa (HCC ipovascolari) e riconoscibili come ipodensi nelle fasi successive, soprattutto se scarsamente differenziati e di grandi dimensioni, in rapporto alla presenza di necrosi intralesionale che interessa anche l'endotelio.

Per quanto concerne i *noduli displastici*, su di essi non esistono specifici patterns di riconoscimento allo studio TC per porre diagnosi di certezza. Le modificazioni del circolo si riscontrano in fase portale e tardiva, poiché le arterie sono poco rappresentate in questa fase di malattia in entrambi i sottogruppi nodulari (HGDN e LGDN), e si dimostra anche un tardivo wash-out del nodulo rispetto al parenchima sano circostante dovuto a decremento dell'apporto portale. Pertanto la diagnosi di nodulo displastico si pone nel caso in cui si apprezza un nodulo generalmente inferiore a 1-2cm (oppure maggiore di 2cm in casi sporadici) ipodenso durante l'intero studio di fase oppure con nodularità rotondeggiante visibile in fase tardiva e di bassa densità [91]. *L'early HCC* solo nel 5% dei casi mostra pattern tipico contrastografico; la situazione più comune è data da isodensità in fase arteriosa e portale con ipodensità in fase tardiva.

Al contrario *l'HCC decisamente nodulare* nel 96% dei casi mostra iperdensità in fase arteriosa [92].

Esistono differenze, seppur minime, tra le varie forme preneoplastiche e francamente neoplastiche di HCC, tuttavia alcuni studi dimostrano la significativa differenza di sensibilità della TC nei riguardi dell'HCC (68-75%) e della displasia (39-60%) [93]. La sensibilità inoltre dipende anche dalle dimensioni del tumore, importante fattore non modificabile ai fini dell'acquisizione.

Per la diagnosi di HCC si utilizzano oggi i criteri EASL che per le lesioni focali inferiori al centimetro considerano necessario solo il follow up; per lesioni focali tra 1 e 2cm considerano sufficiente la concordanza di 2 tecniche di imaging a scelta tra ecografia con mezzo di contrasto, TC e RM che evidenzino un comportamento dinamico tipico, e nel caso infine di noduli di dimensioni superiori ai 2cm è considerata diagnostica la concordanza di 2 tecniche di imaging con pattern contrastografico tipico, oppure in alternativa una sola tecnica di imaging associata a valori di  $\alpha$ FP superiori ai 200 ng/mL).

### **Stadiazione**

La stadiazione delle neoplasie ha lo scopo di suddividere i pazienti in gruppi distinti in base all'aspettativa di vita, al fine di individuare la strategia terapeutica più appropriata. Nell'HCC è più difficile che in altre neoplasie individuare sistemi di stadiazione ben codificati e universalmente accettati in quanto nella quasi totalità dei casi la neoplasia insorge in pazienti affetti da cirrosi epatica, La patologia sottostante rende difficoltosa la stadiazione ma è necessario tenerne conto in quanto il più delle volte è l'elemento condizionante la prognosi. Secondo la Conferenza di Barcellona [2], la stadiazione deve tener conto delle caratteristiche del tumore, della funzione epatica, delle condizioni generali del paziente e delle prospettive terapeutiche di ciascun individuo. La classificazione più largamente utilizzata per la valutazione della gravità e della prognosi della malattia epatica è la classificazione di Child-Pugh (*Tabella 2*) il cui principale difetto è la scarsa capacità predittiva, legata al fatto che non tiene conto della variabilità clinica e biochimica della malattia.

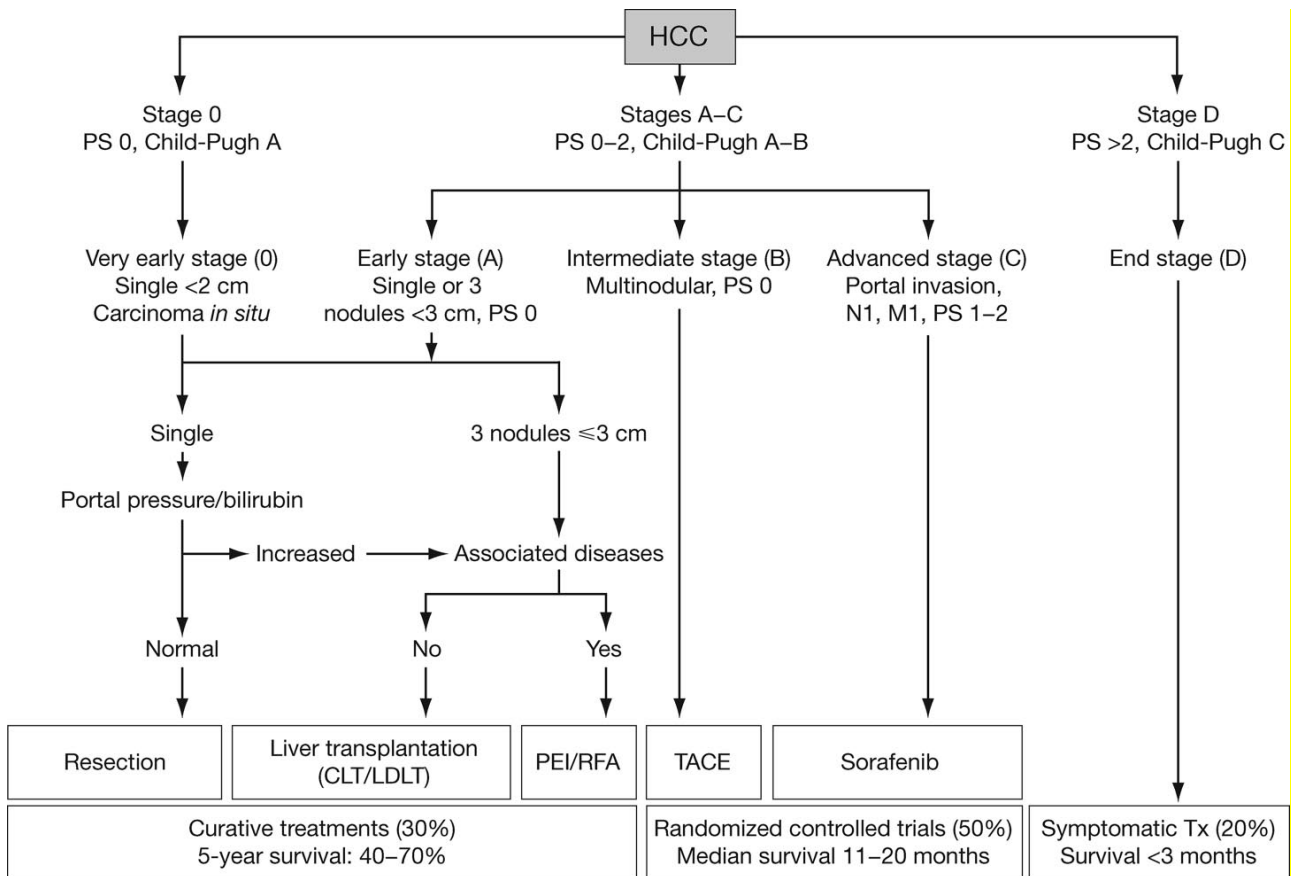
Il primo sistema di classificazione fu proposto da Okuda nel 1985; esso include variabili che valutano la funzione epatica in associazione alle dimensioni del tumore (*Tabella 3*). In questo sistema, però, importanti parametri come l'unifocalità o la multifocalità del tumore, l'invasione vascolare e la presenza di localizzazioni extraepatiche non sono inclusi.

Altro sistema di stadiazione per l'HCC è il sistema TNM (*Tabella 4,4a*) che, giunto alla sua sesta revisione, ha come limite principale di non includere parametri di funzionalità epatica e di richiedere indagini invasive.

La stadiazione CLIP (Cancer of the Liver Italian Program) (*Tabella 5*) è stata creata utilizzando un database di 435 pazienti con l'intento di superare le classificazioni TNM (*Tabella 4,4a*) ed Okuda. Rispetto a queste ultime, il CLIP ha dimostrato maggior accuratezza e maggior capacità di discriminare gruppi omogenei [94].

Attualmente, la stadiazione più utilizzata è la BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) (*Tabella 6*) che si basa sulla sintesi dei risultati di numerosi studi effettuati su gruppi di pazienti omogenei per caratteristiche tumorali [95] e rappresenta un valido strumento per indirizzare il paziente all'opzione terapeutica più appropriata. Questa utilizza variabili correlate allo stadio tumorale, alla funzionalità epatica ed alla sintomatologia correlata alla malattia e delinea quattro stadi, cui vengono affiancati diversi protocolli terapeutici.

Secondo lo schema sotto riportato:



**Schema 3.** Sistema di stadiazione BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) e strategie di terapia raccomandate [96].

Abbreviazioni: CLT, (cadaveric liver transplant) trapianto di fegato da cadavere;

HCC, (hepatocellular carcinoma) carcinoma epatocellulare;

LDLT, (living donor liver transplant) trapianto di fegato da donatore;

M, (metastasis) metastasi;

N, (node) nodulo;

PEI, (percutaneous ethanol injection) iniezione percutanea di etanolo;

PS, performance status;

RFA, (radiofrequency ablation) ablazione a radiofrequenza;

TACE, (transcatheter arterial chemoembolization) chemioembolizzazione arteriosa transcateretere;

Tx, (treatment) trattamento.

La stadiazione BCLC è particolarmente efficace nella selezione dei pazienti con HCC in stadio precoce (stadio A) che vanno incontro a trattamento curativo, quale la resezione chirurgica, il trapianto epatico o le terapie ablative locali. Secondo Befeler et al. tale sistema di stadiazione risulta tuttavia inefficace per le altre classi; ad esempio non indica chiaramente se i pazienti in classe C di Child-Pugh con piccoli HCC siano candidati o meno al trapianto [47] e non differenzia in maniera esaustiva i pazienti di classe B da quelli di classe C. Ad oggi, nessun sistema di stadiazione risulta chiaramente superiore agli altri (*Tabella 7*).

### **Prognosi e Storia naturale**

In base alla nuova tendenza di diagnosi precoce, attraverso l'utilizzo di nuove tecnologie di imaging contrastografiche e al miglioramento ottimale dell'approccio terapeutico, la sopravvivenza a breve, medio e lungo termine è andata aumentando, così come evidenzia uno studio degli USA condotto su individui affetti da HCC dal 1975 al 2005 [97]. Oggi la diagnosi precoce è possibile in circa il 30-40% dei pazienti che possono pertanto beneficiare di trattamenti curativi.

**L'HCC in stadio precoce** comprende pazienti con buona funzionalità epatica (Child-Pugh A-B), singolo nodulo tumorale inferiore ai 3cm (Stadio A1-A3) o pazienti con noduli multipli in numero minore od uguale a 3, ciascuno con diametro inferiore a 3cm (Stadio A4) [2]. La risposta al trattamento e la sopravvivenza in questo gruppo di pazienti è variabile ed il termine HCC precoce copre in realtà stadi diversi con un comportamento biologico eterogeneo come confermano dati clinici e patologici. Per esempio, i tassi di risposta completa dopo trattamenti percutanei variano in rapporto alla dimensione del nodulo (90%-100% nei tumori di 2cm, 50% nei tumori di 5cm) e la stessa cosa avviene per i tassi di sopravvivenza [98]. La possibilità di identificare tumori piccoli ha



portato alla diagnosi di un HCC molto precoce, di forma nodulare, ben differenziato, che contiene dotti biliari e vasi portali, che non ha ancora invaso alcuna struttura, che ha il suo corrispettivo anatomopatologico nel carcinoma in situ. È importante considerare che l'invasione da parte del tumore è un fenomeno indipendente dalle dimensioni del nodulo: si potrà incorrere in tumori di dimensioni inferiori ai 2cm che si comportano come carcinomi in situ oppure tumori anche più piccoli ma già disseminati. Kojiro ha differenziato l'HCC di tipo "indistinto" (dimensioni medie di 1-2cm), senza alcuna invasione locale, dal tipo "nodulare distinto" (dimensioni medie di 1-6cm), con invasività locale. Nel tipo nodulare indistinto sono state osservate metastasi locali intorno al nodulo nel 10% dei casi ed invasioni portali microscopiche nel 25%. Sebbene entrambi i tipi siano stati individuati all'esame ecografico, il tipo indistinto appare ipovascolare alla TC mentre il secondo è ipervascolare. Questa correlazione tra anatomia patologica ed aspetto radiologico concorda con la scoperta che i tumori precoci hanno vascolarizzazione portale senza il tipico pattern ipervascolare visibile allo studio dinamico. La identificazione dell'HCC molto precoce è importante, poiché i pazienti, se adeguatamente trattati, presentano una prognosi decisamente favorevole, con sopravvivenza a 5 anni dell'89-93% dopo resezione chirurgica [99,100] e del 71% dopo trattamento percutaneo, [99] contro il 71% e 54%, rispettivamente, in pazienti con HCC precoce convenzionale più piccolo di 2cm [101]. Inoltre secondo Takayama et al. [100], questi tumori non tendono a recidivare dopo trattamenti curativi a differenza dell'HCC tradizionale inferiore a 2cm (8% contro 74% in 3 anni).

Questi tumori devono essere distinti dai noduli di displasia ad alto grado, per i quali non c'è accordo generale sui criteri istologici da applicare. L'invasione neoplastica all'interno dei vasi portali del tumore potrebbe aiutare ad identificare la natura maligna dei casi molto precoci (ma in futuro l'analisi molecolare potrebbe diventare lo strumento ottimale).

La miglior sopravvivenza, riferita 10 anni fa, era del 65% a 3 anni per i pazienti di classe A di Child-Pugh che avevano un tumore singolo [102]; oggi viene riferita una sopravvivenza a 5 anni del

50-70% [101]. La prognosi nello stadio precoce è legata allo stato del tumore, alla funzione epatica ed al trattamento utilizzato. Lo stato del tumore è definito dalla dimensione del nodulo e dalla multicentricità. La funzione epatica è particolarmente rilevante per la scelta del trattamento più opportuno. Tra i pazienti in classe A di Child-Pugh sottoposti a resezione, sono risultati fattori predittivi positivi di sopravvivenza la concentrazione di bilirubina ( $<17,1 \mu\text{mol/L}$ ), l'assenza di ipertensione portale (gradiente di pressione venosa epatica  $<10\text{mmHg}$ ) e la clearance dell'indocianina a 15 minuti ( $< 20\%$ ) (The Liver Cancer Study Group of Japan). Le opzioni terapeutiche comprendono dagli interventi chirurgici di resezione epatica e di trapianto ortotopico del fegato, ai trattamenti percutanei termoablazione a radiofrequenza o alcolizzazione percutanea. I tassi di risposta sono eterogenei e comprendono valori tra il 90 e il 100% nel caso di "very early stage" (nodulo unico inferiore ai 2cm) e del 50% nei pazienti con HCC superiore ai 5cm [98], questo perché è nota e documentata la correlazione tra dimensione tumorale ed invasività microvascolare e disseminazione neoplastica [2].

**La classe intermedio-avanzata** include pazienti con performance status inferiore e dimensioni tumorali maggiori, con presenza di invasione vascolare e disseminazione intraepatica (Stadio B e C). Nella maggior parte dei pazienti l'HCC viene diagnosticato negli stadi avanzati precludendo così il ricorso a terapie radicali. Il decorso naturale ed i fattori prognostici che definiscono questi stadi sono oggi abbastanza noti in confronto ai decenni passati quando i pazienti avevano una prognosi di circa 1 anno dalla diagnosi di HCC. I tassi di sopravvivenza ad 1 e 2 anni in 25 studi controllati randomizzati in cui i pazienti non ricevevano alcun trattamento erano rispettivamente del 10-72% e dell'8-50% [103]. L'ampia variabilità sottolinea l'eterogeneità della popolazione con HCC non candidata alla chirurgia e la necessità di suddividerla in sottocategorie. A tale scopo, Llovet et al. hanno arruolato una coorte di 102 pazienti da due gruppi di controllo non trattati, reclutati tra i pazienti degli studi controllati randomizzati. La sopravvivenza ad 1, 2 e 3 anni è stata

del 54%, 40% e 28% rispettivamente. I fattori prognostici indipendenti erano la presenza di sintomi correlati al carcinoma (test di performance status 1-2) e la presenza di invasione vascolare o disseminazione extraepatica. La sopravvivenza fra i pazienti in stadio intermedio (pazienti asintomatici, pattern non invasivo) ad 1, 2 e 3 anni è stata dell'80%, 65% e del 50%, mentre fra quelli con malattia avanzata (sintomatici, con pattern invasivo o entrambi) la sopravvivenza è stata del 29%, 16% e dell'8% [104]. Simili risultati sono stati riportati in Europa. La concentrazione di  $\alpha$ FP e di fosfatasi alcalina, lo stadio Child-Pugh e la presenza di ascite potrebbero ulteriormente precisare la prognosi. La sopravvivenza dei pazienti asintomatici e con pattern non invasivo (80%, 65% e 50%) risulta aumentata rispetto a quella del gruppo di pazienti sintomatici e con pattern invasivo (29%, 16% e 8%) rispettivamente a 1, 2 e 3 anni [98]. Le terapie riservate a questi pazienti sono essenzialmente le terapie locali, prima fra tutte la chemioembolizzazione, non di per sé curativa, con lo scopo di aumentare la sopravvivenza [2] ed in determinati pazienti evitare la progressione di malattia, in attesa del trapianto ortotopico di fegato, unico presidio curativo e radicale.

**L'HCC in stadio terminale** (Stadio D) include pazienti con performance status superiore a 2 oppure pazienti della classe C di Child-Pugh. Le opzioni terapeutiche risultano essere palliative e, nonostante la documentata chemioresistenza dell'epatocarcinoma, i pazienti vengono trattati in polichemioterapia (schema PAF: cisplatino, doxorubicina e 5-fluoruracile) o monochemioterapia se non sono in grado di tollerarla; è proprio in questi pazienti che sono stati utilizzati farmaci della target therapy contro la neoangiogenesi, quali sorafenib. Un'alta percentuale di pazienti è ancora identificata con sintomi correlati al carcinoma in fase terminale, in particolare nei paesi asiatici ed africani. La loro prognosi è infausta, con un'aspettativa di vita inferiore ai 6 mesi e nessun beneficio dal trattamento.

## **Opzioni terapeutiche**

Oggi giorno le opzioni terapeutiche da adottare nel paziente con HCC si basano sulle linee guida EASL che hanno proposto un algoritmo condiviso di trattamento e sulla stadiazione BLCL [2].

In base a tali linee guida l'HCC iniziale può beneficiare di strategie terapeutiche curative: resezione epatica, trapianto ortotopico di fegato, ablazione percutanea a radiofrequenza o alcolizzazione. Nell'HCC intermedio-avanzato si può ricorrere a trattamenti quali chemioembolizzazione e sorafenib allo scopo di migliorare la prognosi, mentre nel caso di malattia terminale le terapie adottate saranno prettamente a carattere palliativo.

### ***Trattamenti curativi***

Si calcola che al momento della diagnosi, circa il 30-40% dei pazienti con HCC nel mondo occidentale possono beneficiare di trattamenti curativi [103]; in Giappone tale percentuale raggiunge il 60-90% [101] grazie alla diffusione dei programmi di sorveglianza e ad una vasta applicazione dei trattamenti. Dal momento che, per motivi etici, non è possibile effettuare uno studio che ponga a confronto i principali trattamenti curativi, nessuna solida evidenza stabilisce quale sia il trattamento ottimale per i pazienti in stadio precoce di malattia. Sono attualmente a disposizione studi di coorte non randomizzati, che riportano tassi di sopravvivenza globale a 5 anni del 60-70%, in pazienti accuratamente selezionati, con risultati sostanzialmente sovrapponibili per la resezione epatica, il trapianto ortotopico di fegato ed i trattamenti ablativi percutanei (termoablazione a radiofrequenza, alcolizzazione, laser-terapia) [105,106]. La selezione del paziente rimane il fattore critico per ottenere un adeguato risultato clinico a lungo termine. Secondo i dati oggi disponibili possono infatti beneficiare dei trattamenti curativi i pazienti con nodulo singolo inferiore a 5cm o con meno di 3 noduli ciascuno inferiore a 3cm [107]. Questi criteri di selezione sono tuttavia oggi in discussione.

## **Resezione**

La resezione epatica è il trattamento di scelta in pazienti non cirrotici con HCC, che rappresentano circa il 5% dei pazienti con HCC nel mondo Occidentale ed il 40% in Asia [103]. La resezione epatica offre inoltre ottimi risultati in pazienti cirrotici con funzionalità epatica ben conservata e con nodulo singolo. La classificazione in classe A di Child-Pugh non è però sufficiente da sola ad identificare i pazienti candidati alla resezione e deve essere supportata da ulteriori indicatori. Sono infatti richiesti dei criteri di selezione molto restrittivi per evitare complicanze correlate al trattamento, soprattutto relative all'insufficienza epatica. I ricercatori giapponesi hanno utilizzato il tasso di ritenzione dell'indocianina per identificare i candidati migliori, mentre in Europa sono utilizzati i valori di pressione portale e di bilirubina [108,109].

È stata pertanto identificata la cosiddetta classe iper-A di Child-Pugh: pazienti con HCC asintomatico, con valori normali di bilirubina e senza segni di ipertensione portale. Secondo tali criteri, circa il 5-10% dei pazienti con HCC può beneficiare della resezione epatica, con una mortalità operatoria inferiore all'1-3%, necessità di trasfusioni ematiche in meno del 10% dei casi e tassi di sopravvivenza globale a 5 anni del 70%. La principale complicanza nel follow-up post-resezione è la recidiva tumorale, che avviene in circa il 70% dei casi a 5 anni. L'invasione microvascolare, la scarsa differenziazione istologica e la presenza di lesioni satelliti predicono l'insorgenza di recidive. Sono state valutate alcune strategie di prevenzione delle recidive post-chirurgiche; la chemioembolizzazione o la chemioterapia adiuvante non hanno dimostrato alcun beneficio, mentre l'irradiazione interna con lipiodol marcato con I131 e la terapia con interferone hanno dimostrato risultati promettenti [110,111]. Infine, in uno studio effettuato su 150 pazienti [112] sottoposti ad immunoterapia con linfociti attivati è stata dimostrata una riduzione nell'incidenza di recidive, ed un simile effetto è stato descritto con retinoidi in uno studio randomizzato controllato di 89 pazienti [113].

## **Trapianto ortotopico del fegato**

L'HCC è l'unico tumore solido in cui il trapianto abbia un ruolo rilevante cambiando completamente la strategia terapeutica dell'HCC. Il trapianto ortotopico del fegato sarebbe la terapia più adatta in quanto curativa sia del tumore sia della patologia di base. La sua applicazione non può essere possibile a largo spettro per il numero esiguo di donatori, per cui si è tentato, attraverso numerosi studi, di individuare criteri di selezione dei pazienti, in modo che, coloro che siano sottoposti all'intervento ne ricavano un reale beneficio in termini di sopravvivenza globale. Inoltre, la selezione dei pazienti deve essere il più possibile accurata nei confronti di quei pazienti ad alto rischio di progressione della malattia nel periodo di attesa, per evitarne l'uscita dalla lista (drop-out). Allo stato dell'arte, il riferimento su cui si basano i principi di selezione dei candidati al trapianto, è rappresentato dai "Criteri di Milano": secondo i quali, i pazienti candidabili, sarebbero quei pazienti con unico nodulo inferiore ai 5cm oppure con un massimo di 3 noduli, ciascuno con dimensione massima inferiore ai 3cm. la loro adozione si associa ad una sopravvivenza globale a 5 anni del 70% con tassi di recidiva inferiori al 15%. Alcuni studi basati sull'esame del fegato espuntato hanno suggerito che questi criteri potrebbero essere allargati, neoplasia unica inferiore ai 7cm, 3 noduli ciascuno dei quali inferiori ai 5cm, 5 noduli con dimensioni massime inferiori ai 3cm e pazienti con regressione tumorale dopo trattamento loco-regionale ma questa decisione dovrebbe basarsi su una solida analisi di dati dell'imaging al momento dell'indicazione terapeutica piuttosto che su dati anatomo-patologici resi disponibili solo quando l'operazione è conclusa. Il problema più rilevante nei pazienti con HCC candidati al trapianto è quello del tempo in lista di attesa, che spesso supera i 12 mesi, data la scarsità di organi, con conseguente drop-out dalla lista per progressione tumorale di circa il 20-50% dei casi. In America, ad esempio, più di 18.000 pazienti aspettano un trapianto di fegato da cadavere, ma il numero di donatori-cadaveri rimane stabile a 5.000/anno [114]. Questo dato allarmante ha costretto la United Network of Organ Sharing ad adottare un modello per le malattie epatiche in stadio terminale al fine di dare un ordine di priorità alla lista

d'attesa (il cosiddetto punteggio MELD, Model for Endstage Liver Disease). Il modello fornisce un punteggio composito che oscilla tra 6 e 40 punti (considerando con 40 i pazienti più gravi) che tiene conto dei valori di bilirubinemia, INR e creatinemia), con 24-29 punti aggiuntivi assegnati ai pazienti neoplastici in base a numero e dimensioni dei noduli (24 punti per nodulo singolo inferiore a 2cm, 29 punti in caso di nodulo singolo di 2-5cm o fino a 3 noduli inferiori a 3cm) [115], in modo da dare priorità in lista di attesa a pazienti con HCC e ridurre il drop-out. Il problema del drop-out è stato inoltre affrontato mediante l'utilizzo di trattamenti adiuvanti, quali la chemioembolizzazione intra-arteriosa, nei pazienti in attesa di trapianto per prevenire la progressione tumorale. Tuttavia la reale efficacia delle terapie adiuvanti in fase pre-trapianto è tuttora tema di dibattito [116,117]. Il trapianto da donatore vivente sta emergendo come alternativa rispetto al trapianto da cadavere, per incrementare la disponibilità di organi. Questo trattamento è stato proposto per la prima volta in Asia e ad oggi sono stati fatti più di 3.000 interventi al mondo con trapianto del lobo epatico destro. Attualmente sono stati pubblicati solo studi su piccoli gruppi di pazienti con HCC ed i risultati a lungo termine sono ancora incerti, pur dimostrando un rapporto costo-beneficio favorevole per l'HCC precoce. Tuttavia, l'entusiasmo per il trapianto da donatore vivente è mitigato dalla necessità di un'equipe chirurgica altamente specializzata, considerata la notevole complessità dell'intervento, con tassi di morbilità perioperatoria del 20- 40%; inoltre la mortalità dei donatori è dello 0,3-0,5% [118].

### **Trattamenti percutanei**

Il trattamento dell'HCC mediante tecniche ablativo percutanee ha rappresentato un importante progresso compiuto dalla radiologia interventistica poiché ha modificato l'approccio terapeutico ai pazienti non candidati al trapianto, sono opzioni terapeutiche utilizzate nei pazienti in stadio precoce di malattia e rappresentano una valida alternativa alle altre opzioni terapeutiche in termini di sopravvivenza.

### **Alcoolizzazione percutanea (percutaneous ethanol injection, PEI)**

La PEI è stata la prima tecnica utilizzata: consiste in una iniezione intratumorale di etanolo eseguita sotto guida ecografica, che comporta necrosi coagulativa a seguito di degenerazione proteica, disidratazione cellulare ed ischemia cellulare causata dalla trombosi dei piccoli vasi perilesionali. Si esegue generalmente sotto guida ecografica e ciò consente di valutare in tempo reale la diffusione dell'alcool all'interno del tumore evitandone un eccessivo spandimento al di fuori dei margini della lesione.

Il protocollo terapeutico prevede l'esecuzione di 4-6 sedute di alcoolizzazione con una frequenza di una o due volte a settimana. Il numero delle sessioni, così come la quantità di etanolo iniettabile, variano in rapporto alle dimensioni della lesione, al tipo di perfusione ed alla tollerabilità del paziente. Tale tecnica risulta facilmente eseguibile, ben tollerata, con scarse reazioni avverse, efficacia antitumorale elevata, soprattutto nei confronti dei piccoli tumori capsulati [119]. La sopravvivenza globale a 5 anni in neoplasie con diametro massimo inferiore a 5cm è tra il 47%-79% [120], ma la complicanza più temibile è la recidiva locale, correlata in modo proporzionale alle dimensioni del tumore e alla struttura istologica della neoplasia (grading elevato, satellitosi, setti intralesionali). Esistono diversi studi retrospettivi che hanno dimostrato indirettamente che la PEI migliora la storia naturale dell'HCC: la sopravvivenza a lungo termine di pazienti con HCC in stadio precoce trattati con PEI è simile a quella riportata nella casistica chirurgica, con il 50% circa dei pazienti in classe Child A che sopravvive a 5 anni [120-122]. In uno studio retrospettivo comparativo che include 391 pazienti con HCC unico più piccolo di 5cm, la sopravvivenza a 3 anni dopo resezione chirurgica, PEI o nessun trattamento è risultato essere del 79%, 71% e 26%, per i pazienti in classe A di Child, e del 40%, 41% e 13% per pazienti di classe B di Child, rispettivamente. Pertanto, sia la chirurgia che la PEI sembrano in grado di aumentare la sopravvivenza a medio-lungo termine [98]. La maggior limitazione della PEI è costituita dall'alto tasso di recidiva locale, che può arrivare al 33% in lesioni inferiori a 3cm ed al 43% in lesioni



maggiori di 3cm [123,124]. Ciò è da attribuirsi alla disomogenea diffusione dell'etanolo all'interno della lesione, conseguente al posizionamento inadeguato dell'ago e/o alla presenza di setti intratumorali, nonché ai limitati effetti sulla diffusione extracapsulare delle cellule neoplastiche. Inoltre la PEI non è in grado di creare un margine di ablazione di sicurezza nel parenchima epatico circostante alla lesione, dove sono più frequentemente situati i noduli satelliti. Attualmente la PEI è pertanto indicata in pazienti con HCC in stadio precoce, quando né il trapianto né la resezione chirurgica sono opzioni percorribili [42,103].

### **Termoablazione percutanea a radiofrequenze**

La termoablazione percutanea a RF è la metodica attualmente di maggior impiego nel trattamento dell'epatocarcinoma, con risultati promettenti [125]. Lo scopo dell'ablazione a RF è quello di provocare un danno termico tissutale attraverso la deposizione di energia elettromagnetica. Le cellule sottoposte al danno termico vanno incontro a necrosi coagulativa nel corso dei giorni successivi al trattamento. Per ottenere un'efficace distruzione della lesione, l'intero volume tumorale deve essere sottoposto a temperature citotossiche includendo una zona circostante di tessuto apparentemente sano di 0,5-1cm, per eliminare eventuali foci microscopici di malattia e per ovviare all'incertezza che spesso esiste riguardo alla reale localizzazione dei margini tumorali. Nel corso delle prime esperienze con RF, il limite maggiore era rappresentato dal piccolo volume d'ablazione indotto dagli elettrodi convenzionali. Questi dispositivi erano in grado di produrre zone di ablazione di forma cilindrica non superiori a 1,6cm [126]. Erano quindi necessarie inserzioni multiple per trattare anche lesioni piccole. Successivamente sono state sviluppate numerose strategie per incrementare il volume di ablazione ottenibile con RF, ad esempio ottimizzando la produzione di calore e minimizzandone la dispersione all'interno dell'area da trattare [127] oppure attraverso l'introduzione di nuovi ago-elettrodi a più punte. Oggi si utilizza un ago ad ombrello che è introdotto chiuso e poi aperto in sede per avere una più ampia area di necrosi. La RF in un minor

numero di sedute rispetto alla PEI permette di ottenere, un'ablazione completa della neoplasia, indipendentemente dalle caratteristiche istologiche tumorali e raggiunge tassi di risposta superiori; in particolar modo si dimostra efficace nei confronti delle patologie superiori ai 3cm e nelle recidive loco regionali dovute a satellitosi. In uno studio randomizzato su 104 pazienti con HCC allo stadio precoce, è emerso che la termoablazione a RF sembra associarsi ad un tasso di sopravvivenza libera da malattia superiore rispetto alla PEI [125]. Tuttavia anche con questo trattamento la recidiva tumorale è elevata, analoga del resto a quella ottenibile dopo resezione chirurgica (50% a 3 anni e maggiore del 70% a 5 anni).

### **Embolizzazione e chemioembolizzazione intraarteriose**

La chemioembolizzazione (Transcatheter hepatic Artery ChemoEmbolization- TACE) e l'embolizzazione (Transcatheter hepatic Artery Embolization -TAE) attraverso l'arteria epatica sono strategie terapeutiche riservate ai pazienti con HCC intermedio-avanzato) per le quali è stata dimostrata la possibilità di ottenere una risposta oggettiva tumorale del 16-60% [128], che si traduce in un aumento della sopravvivenza del 10-50% [129].

La TACE, descritta per la prima volta da Kato et al. nel 1981 consiste nell'introdurre, tramite catetere arterioso posizionato in arteria epatica, in aree più o meno estese di parenchima epatico, sede del tumore, una miscela di farmaci citotossici (solitamente cisplatino e adriamicina) mescolati ad un agente oleoso (solitamente Lipiodol®), a cui segue un'embolizzazione selettiva o superselettiva dei vasi arteriosi afferenti alla neoplasia. Questa viene effettuata, sotto guida fluoroscopia, con l'utilizzo di agenti embolizzanti riassorbibili quali la spugna di gelatina (solitamente Spongostan®), oppure mediante particelle embolizzanti permanenti come PVA o Embosphere®.

Il razionale di tale metodica si basa sulla caratteristica peculiare del nodulo tumorale di HCC di essere preferenzialmente irrorato da rami dell'arteria epatica, a differenza del parenchima epatico non tumorale, che riceve oltre il 70% dell'apporto vascolare dai rami portali. È pertanto possibile aggredire selettivamente il nodulo tumorale attraverso l'approccio arterioso risparmiando il restante parenchima epatico e riducendo pertanto gli effetti collaterali sistemici e locali. Il lipiodol ha già di per sé la caratteristica di effettuare un rallentamento del circolo arterioso in quanto è temporaneamente embolizzante, mentre la spugna di gelatina causa occlusione temporanea con ricanalizzazione in 2 settimane ed è fornita in frammenti o polvere, in modo da garantire l'azione duratura locale dei farmaci. Vi sono anche a disposizione altre particelle embolizzanti che provocano embolizzazione permanente di cui si parlerà in seguito.

Prima del trattamento vengono condotti sia un cateterismo selettivo diagnostico dei vasi epatopeti (tronco celiaco e arteria mesenterica superiore) con successivo studio della fase portale, sia un cateterismo superselettivo dei rami arteriosi afferenti alla lesione tramite microcatetere, i quali permettono una ottimale pianificazione della strategia interventistica.

Diversi sono i chemioterapici utilizzati in letteratura: la doxorubicina e la epirubicina vengono solitamente utilizzate come unico agente chemioterapico, mentre l'associazione più utilizzata prevede l'uso di cisplatino, doxorubicina e mitomicina C. Non è stata ancora ben dimostrata la superiorità di un principio attivo sugli altri.

Il blocco del circolo arterioso mediante embolizzazione favorisce la concentrazione del chemioterapico nei noduli neoplastici, rallentandone il wash-out, e, contemporaneamente, provoca un'ischemia improvvisa intralesionale, che favorisce la necrosi e nel contempo incrementa l'effetto citotossico dell'agente antitumorale per effetto ipossico. La necrosi indotta dalla TACE deriva quindi dall'effetto sinergico delle alte concentrazioni di farmaco all'interno del tessuto patologico e

dell'ischemia, la quale ha importanza sia come fenomeno lesivo in sé sia come fattore che permette la prolungata permanenza del farmaco nelle lesioni-bersaglio.

Il mezzo oleoso utilizzato nella miscela citotossica viene captato preferenzialmente all'interno delle cellule tumorali ove si concentra da 3 a 5 volte di più rispetto al parenchima non tumorale, anche grazie ad una rallentata eliminazione per l'assenza a tale livello dei vasi linfatici e delle cellule reticolo-endoteliali. Inoltre, esso ha effetto embolizzante temporaneo e penetra nei microshunt artero-portali rallentando ulteriormente il wash-out del chemioterapico. In questo modo è possibile raggiungere nel tessuto tumorale concentrazioni di farmaco 10-100 volte superiori rispetto alla chemioterapia sistemica.

La scelta della sede di somministrazione della miscela citotossica e del successivo embolizzante è guidata dalla necessità di preservare il più possibile i territori epatici non interessati dai noduli tumorali: la somministrazione deve essere quindi segmentaria o subsegmentaria nel caso di noduli unici o anche di poche lesioni raggiungibili con distinti cateterismi selettivi e superselettivi dei rami di suddivisione dell'arteria epatica. Oltre ad un effetto protettivo sul parenchima epatico sano o cirrotico (considerando che il 90% degli HCC insorge in un quadro di epatopatia cronica o franca cirrosi), la TACE garantisce una maggiore concentrazione degli agenti chemioterapici utilizzati nelle aree tumorali. Inoltre l'uso dei più recenti materiali angiografici (guide, microcateteri) offre la reale possibilità di raggiungere nella maggioranza dei casi le diramazioni più distali dell'albero arterioso epatico. La chemioembolizzazione non può essere applicata nelle lesioni epatiche multiple, in cui sono coinvolte ampie zone di parenchima. In caso di interessamento di entrambi i lobi è preferibile eseguire il trattamento in sedute distinte per ciascun lobo, intervallandole di almeno 3-4 settimane, in modo da assicurare comunque al paziente un back-up funzionale nella fase immediatamente successiva alla TACE.

Nel corso della procedura va tenuta presente la possibilità di collateralizzazione del circolo arterioso con il coinvolgimento di arterie che normalmente non irrorano il parenchima epatico (ad esempio

l'arteria frenica inferiore); tale evenienza è più frequente in noduli situati in zone periferiche dell'organo, in particolare sulla cupola epatica.

Anche in caso di quadri multifocali, è preferibile programmare eventuali ulteriori cicli di TACE sulla base della risposta tumorale e delle condizioni cliniche di ogni singolo paziente piuttosto che pianificare in tutti i pazienti cicli ripetuti di chemioembolizzazioni [130].

L'efficacia antitumorale della TACE viene valutata con l'esecuzione di un esame strumentale TC, o meno frequentemente RM, dopo 3-6 settimane dal trattamento. Una intensa ed omogenea ritenzione della miscela lipiodolata all'interno del nodulo tumorale (visibile come intensamente iperdensa in condizioni basali) si associano ad una migliore risposta tumorale e, forse, anche clinica [131]. La RM andrebbe riservata ai casi incerti alla TC, poiché sembra essere più sensibile nella identificazione di tessuto tumorale residuo, non essendo inficiata dagli artefatti tipici della TC determinati dalla presenza del Lipiodol (quali indurimento del fascio radiante e possibile mascheramento di aree di persistenza di malattia da parte del Lipiodol iperconcentrato).

Sulla scorta dei buoni risultati ottenuti, la chemioembolizzazione è stata impiegata anche a scopo neoadiuvante prima della resezione chirurgica. Questo tipo di applicazione è stato tuttavia sconsigliato in caso di lesioni resecabili, in quanto accelera il decorso della cirrosi verso l'insufficienza epatica, facilita la tendenza alla metastatizzazione da manipolazione chirurgica poiché induce una minore coesività cellulare e rende più difficile la resezione a causa della presenza di aderenze fibrotiche, esito inevitabile della necrosi indotta da TACE. Infine, la chemioembolizzazione preoperatoria non migliora la sopravvivenza a lungo termine rispetto alla sola resezione [132].

I candidati migliori alla TACE sono pertanto pazienti con una o più lesioni focali, non suscettibili di intervento chirurgico o ablazione percutanea, con funzionalità epatica sufficientemente conservata e senza segni di diffusione extraepatica di malattia. La presenza di una spiccata ed omogenea ipervascolarizzazione delle lesioni, così come rilevato alla TC nella fase arteriosa dello studio

dinamico, sembra essere un fattore predittivo positivo per la risposta alla TACE, con maggiore riduzione dimensionale dopo terapia e migliore sopravvivenza. I fattori invece associati ad un risultato meno efficace della terapia sono il diametro superiore a 10cm e la crescita di tipo infiltrativo della lesione, oltre a quadri di malattia diffusa o nettamente multifocale [133].

Le principali controindicazioni alla TACE sono rappresentate dalla presenza di trombosi portale e dilatazione delle vie biliari intraepatiche, nonché da una insufficiente funzionalità epatica; in particolare pazienti in classe C di Child non possono essere sottoposti a TACE per l'elevata mortalità periprocedurale (fino al 40%). Ulteriori controindicazioni relative riguardano l'uso di mezzo di contrasto iodato (riferita anamnesi allergica o alterata funzionalità renale) nonché la assenza di accessi arteriosi adeguati.

L'incidenza di complicanze periprocedurali si aggira intorno al 5% [134]. La complicanza più frequente (80-90%) è la "sindrome post-embolizzazione" costituita da un corteo sintomatologico: dolore, nausea, vomito e rialzo termico, che compare a distanza di 24-72 ore dall'esecuzione della TACE. Solitamente questa sindrome è meno rilevante se la procedura ha riguardato solo piccoli noduli tumorali trattati superselettivamente. Peraltro il rialzo termico postprocedurale è una evenienza auspicabile poiché è correlata al processo di necrosi tumorale. Si assiste anche ad un incremento delle transaminasi e di altri enzimi che, espressione di un danno transitorio indotto anche a livello del normale tessuto epatico, solitamente vanno incontro a normalizzazione nel giro di qualche settimana. È possibile, tuttavia, osservare un importante e duraturo deterioramento della funzionalità epatica legata al trattamento di lesioni molto estese.

L'efficacia clinica, in termini di incremento della sopravvivenza, della TACE in pazienti selezionati è stata dimostrata da studi clinici prospettici randomizzati che hanno riportato tassi di sopravvivenza a 1 e 2 anni del 82% e 63%, rispettivamente, significativamente superiori rispetto a pazienti trattati con la sola terapia di supporto (63% e 27%) o anche con la sola TAE (75% e 50%) [128]. Il dato è stato confermato da una meta-analisi eseguita sugli studi clinici randomizzati

disponibili in letteratura, che ha dimostrato che la TACE è in grado di aumentare la sopravvivenza di pazienti con HCC non resecabile allo stadio intermedio-avanzato ed è efficace nel 35% dei pazienti [1]. Essa è pertanto indicata secondo le recenti linee guida AASLD [44] come trattamento di prima scelta in pazienti non chirurgici in assenza di invasione vascolare o diffusione extraepatica.

La TACE è stata inoltre proposta nei pazienti candidati a trapianto epatico in lista di attesa, quale metodo in grado di controllare la crescita neoplastica, con una riduzione del “drop-out” a 6 mesi dal 30% al 15% [135,136]. È stato anche proposto l’uso della TACE in pazienti al di fuori dei criteri di selezione per trapianto di fegato (criteri di Milano), come metodica in grado di ridurre l’estensione tumorale, facendo pertanto rientrare il paziente entro i criteri di Milano e rendendolo candidabile a trapianto (così detto “downstaging”). I risultati della letteratura oggi disponibili circa la sopravvivenza dopo trapianto in pazienti così selezionati sono oggi discordanti, sebbene alcuni autori riferiscano tassi di sopravvivenza a 5 anni paragonabili a quelli che si ottengono in pazienti trapiantati entro i criteri di Milano classici [137].

La ricerca clinica ed industriale è oggi concentrata nell’identificazione di nuovi materiali embolizzanti e chemioterapici in grado di aumentare l’efficacia locale del trattamento in termini di necrosi tumorale e, nel contempo, di diminuire la tossicità sistemica, salvaguardando la funzionalità epatica. In questo contesto, la ricerca si è soprattutto concentrata nello sviluppo di nuovi agenti embolizzanti permanenti che in via teorica potrebbero permettere di incrementare l’efficacia della TACE in termini di ischemia e necrosi tumorale, e nel contempo ridurre le dosi di chemioterapico e l’incidenza di complicanze periprocedurali [138].

## **TACE con particelle embolizzanti precision TACE (p-TACE)**

La precision TACE (p-TACE) (**Pharmacokinetic Study of Doxorubicin in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma by Drug Eluting Bead embolisation**) è una metodica introdotta negli ultimi anni che utilizza particelle embolizzanti permanenti caricate di chemioterapico. Attualmente sono in commercio più tipi di particelle utilizzabili per la TACE: Hepasphere (Biosphere Medical, Francia), DC Beads (Biocompatible UK Limited, UK) e particelle embolizzanti permanenti: PVA (Polyvinyl Alcohol Particles) e Embosphere (Acrylic Spheres);

- ✓ Le **PVA (Polyvinyl Alcohol Particles)** sono particelle embolizzanti inerti, che causano occlusione semipermanente o permanente e che vengono iniettate tramite catetere. Una volta rilasciate dal catetere vengono trasportate dal flusso arterioso, direttamente alla sede da embolizzare e per questo è necessario che le particelle abbiano una dimensione adeguata, sia per prevenire l'occlusione del catetere, sia per ottenere occlusione del vaso. Le PVA sono fornite disidratate in fiale, sono particelle dalla forma irregolare o sferica di dimensioni da 50 a 1200 micrometri di diametro; aggiungere albumina alla sospensione aiuta a prevenire il raggruppamento di queste particelle aventi forma irregolare.
- ✓ **Embosphere** sono sfere di acrilico che causano embolizzazione permanente, solide, direzionate dal flusso, perfettamente rotonde e leggermente deformabili. Il loro range di diametro va da 200 a 1200 micrometri e sono disponibili in sospensione acquosa. L'aggregazione di queste particelle è meno frequente grazie alla forma sferica e alla loro superficie liscia. Queste sfere penetrano più in profondità, nell'albero vascolare, rispetto alle particelle PVA e possono essere iniettate con minore difficoltà. Le microsfele di acrilico rivestite da collagene possono offrire alcuni vantaggi rispetto alle PVA per le lesioni vascolari, senza evidenza di shunt arterovenosi [139].



Esiste un vantaggio nell'utilizzare un embolizzante che determini occlusione permanente a livello periferico in quanto si aumenta l'ischemia tumorale e si risparmia sull'utilizzo di agenti chemioterapici. [140]

Da quando sono state introdotte le microsfele tris-acriliche di gelatina di 40-120 micrometri, tuttavia, ci sono state tre morti per complicanze polmonari, avvenute dopo embolizzazioni arteriose. Queste complicanze non erano mai state osservate con le particelle di gelatina tris-acriliche più grandi o con le PVA. Questa è una complicanza insolita di cui l'interventista deve tenere conto [141].

- ✓ **Hepasphere** sono costituite da copolimeri di sodio acrilato ed alcool vinilico e sono utilizzate in Europa per l'embolizzazione e la chemioembolizzazione epatica a scopo terapeutico e prechirurgico. Sono microsfele biocompatibili, idrofile, non riassorbibili ed espandibili e sono disponibili in tre range di diametro; 50-100 µm, 100-150 µm e 100-200 µm. Vengono messe in commercio in flaconcini da 25 mg o 50 mg in forma disidratata. Messe a contatto diretto con soluzione salina fisiologica o con mezzo di contrasto isotonico non ionico (Visipaque- Iodixanol 270 mg/ml; Amersham Health) esse aumentano di volume in modo controllato. Ne è necessaria la preparazione prima dell'intervento: la soluzione o il mezzo di contrasto vengono iniettati direttamente nella fiala sottovuoto di HepaSphere™ e l'espansione nella forma reidratata può raggiungere fino a quattro volte il diametro della forma disidratata. I polimeri sono dotati di carica elettrica negativa così da catturare molecole con carica elettrica opposta come la Doxorubicina o l'Epirubicina; in questo modo le particelle sono in grado di assorbire il chemioterapico, limitandone il rilascio sistemico. È necessario aspettare almeno 20 minuti per essere certi che più del 90% della soluzione del chemioterapico venga assorbita e determini l'espansione delle microsfele. Successivamente viene aggiunto altro mezzo di contrasto per creare un volume iniettabile pari a 20 cc. Dopo la preparazione le HepaSphere™ vengono iniettate transcateretere per eseguire TACE

superselettiva e, nelle settimane successive, rilasceranno progressivamente il chemioterapico direttamente all'interno delle lesioni. Questo viene realizzato al fine di avere una percentuale maggiore possibile di necrosi tumorale e per ridurre i danni ischemici a carico del parenchima epatico adiacente, evitando di danneggiare ulteriormente la funzionalità epatica [142].

- ✓ Le **DC Beads** sono particelle costituite da microsfere di idrogel N-Fil Sulfonato, biocompatibili, non riassorbibili, idrofile e precalibrate, in grado di assorbire e veicolare selettivamente il chemioterapico, rilasciandolo in modo controllato all'interno del nodulo tumorale. Sono presenti in commercio in 4 differenti dimensioni (100-300 $\mu$ m; 300-500 $\mu$ m; 500- 700 $\mu$ m; 700-900 $\mu$ m). Diversamente dalle Hepasphere, l'assorbimento della doxorubicina alle DC Beads è un processo attivo; il farmaco viene fornito in forma di polvere, deve essere diluito con 2 ml di acqua sterile, e viene sequestrato in maniera altamente efficiente fino ad un massimo di 45 mg/mL indipendentemente dalle dimensioni delle particelle. In funzione della dimensione delle particelle varia solo il tempo di adsorbimento del chemioterapico che varia da 20 a 60 minuti. Un'altra differenza è che le DC Beads vengono fornite in soluzione salina, la quale deve essere aspirata prima della miscelazione con il chemioterapico. Infine si trasferisce la miscela in una siringa e si aggiunge un equivalente volume di mezzo di contrasto non ionico per consentire la visualizzazione in fluoroscopia della miscela durante l'iniezione (4 mL). Le DC Beads sono state approvate in Europa per il trattamento dei tumori maligni ipervascolarizzati. Inoltre uno studio condotto su animali ha mostrato che la concentrazione sistemica di doxorubicina era minima, significativamente diversa da quella ottenuta con terapia sistemica, suggerendo una elevata ritenzione di chemioterapico a livello tumorale. All'interno del tumore la concentrazione di farmaco raggiungeva il picco massimo al terzo giorno, rimanendo elevata nei giorni successivi sino al settimo, con persistenza per oltre 14 giorni, ad indicare un

continuo rilascio del farmaco dalle particelle. La necrosi tumorale (approssimativamente del 100%) era maggiore a distanza di una settimana dal trattamento e associata a modeste alterazioni della funzionalità epatica [143]. Sono stati pubblicati i risultati clinici di due studi [144,145], i cui dati confermano il profilo farmacocinetico favorevole correlato all'uso di DC Beads, con bassa concentrazione plasmatica di doxorubicina dopo trattamento e ridotta incidenza di complicanze maggiori (7,4% e 11,4%). La risposta tumorale oggettiva (completa e parziale) valutata alla TC risulta essere del 75% a 6 mesi nello studio di Varela et al [144] e del 71% a 3 mesi nel più recente studio di Poon et al [145].

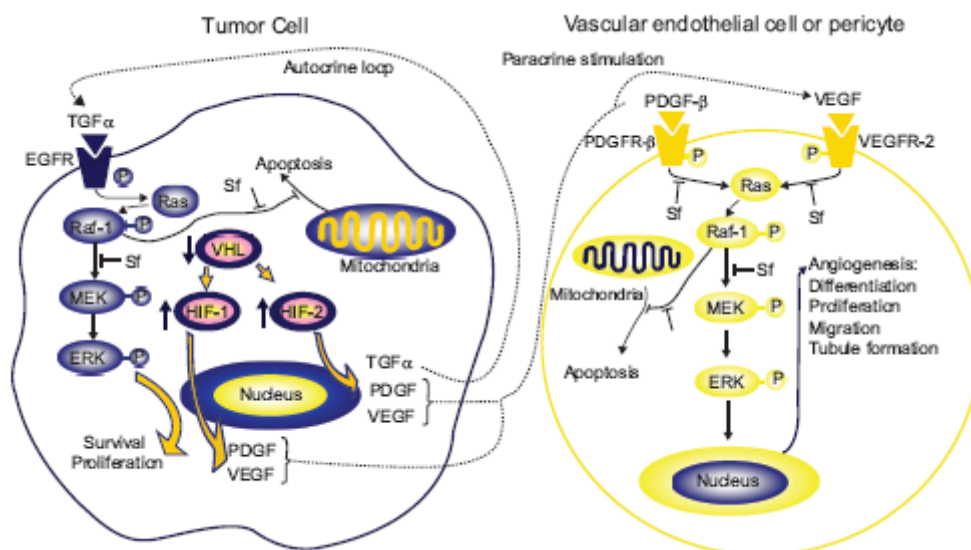
I dati raccolti sulle particelle embolizzanti sono molto buoni e hanno permesso di affermare che la terapia con queste particelle è migliore rispetto alla TACE tradizionale. Inoltre l'embolizzazione con particelle, nella terapia dell'HCC, è ben tollerata e dimostra una sopravvivenza del 50% a un anno e del 33% a due anni [140].

Date le proprietà degli agenti embolizzanti, l'uso di un particolare agente rispetto ad un altro, può influire sulla quantità di chemioterapico iniettata nel tumore, che causa una potenziale occlusione arteriosa permanente, la quale potrebbe compromettere l'accesso arterioso per una TACE successiva. La scelta dell'embolizzante: PVA o Gelfoam, come anche il modo in cui questi sono mescolati con il chemioterapico (olio e poi particelle embolizzanti oppure chemioterapici e olio seguiti da materiale embolizzante) possono influire in modo significativo sul successo della TACE [146]. In gruppi di pazienti con condizioni simili la sopravvivenza al trattamento dell'HCC con TACE usando Gelfoam o PVA con lipiodol è stata simile.

## Ruolo del sorafenib nella terapia dell'HCC in fase avanzata

Il sorafenib è un inibitore orale multitarget delle chinasi che regolano gran parte dei processi di attivazione delle vie di segnalazione cellulare, che sono fondamentali per lo sviluppo tumorale. Queste vie di trasduzione del segnale, se non regolate, contribuiscono alla trasformazione maligna nelle cellule umane. L'attivazione di queste vie porta allo sviluppo di molti dei processi coinvolti nella progressione del tumore, come la proliferazione cellulare, l'invasione, la metastasi e l'inibizione dell'apoptosi. Il ruolo del sorafenib si svolge anche a monte di queste vie di attivazione, in quanto esso inibisce direttamente il recettore tirosin chinasi che attiva le vie di segnalazione. Un importante crocevia nell'attivazione delle vie di trasduzione è rappresentato da Ras che è stata trovata mutata in molti tumori umani; Ras regola diversi percorsi che sinergicamente inducono trasformazione cellulare: tra cui Raf /MAPK (protein-chinasi attivata da mitogeni) / MEK / ERK (chinasi extracellulare regolata da segnale) [147,148,149] che sono attivate a cascata.

Le RAF chinasi sono serina / treonina chinasi che funzionano, in questo percorso, come molecole effettrici a valle di Ras [149,150,151]. La famiglia delle Raf chinasi è composta da tre membri, A-Raf, B-Raf e Raf-1.

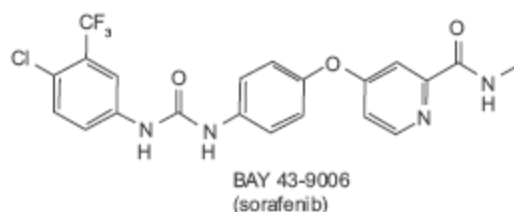


**Figura 1. Vie di attivazione intracellulare su cui interviene sorafenib**

I tumori solidi secernono in modo aberrante molti fattori di crescita diversi e citochine, tra cui VEGF e PDGF- $\beta$ . Il legame di questi fattori di crescita a recettori presenti sulla superficie delle cellule endoteliali attiva il percorso Raf / MEK / ERK, che provoca l'induzione di angiogenesi e linfangiogenesi [152]. Tra i recettori tirosin chinasi inibiti dal sorafenib sembrano essere di fondamentale importanza i recettori del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGFR) e del fattore di crescita derivato dalla piastrine (PDGFR); è questo che sembra determinare l'attività antitumorale in vivo del sorafenib, infatti l'attività del farmaco è correlata all'inibizione dello sviluppo di aree di tumore contenenti microvasi, misurata mediante la riduzione della colorazione del CD34 all'immunoistochimica [153], ciò dimostra l'inibizione dall'angiogenesi.

Oltre a questi effetti sono stati osservati effetti diretti sulla proliferazione / sopravvivenza delle cellule tumorali dipendenti e non dalla via di segnalazione della Raf chinasi.

Al fine di scoprire nuove terapie che hanno come obiettivo il percorso Ras / Raf / MEK / ERK è stato avviato, nel 1995 dalla Bayer e Onyx, uno screening per l'attività di un inibitore della chinasi di Raf-1 [154]. Il primo composto generato, la **3-tiofenil-urea**, non ha dimostrato una capacità di inibizione del Raf-1 accettabile, in quanto la metà della concentrazione massima necessaria per avere l'effetto inibitore (IC50) era troppo elevata e non raggiungibile a livello tissutale (17 micromoli.). Il successivo tentativo con sorafenib, il cui nome chimico è **N-(3-trifluorometil-4-clorofenil)-N'-(4-(2-metilcarbamoil piridin-4-il)ossifenil)urea**, ha raggiunto una IC50 di 6 nmol [149,154]. La formula di struttura è mostrata in



**Figura 2. Formula di struttura del sorafenib**

Nello stesso studio sono stati anche studiati gli effetti in vitro del sorafenib ed è stato dimostrato che inibisce potentemente la wild-type-Raf, la proteina oncogenica serina treonina chinasi B-Raf, il recettore pro-angiogenico tirosin-chinasico, il c-kit, e l'Flt-3 [154]. L'efficacia antitumorale e il meccanismo di azione del sorafenib sono stati studiati in vitro anche su PLC/PRF/5 e HepG2; nelle cellule di HCC il sorafenib inibisce la fosforilazione di MEK e ERK e down-regola i livelli di ciclina D1. Inoltre, il sorafenib ha ridotto il livello di fosforilazione dell'eIF4E e down-regolato la proteina anti-apoptotica Mcl-1 in modo indipendente dalla via MEK / ERK. In vivo sono stati studiati gli effetti del sorafenib su PLC/PRF/5 su xenotrapianti tumorali umani in topi con immunodeficienza grave combinata [153]. Il sorafenib ha dimostrato di inibire la fosforilazione di MEK e ERK, di ridurre i livelli di ciclina D1 e di inibire in modo dose-dipendente la crescita tumorale [153].

Il sorafenib inoltre è stato dimostrato efficace in un'ampia classe di noduli polmonari dove inibisce la proliferazione cellulare e la angiogenesi e aumenta la frequenza di apoptosi [149,154,155,156].

### **Razionale per l'uso clinico e studi sull'utilizzo del sorafenib per carcinoma epatocellulare**

L'epatocarcinogenesi è un processo multi-step, che si sviluppa lentamente su uno sfondo di malattia epatica cronica. Alcuni lavori sulla biologia del carcinoma epatocellulare suggeriscono che vie di segnalazione mediate da EGFR e da fattori angiogenetici come VEGFR e PDGFR (come la via del PI3K/Akt/mTOR, Ras / Raf / MEK / ERK e Wnt /  $\beta$ -catenina) svolgono ruoli importanti nello sviluppo di HCC, promuovendo la crescita cellulare e la sopravvivenza [157].

Altri studi hanno dimostrato il ruolo importante svolto dall'attivazione di MAPK / ERK nel processo carcinogenetico multi-step coinvolto nell'HCC umano, soprattutto nella progressione dell'HCC [158,159]. È stato inoltre dimostrato che la sovraespressione di MEK 1 / 2 fosforilata e MAPK nelle linee di cellule di HCC promuove la crescita tumorale e la sopravvivenza, prevenendo l'apoptosi [160]. L'HCC è fortemente legato all'HBV e all'infezione da HCV, ed è stato dimostrato

un rapporto tra l'espressione di Raf e HCV / HBV. Giambartolomei et al. (2001) [161] ha riferito che la capacità della proteine core di HCV di attivare direttamente la cascata della MAP chinasi, soprattutto Raf-1, è fondamentale per prolungare la loro attività in risposta a stimoli mitogenici e può contribuire alla trasformazione neoplastica delle cellule epatiche infettate da HCV. Per quanto riguarda l'HBV invece Chen e Siddiqui (2007) [162] hanno riferito che la proteina X (HBX) di HBV svolge un ruolo cruciale nel ciclo di vita virale e contribuisce alla comparsa di HCC. HBX ha causato la traslocazione mitocondriale di Raf-1 chinasi o sola o nel contesto di trasfezioni dell'intero genoma virale.

Altro aspetto da tenere in considerazione è il ruolo del VEGF, che è uno dei più importanti fattori coinvolti nell'angiogenesi di HCC, questo tumore è caratterizzato, nella maggior parte dei casi, da elevata vascolarizzazione [163,164]. VEGF promuove lo sviluppo di HCC e metastasi, e i livelli sierici di VEGF sono stati segnalati come un significativo fattore prognostico indipendente nei pazienti con HCC [165,166]. In conclusione, la via Raf / MEK / ERK e la via di segnalazione mediata dai fattori angiogenici VEGFR e PDGFR sono potenti bersagli molecolari nella terapia dell'HCC.

### **Considerazioni concernenti l'utilizzo del sorafenib nel carcinoma epatocellulare avanzato**

Per quanto riguarda l'efficacia della terapia con sorafenib, in uno studio di fase I condotto da Strumberg et al. 2005 [167], è stata osservata una risposta parziale (PR) in uno solo dei 45 pazienti trattati in terapia continuativa con sorafenib a dosi maggiori di 100 mg due volte al giorno, il paziente era affetto da HCC trattato con il farmaco a 400 mg in terapia continuativa. In questo stesso studio di fase I, erano valutabili per quanto riguarda l'efficacia, 6 pazienti con HCC, di cui uno ha mostrato risposta parziale (PR), 4 avevano malattia stabile (SD), e uno ha mostrato progressione della malattia (PD).

Sulla base di questi risultati è stata condotta da Abou-Alfa et al (2006) [168] una fase II di studio su 137 pazienti con HCC. Sebbene il tasso di risposta è stato basso, cioè del 2,2%, il tempo di progressione (Time To Progression, TTP) e la sopravvivenza globale (Overall Survival, OS) sono stati promettenti: la media del TTP è stata di 4,2 mesi e la OS media di 9,2 mesi.

Sulla base di questi risultati, è stato condotto un ampio studio di fase III randomizzato controllato (RCT) di sorafenib rispetto al placebo, lo studio SHARP (Sorafenib Hepatocellular carcinoma Assessment Randomized Protocol) in pazienti con carcinoma epatico avanzato [151]. Sono stati randomizzati 602 pazienti in 2 bracci: il braccio sorafenib e il braccio placebo, in rapporto 1:1.

Il protocollo prevedeva la somministrazione orale di 400 mg di sorafenib due volte al giorno, l'esecuzione di controlli seriati di imaging e monitoraggio clinico; i pazienti hanno continuato a ricevere la terapia fino alla comparsa di progressione radiologica di malattia, peggioramento clinico e/o eventi avversi gravi, compresa la morte. Le caratteristiche basali erano ben bilanciate tra i 2 gruppi di trattamento e l'eziologia della malattia epatica è stata distribuita tra virus dell'epatite B, virus dell'epatite C, e malattia epatica alcol-indotta. Questo studio ha mostrato risultati incoraggianti sia per il tempo di progressione (TTP), che è stato di 5,5 mesi per il sorafenib e di 2,8 mesi per il placebo, che per la sopravvivenza globale media che è stata di 10,7 mesi per il sorafenib e 7,9 mesi per il placebo. La sopravvivenza a 4 mesi libera da progressione è stata del 62% tra i pazienti che hanno ricevuto il sorafenib e del 42% nel gruppo placebo. Questo studio ha dimostrato un miglioramento statisticamente significativo, non solo nello stato di progressione della malattia, ma anche nella sopravvivenza globale dei pazienti nel braccio di sorafenib.

I pazienti trattati con sorafenib hanno sperimentato una terapia che ha migliorato significativamente il tasso di controllo della malattia, con una maggiore incidenza di malattia stabile, infatti il tasso di risposta è stato relativamente modesto (la risposta della malattia è stata solo del 2,3% tra i pazienti trattati con sorafenib). Nel complesso, il sorafenib è stato generalmente ben tollerato, anche se gli eventi avversi legati al farmaco si sono verificati ad una frequenza più alta nel gruppo in trattamento



rispetto al placebo (80% vs 52%), la maggior parte dei pazienti avevano un grado 1 o 2 di tossicità. Gli eventi avversi di grado 3 che si sono verificati in modo significativamente maggiore nel gruppo sorafenib rispetto al placebo, sono stati diarrea (8% contro il 2%,  $p < .001$ ), reazione cutanea mano-piede (8% vs  $< 1\%$ ,  $P < .001$ ), e perdita di peso (2% vs 0%,  $P = .03$ ). Altri pazienti che hanno ricevuto il sorafenib hanno dovuto subire una riduzione della dose a causa di eventi avversi (26% vs 7%). A causa del potenziale di eventi avversi correlati al sorafenib, sono state sviluppate schede e linee guida di modificazione della dose che sono state comprensive sia di un ritardo nella somministrazione delle dosi che di una diminuzione del dosaggio. Anche nello studio di Abou-Alfa e di Stumberg et al erano stati riscontrati effetti collaterali simili compresi astenia e rash cutaneo e in quest'ultimo studio la dose massima tollerata era stata fissata a 400 mg anche per gli studi futuri. Dato che per lo studio SHARP la maggior parte dei pazienti era stata arruolata in Europa o in Australia è stato condotto un RCT, con disegno simile a quello dello studio SHARP, nella regione Asia-Pacifico (Asia-Pacific trial) [169], poiché vi era preoccupazione per quanto riguardava il divario tra efficacia e sicurezza del farmaco in relazione all'applicazione del sorafenib come agente terapeutico standard globale per il carcinoma epatico avanzato. L'eziologia e le strategie di trattamento dell'HCC variano tra le regioni del mondo [2,44,170,171] e pertanto era necessario confermare l'efficacia e la sicurezza del farmaco in popolazioni asiatiche. La dose di sorafenib utilizzata nello studio Asia-Pacifico è stata uguale a quella somministrata nella prova SHARP (400 mg due volte al giorno) ed i 226 pazienti - arruolati in Cina, Corea del Sud e Taiwan - sono stati randomizzati 2:1 tra sorafenib e placebo. I più frequenti effetti avversi riscontrati sono stati gli stessi del trial SHARP e degli altri già condotti tranne l'iperbilirubinemia. La sopravvivenza globale media è stata di 6,5 mesi per il sorafenib e 4.2 mesi per placebo [169]. Il tempo di progressione è stato di 2,8 mesi nel braccio di sorafenib e 1.4 mesi nel braccio placebo. L'eziologia dell'HCC nello studio Asia-Pacifico era diversa da quella nel trial SHARP, infatti l'infezione da HBV è stata osservata in oltre il 70% dei pazienti in Asia. Tuttavia i valori di Hazard

Ratio (HR) di OS e TTP erano molto simili a quelli dello studio SHARP, il che ha indicato che è prevista efficacia a prescindere dalla differenza nell'eziologia. Nonostante questo, i valori di sopravvivenza globale media e il tempo alla progressione erano molto scarsi nei pazienti del gruppo Asia - Pacifico rispetto a quelli del gruppo del trial SHARP, di fase II e nello studio giapponese di fase I. Questo inconveniente è dovuto alla differenza nelle caratteristiche dei pazienti, come i performance status più scarsi, lo stadio più avanzato del tumore e al fatto che il 52% dei pazienti aveva metastasi polmonari).

In conclusione dallo studio SHARP e dallo studio Asia-pacifico si evince che, mentre la diversa eziologia del carcinoma epatocellulare non è motivo di preoccupazione, lo sono lo stadio avanzato della malattia al momento della diagnosi e uno scarso performance status, questi infatti, sono i principali motivi per gli scarsi esiti del trattamento con sorafenib.

Oltre a questo, ci si è chiesti se il sorafenib può essere utilizzato in pazienti con malattia di classe B di Child-Pugh, con disfunzione epatica moderata, in quanto i pazienti arruolati nello studio SHARP avevano buona funzionalità epatica ed erano in classe A di Child-Pugh. A questo scopo in Giappone, è stato condotto uno studio di fase I per verificare farmacocinetica, sicurezza ed efficacia del farmaco in pazienti giapponesi con carcinoma epatocellulare avanzato, con un pari numero di pazienti con Child-Pugh A e B. I risultati hanno rivelato un profilo di sicurezza simile a quello dell'RCT del sorafenib e con la stessa dose raccomandata, di 400 mg, il tasso di risposta è stato del 3,7%, e le medie di TTP e OS sono state 4,9 mesi e 15,6 mesi, rispettivamente [172].

Le uniche differenze sono state rilevate nella farmacocinetica: le aree sotto la curva di concentrazione e il picco di concentrazione allo steady state del farmaco, sono risultate inferiori nei pazienti in classe B di Child-Pugh rispetto ai pazienti in classe A.

Per il resto non c'era grande differenza nell'incidenza e nel grado di eventi avversi farmaco-correlati tra classe A e B ma sono stati osservati più frequentemente nel gruppo di classe B ipertensione, reazione allergica mano-piede ed eruzioni cutanee. Anche Abou Alfa et al hanno esaminato il

confronto tra efficacia e sicurezza del farmaco nella classe A e B di Child-Pugh e i profili di farmacocinetica e tossicità complessiva sono risultati simili in entrambi i gruppi. Gli eventi avversi correlati alla cirrosi epatica, come aumento della bilirubina, ascite ed encefalopatia, si sono verificati più frequentemente in classe B di Child-Pugh rispetto alla classe A. Inoltre, il TTP e la OS sembrano essere peggiori nei pazienti di classe B rispetto a quelli in classe A. Dato che il gruppo con Child-Pugh di classe B è generalmente eterogeneo con punteggi che vanno da 7 a 9 [173] le indicazioni al sorafenib devono essere attentamente valutate in pazienti con Child-Pugh di classe B e sono necessari più dati per confermare la sicurezza e l'efficacia del sorafenib nella pratica clinica e studi clinici in questi pazienti in futuro.

Dati gli effetti collaterali importanti del farmaco e per migliorare l'efficacia associata al sorafenib, sono stati investigati biomarcatori che diano la possibilità di predire la risposta al sorafenib. Un biomarcatore attualmente indagato è la forma fosforilata del segnale extracellulare regolato dalle chinasi (p-ERK), che è una molecola a valle, nella via di segnalazione RAF/ MEK / ERK, nonché un target di sorafenib. L'attivazione costitutiva di questa via porta ad elevati livelli di p-ERK, e probabilmente indica che la cellula tumorale si basa su questa via per la sopravvivenza. Mediante immunistochemica è possibile osservare che i pazienti le cui cellule tumorali hanno una maggiore intensità di colorazione per p-ERK hanno dimostrato un maggior tempo per la progressione, il che suggerisce una migliore risposta al sorafenib, forse dovuta all'inibizione della via [174]. Sono sotto inchiesta anche altri possibili biomarcatori per prevedere la risposta al sorafenib, inclusi HGF e c-Kit. È possibile che questi marcatori siano correlati alla sopravvivenza dei pazienti con carcinoma epatocellulare.

Sulla base dei risultati degli studi randomizzati, il sorafenib è stato stabilito come agente standard per la chemioterapia sistemica nel carcinoma epatocellulare in pazienti con malattia metastatica o refrattari alla chemioembolizzazione arteriosa transcatetere (TACE) che non sono candidati per trattamenti locali; il sorafenib è il primo agente di chemioterapia sistemica che prolunga la

sopravvivenza nei pazienti con HCC avanzato. Ad oggi c'è tuttavia bisogno di più dati in quanto l'efficacia e la sicurezza del sorafenib non sono stati confermati in pazienti con disfunzione epatica moderata. C'è bisogno dello sviluppo di un nuovo schema terapeutico per il trattamento dell'HCC avanzato; di studi clinici che indaghino la terapia di combinazione ottimale basata sul sorafenib, da utilizzare come seconda linea di terapia dopo fallimento del sorafenib e che indaghino la terapia adiuvante ottimale dopo terapia locoregionale in pazienti con HCC.

### **Combinazioni a base di sorafenib**

Sono stati riportati nel 2008 [175] i risultati di uno studio di fase II che ha valutato la combinazione del sorafenib con doxorubicina. Questo piccolo studio su 96 pazienti ha individuato una sopravvivenza libera da progressione superiore nei pazienti che hanno ricevuto il regime di combinazione. Sulla base di questi risultati promettenti, è previsto più di uno studio randomizzato di fase II. A causa del pericolo di cardi tossicità, questo evento avverso sarà attentamente monitorato. Vi è inoltre un crescente interesse nella valutazione del sorafenib in combinazione con terapie biologiche (tra cui brivanib e bevacizumab) e si sta valutando l'aggiunta del sorafenib alle terapie dirette al fegato, come nello studio randomizzato di fase III ECOG 1208, uno studio di confronto tra chemioembolizzazione con e senza sorafenib.

### **Chemioterapia sistemica per il carcinoma epatocellulare**

La chemioterapia sistemica per i pazienti con HCC avanzato è indicata in quei pazienti che non sono candidati adatti per trattamenti locali, per esempio quelli con metastasi a distanza e/o invasione macrovascolare [44]. Anche la refrattarietà alla TACE viene considerata come indicazione per la chemioterapia sistemica. Vari studi sulla chemioterapia per il carcinoma epatocellulare hanno indicato che le antracicline (ovvero antibiotici antitumorali, come la doxorubicina e il mitoxantrone), costituiscono la base per la chemioterapia in casi di HCC

[176,177]. Oltre alla doxorubicina, il cisplatino e/o fluorouracile sono gli agenti più comunemente usati, in combinazione, nella chemioterapia per il carcinoma epatocellulare [178,179,180,181]. La chemioterapia combinata, che include fluorouracile / mitoxantrone / cisplatino (FMP); epirubicina / cisplatino / fluorouracile (ECF) e cisplatino / interferone  $\alpha$ -2b / doxorubicina / fluorouracile (PIAF), ha riportato una frequenza di risposta in un range dal 14% al 26%, con una sopravvivenza globale media (OS) da 8,9 a 11,6 mesi. La terapia con doxorubicina è stata considerata come terapia del braccio di riferimento negli studi clinici randomizzati per HCC basandosi sui risultati di uno studio comparativo tra doxorubicina e terapia di supporto [176]. Nonostante la fase III indichi che vi siano migliori risposte alla chemioterapia di combinazione rispetto alla doxorubicina in monoterapia, non è ancora stata stabilita la chemioterapia standard che può chiaramente prolungare la sopravvivenza nei pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato. Ad esempio, un recente studio di fase III che ha analizzato la terapia con doxorubicina rispetto a PIAF non è riuscito a dimostrare nessun beneficio di sopravvivenza di alcun farmaco [182]. Tuttavia, le buone prospettive di utilizzo del sorafenib danno buone speranze per l'attuazione di una serie di studi volti a determinare un protocollo di terapia standard per i pazienti con HCC in stadio avanzato.

## **Evoluzione tecnologica della TC**

La comparsa della TC quale metodica di imaging radiologico risale al 1971 a Londra presso i laboratori della EMI Limited ad opera dell'ingegnere inglese Godfrey N. Hounsfield e del fisico sudafricano Allen M. Cormack.

La tomografia computerizzata (TC) è una metodica di imaging radiologico:

- tomografica, in quanto le immagini da essa fornite riproducono strati corporei, per lo più (ma non obbligatoriamente) trasversali (o assiali) rispetto all'asse longitudinale del paziente; questo la differenzia dalle metodiche radiografiche convenzionali, che forniscono immagini di tipo sommativo (o additivo) rappresentanti la somma delle attenuazioni fotoniche di tutti i tessuti attraversati dai raggi X nel loro transito dalla sorgente radiogena al sistema di rivelatori;
- computerizzata, perché per la sua produzione è necessaria una digitalizzazione ed una ricostruzione dei dati dell'immagine ottenuta mediante sistemi hardware-software.

L'immagine TC viene costruita misurando l'attenuazione di un fascio collimato di raggi X generati da un tubo radiogeno rotante attorno al paziente, posizionato su un lettino che si muove in direzione longitudinale: in questo modo si ottiene una serie di immagini fra loro parallele in quanto si alternano momenti di erogazione del fascio e momenti di slittamento del lettino ed ogni immagine rappresenta l'attenuazione del fascio a raggi X da parte dei tessuti contenuti in ciascuna sezione corporea irradiata, la attenuazione è proporzionale al numero atomico ( $Z$ ). L'intensità dei raggi X che hanno attraversato i tessuti in esame viene registrata da un array di rivelatori (detettori) in posizione opposta rispetto al tubo radiogeno ed accoppiati a convertitori analogico-digitali; quindi, per ciascuna sezione irradiata il segnale digitalizzato relativo a diversi angoli di rotazione del complesso tubo-detettore (proiezioni) viene integrato ed elaborato in modo da ottenere un'immagine in cui le differenze di contrasto fra i vari punti che la compongono corrispondono a differenze di

attenuazione fotonica fra tessuti e/o materiali diversi.

Ad ogni pixel contenuto nell'immagine e dotato di una certa attenuazione corrisponde un voxel a livello del corpo del paziente. I voxel sono rappresentati geometricamente da parallelepipedi la cui base dipende dalla matrice di acquisizione e la cui altezza corrisponde allo spessore dello strato. Essendo ottenute mediante un processo di digitalizzazione, le immagini TC non sono costituite - a differenza di quelle analogiche - da punti di dimensioni virtualmente infinitesime, bensì da un numero finito di elementi discreti appunto i voxel. Come risultato del processo di costruzione dell'immagine, ad ogni voxel viene assegnato un valore di densità elettronica normalizzato rispetto alla densità dell'acqua, espresso in Unità Hounsfield (HU).

L'immagine TC è, in ultima analisi, un'immagine monoparametrica rappresentativa della distribuzione spaziale della densità elettronica dei tessuti compresi nello strato corporeo in esame. Per convenzione, in essa un voxel con maggiore densità verrà rappresentato, nel pixel che gli corrisponde, con una gradazione di grigio più chiara rispetto ad un voxel con minore densità: il rapporto tra densità elettronica, valore densitometrico e gradazione di grigio dell'immagine è quindi unidirezionale. Queste caratteristiche differenziano nettamente la TC rispetto alla RM, che rappresenta una metodica di imaging multiparametrica, in quanto il contrasto delle immagini RM può riflettere le differenze di più parametri (per esempio, i tempi di rilassamento T1 e T2).

Lo scanner TC è un'apparecchiatura complessa le cui componenti fondamentali sono il tavolo porta-paziente, il gantry (contenente il tubo radiogeno ed il collimatore del fascio e, in posizione opposta rispetto al tubo, i detettori), l'elettronica di acquisizione dei dati, il computer e la consolle di comando. Allo scanner TC sono solitamente collegati anche una o più consolle satelliti (workstations) per l'elaborazione (post-processing) delle immagini TC, un'unità a disco per la conservazione permanente delle immagini su supporto fisso e - ormai ubiquitario nei moderni di Radiodiagnostica - il sistema PACS (Picture Archiving and Communication System) per la

memorizzazione su server e la visualizzazione remota delle immagini.

La TC convenzionale di terza generazione denominata “step and shoot”, dato il movimento del lettino porta-paziente solo nell'intervallo di tempo tra due acquisizioni di immagini successive, è caratterizzata da apparecchi che utilizzano un fascio a raggi X a ventaglio, un gantry costituito da 500-1000 detettori contrapposti al tubo radiogeno, una velocità di rotazione a 360° continua attorno al paziente di 2-4 secondi, durante il quale il fascio emette alcune centinaia di impulsi di raggi X. Dopo la prima acquisizione la nuova rotazione per l'acquisizione dello strato successivo ha luogo in senso inverso, in modo da ricondurre alla posizione di partenza il complesso tubo-detettori e, con esso, i cavi per l'alimentazione del tubo radiogeno e per il trasferimento del segnale.

Nei tomografi a rotazione continua, resi disponibili verso la fine degli anni '80, il sistema tubo/detettori è collocato su un anello rotante all'interno del gantry; la sostituzione dei vincolanti cavi di alimentazione con contatti elettrici striscianti (“slip ring”) rende possibile la rotazione continua unidirezionale, associata allo scorrimento longitudinale continuo del lettino porta-paziente, il che consente una notevole riduzione dei tempi di acquisizione dei dati. Infatti, l'accoppiamento fra rotazione continua del complesso tubo-detettori ed avanzamento continuo del tavolo porta-paziente fa sì che i successivi piani di scansione descrivano una traiettoria elicoidale lungo l'asse longitudinale del paziente; questo rende necessaria l'applicazione di un algoritmo di interpolazione per la ricostruzione di immagini assiali fra loro parallele a partire dal volume continuo dei profili di attenuazione registrati (acquisizione volumetrica). Questo spiega perché, negli apparecchi TC elicoidali (o spirali), la risoluzione spaziale lungo l'asse longitudinale dipende non soltanto dalla collimazione del fascio radiante, ma anche dal pitch, definito come  $p=vt/s$ , dove  $v$  è la velocità di avanzamento del lettino porta-paziente,  $t$  è il tempo di rotazione del complesso tubo-detettori e  $s$  è la collimazione di strato. Valori di pitch più elevati comportano una maggiore velocità di acquisizione e una minore irradiazione del paziente, a spese di un allargamento dello spessore di strato effettivo (come conseguenza del sottocampionamento dei dati rispetto ad acquisizioni con



pitch unitario) e, quindi, di un peggioramento della risoluzione spaziale lungo l'asse longitudinale. Un altro notevole vantaggio delle apparecchiature TC spirali consiste nella possibilità di ottenere immagini fra loro parzialmente sovrapposte senza la necessità di aumentare la dose radiante somministrata al paziente. Ciò è particolarmente utile al fine di ottenere immagini più sottili rispetto allo spessore effettivo di strato senza ridurre la collimazione di strato (evitando quindi un prolungamento dei tempi di acquisizione ed un peggioramento del rapporto segnale-rumore), il che riduce gli artefatti da movimento e da volume parziale e migliora la qualità delle ricostruzioni bi- e tridimensionali.

Gli apparecchi TC spirali monodetettore - oggi peraltro superati dagli apparecchi spirali multidetettore, come spiegato più avanti - compiono un'intera rotazione del complesso tubo-detettori in 0.7 secondi - 1 secondo e consentono l'acquisizione continua per un massimo di 50-60 secondi, rendendo possibile la scansione di volumi corporei relativamente ampi in un'unica apnea.

Le forze meccaniche associate ad una rotazione del sistema tubo-detettori in tempi inferiori a 1s sono considerevoli e determinano il limite massimo di velocità raggiungibile nella singola rotazione (e, quindi, nella scansione). Nel contempo, i limiti di massima emissione del tubo radiogeno (e, quindi, di dissipazione termica) rendono spesso difficile conseguire un rapporto segnale/rumore sufficientemente elevato, soprattutto nel caso di ampi volumi di acquisizione con collimazioni di strato sottili e/o di acquisizioni multifasiche. Queste limitazioni sono state superate dall'introduzione, avvenuta alla fine degli anni Novanta, degli apparecchi TC multidetettore (o multistrato: TCMS), nei quali i raggi X attenuati dal paziente vengono rilevati da filiere multiple di detettori affiancati lungo l'asse longitudinale, che inviano il loro segnale ad una serie di convertitori analogico-digitali (da 4 a 64 ed oltre). A seconda del numero, delle dimensioni e della configurazione dei detettori, è possibile ottenere spessori di strato differenti con collimazioni del fascio radiante più ampie rispetto alla tecnologia spirale monodetettore, riducendo i tempi di acquisizione e/o consentendo l'acquisizione di immagini con risoluzione spaziale longitudinale

addirittura submillimetrica (grazie allo spessore assai ridotto dei singoli detettori rispetto alla tecnologia spirale monodettore). Inoltre, la possibilità di mediare il segnale proveniente da più detettori, la modificazione delle dimensioni del gantry (che permette di sopportare forze centrifughe maggiori, consentendo tempi di rotazione di 500ms o inferiori) e la maggiore capacità termica e di corrente dei tubi radiogeni delle apparecchiature TCMS contribuiscono a ridurre drasticamente i tempi di acquisizione e la quantità di mezzo di contrasto endovenoso necessaria per un buon enhancement contrastografico (soprattutto negli studi angio-TC e nelle fasi arteriose parenchimali per la valutazione di tessuti ipervascolari) preservando un rapporto segnale-rumore adeguato. L'elevata risoluzione spaziale lungo l'asse longitudinale consente poi di ottenere voxel isotropici, in cui cioè lo spessore sull'asse longitudinale sia confrontabile con le dimensioni trasversali: questo è particolarmente importante ai fini di massimizzare la qualità delle ricostruzioni multiplanari e volumetriche, comportando un potenziale aumento dell'accuratezza diagnostica soprattutto nella valutazione di piccole lesioni (in particolare se con risoluzione di contrasto relativamente bassa rispetto ai tessuti circostanti) e nella stadiazione chirurgica. Tali caratteristiche risultano particolarmente importanti nello studio dei pazienti oncologici, anche per quanto riguarda la patologia focale epatica [183].

## **TC di perfusione delle lesioni epatiche focali**

L'avvento della TCMS facilita la valutazione di parametri funzionali nei pazienti oncologici, come la perfusione tissutale, che può integrare l'informazione morfologica derivante dalle tecniche TC convenzionali. Questa tecnica fu inizialmente introdotta per la quantificazione della perfusione ematica cerebrale nei pazienti con ictus cerebrale ischemico acuto ed è stata recentemente riscoperta come un promettente strumento non invasivo per la valutazione delle alterazioni del microcircolo in numerose neoplasie, come l'epatocarcinoma [61,184], i carcinomi del pancreas [185,186], del polmone [187], del retto [188] e del distretto testa-collo [189-196]. Il rinnovato interesse nelle applicazioni oncologiche della TC di perfusione è stato alimentato dalla disponibilità di apparecchiature TC con risoluzione temporale e copertura anatomica a tavolo fermo maggiori (16-64 strati e oltre) rispetto alle precedenti generazioni di scanner TC, che – come vedremo nel seguito – sono presupposti essenziali per una quantificazione precisa dei parametri perfusionali [197,198].

Lo studio TC di perfusione si basa sulla registrazione continua dell'attenuazione dei raggi X da parte di un piccolo e rapido bolo di mdc iodato su una determinata regione di interesse (Region of Interest, ROI). L'acquisizione dinamica dura per un tempo necessario a coprire la fase di primo passaggio (first pass) del mdc organo-iodato all'interno del letto vascolare regionale, durante la quale esso ha una distribuzione intravascolare [23,199,200].

I principi teorici dell'esame TC di perfusione con acquisizione dinamica furono illustrati per la prima volta nel 1980 da Axel et al. [201] per la valutazione dell'ischemia cerebrale acuta. L'acquisizione dei dati veniva condotta in maniera continua su un livello anatomico fisso dopo la somministrazione di un bolo endovenoso di mdc, in modo tale da ottenere la registrazione di curve attenuazione-tempo del tessuto cerebrale. Da allora in poi, l'evoluzione tecnologica degli scanner TC ha portato a un progressivo miglioramento dell'hardware in termini di velocità di acquisizione, copertura volumetrica lungo l'asse longitudinale e risoluzione spaziale, ma il principio dello studio

dinamico dell'attenuazione fotonica su una determinata ROI dopo iniezione endovenosa di mdc è rimasto immutato. Il principio chiave delle classiche tecniche TC di perfusione consiste nell'assunto che lo spazio vascolare del tessuto esaminato sia comparabile, da un punto di vista emodinamico, ad un compartimento singolo dotato di un ingresso ed un'uscita (modello unicompartmentale), che corrispondono rispettivamente alle arterie afferenti e alle vene efferenti (le quali drenano l'intera quantità di sangue proveniente dall'ingresso arterioso). In altri termini, il modello unicompartmentale è applicabile se si può assumere che la dispersione interstiziale del mdc sia trascurabile durante il first pass [23,200].

Se la dispersione interstiziale del mdc non è trascurabile (come negli studi TC di perfusione in campo oncologico, in cui si prevede che il mdc fuoriesca durante il first pass attraverso i vasi altamente permeabili del microcircolo neoangiogenetico), è necessario ricorrere ad un modello bicompartimentale, che tenga conto del fatto che la quantità di sangue proveniente dall'ingresso arterioso viene trasferita in parte all'uscita venosa ed in parte al compartimento interstiziale. Affinché l'applicazione del modello bicompartimentale possa fornire risultati adeguati, è necessario che l'acquisizione dei dati TC venga prolungata oltre la durata del first pass, in modo da comprendere almeno la parte iniziale del passaggio interstiziale del mdc per il calcolo della permeabilità vascolare [23,200].

Fin dalla comparsa della tecnologia MDCT, alcuni autori si sono occupati del possibile impiego di quest'ultima per lo studio della perfusione tissutale sia in ambito generale [202,203] che in modo specifico [184,199,204,205].

Per quanto riguarda l' HCC, si è proceduto a studiare quantitativamente la vascolarizzazione epatica e le sue alterazioni a carico dei noduli neoplastici, sia precoci che in stadio avanzato, in assenza o presenza di epatopatia cirrotica di base: oggi è possibile valutare in modo sempre più specifico le alterazioni del microcircolo sulla base dell'aggressività biologica dell'HCC in studio. In un primo momento si è proceduto a studiare quantitativamente l'apporto di sangue proveniente dall'arteria

epatica e dalla vena porta con l'accurata visualizzazione del pattern contrastografico in fase arteriosa e porto-venosa. In particolare, Materne et al (2000) [206] indicano che la MDCT è una metodica valida per valutare la vascolarizzazione del fegato e di eventuali focalità parenchimali. Inoltre, è stato osservato che la MDCT ha la capacità di osservare alterazioni perfusionali epatiche tale da poter garantire uno studio molto accurato dal punto di vista anatomico, in base a staging, grading, e soprattutto in linea con la fisiopatologia tumorale riuscendo a discernere forme iniziali da quelle avanzate; tutto questo grazie alle caratteristiche tecniche alla base dell'acquisizione [202,203]. Lo studio perfusionale ha permesso consistenti progressi nella diagnostica poiché alterazioni dei parametri perfusionali possono riflettere variazioni precoci della differenziazione biologica delle lesioni focali nell'epatocarcinogenesi. Inoltre i parametri perfusionali assoluti calcolati sull'HCC non risentono della presenza o meno di cirrosi, di estensione a livello portale, dei parametri sierologici valutati in clinica e in questo modo la perfusione risulta un'entità autonoma unicamente correlata con l'aggressività biologica del tumore [184]. In linea con le modificazioni del microcircolo vascolare, Sahani et al. hanno rilevato una riduzione significativa di MTT nell'epatocarcinoma [184], presente anche nelle altre patologie neoplastiche come ad esempio il carcinoma del pancreas, da correlarsi allo sviluppo di circoli neoangiogenetici a bassa resistenza con aumentato flusso ematico e alterata permeabilità endoteliale. L'attenzione nelle applicazioni oncologiche agli studi TC di perfusione si è ulteriormente sviluppata con l'avvento della disponibilità di TCMS con un elevato numero di file di detettori (TC 64 S e oltre), grazie alla maggiore copertura anatomica e migliorando la risoluzione spaziale longitudinale rispetto alle precedenti generazioni di scanner TC [197,198]. In particolare, per quanto concerne l'epatocarcinoma, lo studio perfusionale ha dato risultati interessanti con l'utilizzo di TC a 4 strati [205] e a 16 strati [184,204]; tuttavia, non si hanno a tutt'oggi in letteratura esperienze sistematiche sull'impiego di apparecchiature TCMS con più di 16 file di detettori per lo studio perfusionale dell'HCC in pazienti candidati a terapia antiangiogenetica. È prevedibile, peraltro, che dall'utilizzo

di apparecchiature TCMS di ultima generazione si possano trarre importanti vantaggi, quali un aumento del volume corporeo esaminato durante l'acquisizione ed una minore sensibilità dell'acquisizione ad artefatti da movimento, che possono comportare fenomeni di disallineamento degli strati soprattutto nella fase finale della serie temporale acquisita ed impedire un corretto calcolo dei valori perfusionali.

## TABELLE

**Tabella 1.** Incidenza, aggiustata per età, espressa come numero di casi per 100.000 persone/anno nelle diverse aree geografiche.

<u>Area geografica</u>	<u>Incidenza aggiustata per età</u>	
	<u>Uomini</u>	<u>Donne</u>
<b>Il mondo</b>	14.67	4.92
<b>Paesi sviluppati</b>	7.64	2.65
<b>Paesi in via di sviluppo</b>	17.84	6.17
<b>Africa</b>	18.55	5.68
Africa orientale	28.38	13.58
Africa centrale	4.74	2.36
Africa settentrionale	20.11	6.59
Africa occidentale	22.15	6.67
<b>Asia</b>		
Asia orientale	34.77	10.78
Sud-est asiatico	17.58	5.84
Asia centro-meridionale	2.79	1.47
Asia occidentale	4.98	3.07
<b>Isole del Pacifico</b>	18.44	9.17
<b>Europa</b>		
Europa orientale	5.23	2.82
Europa settentrionale	2.66	1.38
Europa meridionale	9.89	3.41
Europa occidentale	4.89	1.55
<b>America</b>		
Carabi	8.01	4.41
America centrale	5.36	3.98
America meridionale	3.12	2.00
Stati Uniti e Canada	3.25	1.36
<b>Australia e Nuova Zelanda</b>	2.75	1.07

**Tabella 2.** Classificazione di Child-Pugh

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

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



**Tabella 3.** Classificazione di Okuda

-Estensione del tumore > 50%

del fegato

-Ascite +/-

-Albumina <3 g/dl

-Bilirubina >3 mg/dl

<b>Grado</b>	<b>Caratteristiche</b>
I	Assenza di fattori
II	Presenza di 1 o 2 fattori
III	Presenza di 3 o 4 fattori

**Tabella 4.4a.** Classificazione TNM

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

Tabella 4

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

Tabella 4a

**Tabella 5.** Classificazione CLIP

VARIABILI	0	1	2
Classe di Child-Pugh	A	B	C
Morfologia del tumore	uninodulare ed estensione $\leq 50\%$	multinodulare ed estensione $\leq 50\%$	massiva o estensione $>50\%$
Alfa-fetoproteina (ng/dl)	$< 400$	$\geq 400$	
Trombosi vena porta	no	si	

**Tabella 6.** Classificazione BCLC

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

**Tabella 7.** Sintesi di vantaggi e svantaggi delle diverse classificazioni

Score	Semplicità	Accuratezza prognostica	Validazione prospettica	Confronto prospettico con altri score	Valutazione funzione epatica
Okuda	+++	Bassa	Si	Si	Si
TNM	+	Bassa	Si	Si	No
CLIP	+++	Alta	Si	Si	Si
BCLC	++	Alta	No	No	Si

## **SCOPO DELLA TESI**

Valutare l'applicabilità di un protocollo per lo studio perfusionale quantitativo con TC a 64 canali dell'HCC avanzato in pazienti sottoposti a terapia antiangiogenetica con sorafenib, al fine di predire la risposta precoce al trattamento utilizzando il valore di alfafetoproteina plasmatica come marcatore biochimico di riferimento.

## MATERIALI E METODI

### **Selezione dei pazienti.**

Lo studio sperimentale ha coinvolto 7 pazienti (6 maschi, 1 femmina; età compresa fra 48 e 83 anni, media 69 anni) con diagnosi di HCC sottoposti a valutazione del parenchima epatico con TC a 64 canali, per un totale di 13 HCC. Tutti i pazienti hanno fornito il loro consenso informato allo studio e hanno effettuato TC perfusionale immediatamente prima di iniziare il trattamento con sorafenib (tempo zero); sono stati inoltre effettuati controlli mediante lo stesso protocollo TC perfusionale sulle stesse lesioni di interesse dopo uno e/o tre mesi. In tutti i pazienti, inoltre, è stato misurato il valore di  $\alpha$ FP plasmatica al tempo zero e in occasione dei successivi controlli TC.

### **Protocollo di acquisizione TC.**

Tutti gli esami TC sono stati eseguiti su uno scanner TC a 64 canali (LightSpeed VCT, GE Medical Systems, Milwaukee, WI). Prima di ogni acquisizione perfusionale, tutti i pazienti sono stati sottoposti, durante la stessa seduta di imaging, ad un esame TC preliminare per lo studio del parenchima epatico in toto e per localizzare l'area da indagare con la successiva acquisizione TC perfusionale.

L'acquisizione TC spirale standard era estesa all'intero addome superiore in modo da comprendere il parenchima epatico e consisteva in un'acquisizione spirale precontrastografica con i seguenti parametri: configurazione dei detettori 64x0.625mm, collimazione di detettore 2.5mm, intervallo di ricostruzione 2.5mm, beam pitch 0.984:1, tensione anodica 100-120kV, modulazione di corrente angolare e lungo l'asse z, intervallo di corrente 50-600mA, indice di rumore 17, tempo di rotazione 600ms, filtro di convoluzione a basso rumore (Soft).

Alla scansione precontrastografica seguiva un'acquisizione spirale multifasica post-contrastografica con gli stessi parametri di scansione, costituita da:

1. una fase arteriosa vascolare (o angiografica), ottenuta in corrispondenza del picco di enhancement arterioso in aorta addominale, finalizzata allo studio della vascolarizzazione arteriosa epatica;
2. una fase arteriosa parenchimale (arteriosa tardiva o di *early portal inflow*), ottenuta 10 secondi dopo il termine della fase precedente;
3. una fase porto-venosa (o parenchimale), ottenuta 25 secondi dopo il termine della fase precedente;
4. una fase tardiva (o interstiziale, o all'equilibrio), ottenuta 100 secondi dopo il termine della fase precedente.

Tutte le serie sono state successivamente retricostruite con spessore di 0.625mm, intervallo di ricostruzione di 0.625mm e filtro di convoluzione Soft per ottenere una risoluzione spaziale submillimetrica con isotropia del voxel e garantire, quindi, un'elevata qualità delle ricostruzioni bi- e tridimensionali, particolarmente utili per l'analisi dell'anatomia vascolare arteriosa e venosa (in particolare, in previsione di un'eventuale trapianto e/o di trattamenti interventistici trans-arteriosi, o nel caso di trombosi portale). La tensione anodica di 100kV è stata impiegata in pazienti di piccolo/medio volume corporeo in quanto consente, rispetto alla tensione standard di 120kV, una riduzione della dose radiante di circa il 35% ed un aumento della risoluzione di contrasto del 25%, che contribuisce a migliorare la qualità diagnostica delle immagini angio-TC e, in particolare, la visualizzazione di rami arteriosi di piccolo calibro [184,207]. Tutti i datasets sono stati poi archiviati su PACS in formato DICOM immediatamente dopo la fine dell'esame.



Attraverso una vena antecubitale è stato somministrato un volume di 1.7 mL/kg di iodixanolo con concentrazione iodica di 320mgI/mL (Visipaque 320, GE Healthcare, Oslo, Norvegia; volume massimo 130mL) con velocità di flusso di 5mL/s, seguito da un flush di 40mL di soluzione fisiologica alla stessa velocità di iniezione per ottimizzare l'efficienza del bolo di mdc.

Previa analisi preliminare delle immagini ottenute (durante il quale il paziente rimaneva sopra il tavolo TC), veniva condotto l'esame perfusionale in modalità cine (rotazione continua del complesso tubo-detettori a tavolo fermo) con copertura lungo l'asse longitudinale di 4cm, comprendente la lesione di interesse. I parametri di scansione perfusionale erano i seguenti: configurazione dei detettori 64×0.625mm, spessore di ricostruzione 2.5mm, tensione anodica 80kV, modulazione di corrente angolare e lungo l'asse z, intervallo di corrente 20-400mA, indice di rumore 20, tempo di rotazione 1000ms, risoluzione temporale effettiva di 500ms ottenuta mediante interpolazione temporale a 180°. Le immagini sono state ricostruite con kernel a bassa frequenza (Soft) per ridurre il rumore.

La scansione cine iniziava 10 secondi dopo l'iniezione di un secondo bolo di contrasto (40mL di iodixanolo 320mgI/mL ad una velocità di iniezione di 5mL/s) e durava 40 secondi, in modo da coprire l'intera durata del *first pass* del mdc e la porzione iniziale della fase di ricircolo del mdc per la misura di PS. Dopo 15 secondi dal termine dell'acquisizione cine, venivano eseguite quattro scansioni assiali sullo stesso livello anatomico e con gli stessi parametri tecnici della scansione cine, con una distanza temporale di 15 secondi l'una dall'altra, al fine di estendere il campionamento della fase di ricircolo del mdc per una misura più precisa di PS.

Prima dello studio perfusionale il paziente veniva istruito ad effettuare respiri ampi e lenti e veniva avvertito sia della durata protratta dell'acquisizione perfusionale che dell'eventuale sensazione di calore e/o di rapido flusso di mdc nel braccio, allo scopo di aumentarne la collaborazione e di

ridurre eventuali artefatti da movimento e/o da disallineamento degli strati del frameset perfusionale, che potrebbero compromettere l'accuratezza dei parametri perfusionali calcolati.

### **Post-processing dei dati perfusionali.**

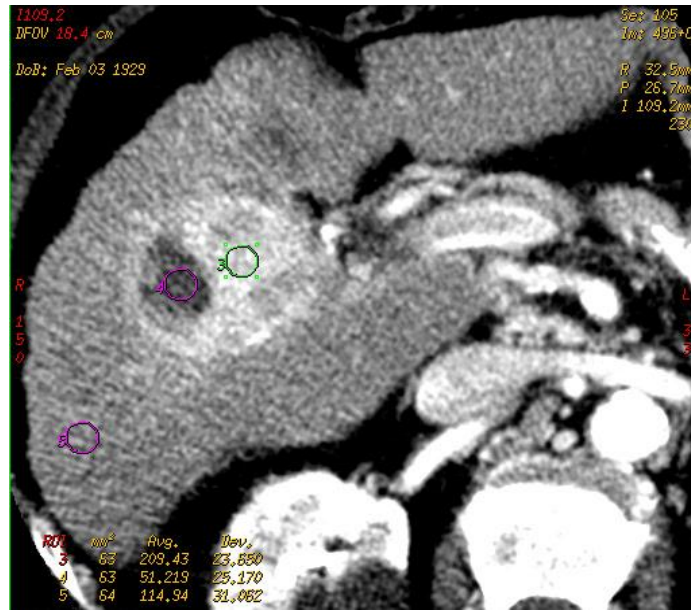
I datasets perfusionali sono stati inviati in formato DICOM mediante rete locale dallo scanner TC ad una workstation dedicata (Advantage Windows 4.4, General Electric, Milwaukee, WI). Mediante il plug-in CT Perfusion 4 venivano tracciate manualmente due ROI (Region Of Interest): una all'interno dell'HCC, l'altra su un'area di parenchima circostante a densità omogenea, ossia non comprendente vasi macroscopicamente visibili, calcificazioni o eventuali ectasie biliari (*figura 1*). La ROI sull'HCC veniva posizionata sulla sezione della neoplasia con la maggiore estensione di tessuto neoplastico, al fine di massimizzare la quantità di informazione acquisita per le misure dei parametri perfusionali in ogni paziente. Inoltre, per campionare la funzione di ingresso arterioso (Arterial Input Function, AIF: *figura 2*) e quella di ingresso portale, sono state posizionate due ROI circolari rispettivamente al centro del lume dell'aorta addominale e della vena porta o di un ramo portale afferente al territorio contenente la lesione di interesse. Il corretto posizionamento di tutte le ROI è stato verificato visualizzando la sezione selezionata su tutti i frame temporali del dataset perfusionale, con lo scopo di garantire che tutte le ROI si trovassero all'interno del distretto di interesse anche in caso di movimento del paziente. I contorni delle ROI sono stati tracciati ad una distanza di almeno 1mm dai margini della neoplasia per evitare effetti di volume parziale che avrebbero potuto alterare la misura quantitativa dei parametri di perfusione.

Utilizzando un modello bicompartimentale con doppia funzione di ingresso (arteriosa e portale), sono stati calcolati i seguenti parametri:

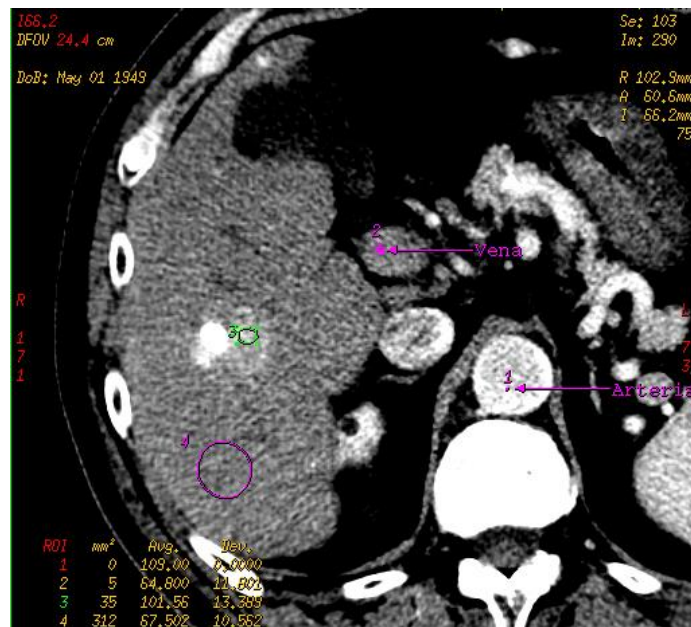
1. **Blood Volume (BV)**, ovvero il volume dello spazio vascolare del tessuto in esame in cui si distribuisce il mdc durante la sua fase di passaggio intravascolare;
2. **Blood Flow (BF)**, ovvero il volume ematico che transita dagli ingressi arterioso e portale attraverso lo spazio intravascolare tissutale nell'unità di tempo;
3. **Mean Transit Time (MTT)**, ovvero il tempo medio necessario affinché il mdc transiti dall'ingresso artero-portale all'uscita venosa attraverso il microcircolo tissutale;
4. **Hepatic Arterial Fraction (HAF)**, ovvero la quota ematica proveniente dall'arteria epatica;
5. **Permeability-Surface Product (PS)**, proporzionale alla frazione di mdc che diffonde dallo spazio intravascolare a quello interstiziale durante il *first pass* come conseguenza dell'aumentata permeabilità endoteliale del microcircolo neoangiogenetico neoplastico [23,200].

Poiché esiste una relazione lineare fra concentrazione tissutale locale di mdc ed attenuazione dei fotoni X, è possibile calcolare MTT mediante deconvoluzione delle curve di enhancement artero-portale e tissutale in funzione del tempo. BV viene calcolato come il rapporto fra l'area sotto la curva di enhancement tissutale e l'area sotto la curva di enhancement artero-portale, mentre BF viene calcolato come il rapporto fra BV e MTT (teorema del volume centrale) [23,200].

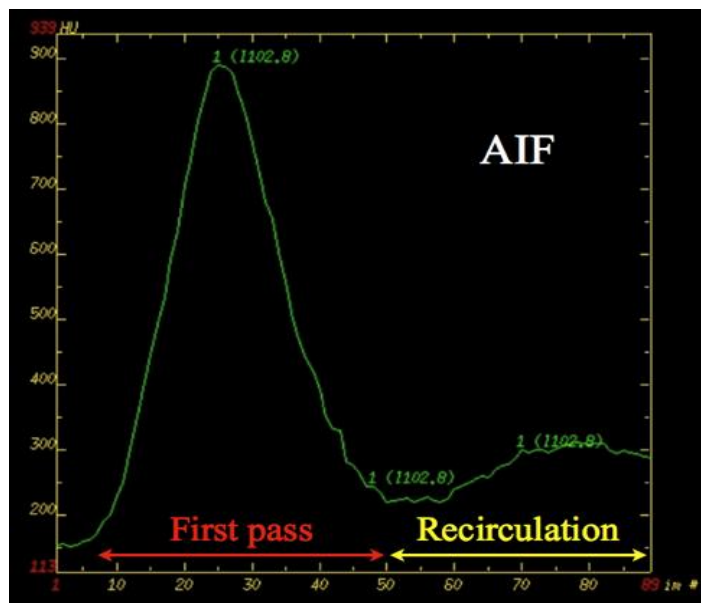
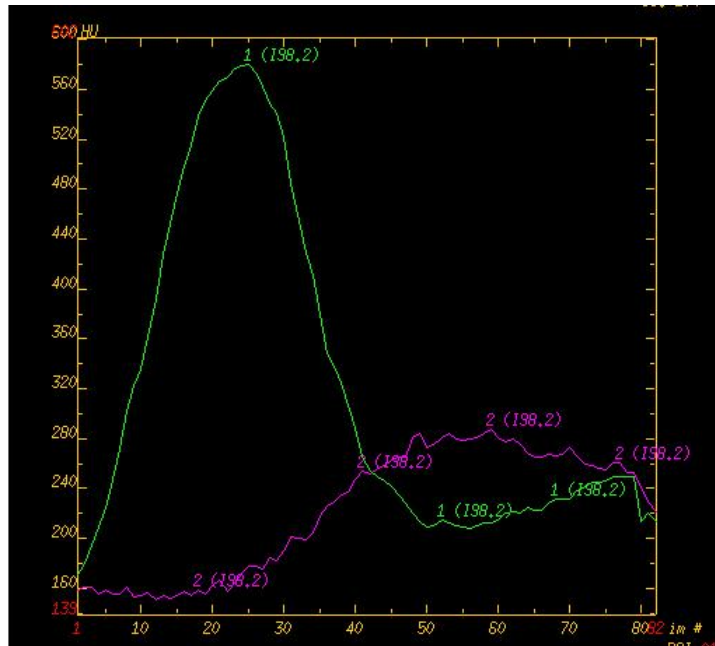
PS viene, infine, stimato mediante il calcolo della frazione di estrazione  $E=1-e^{-PS/BF}$ , che esprime la quota di mdc che diffonde dallo spazio intravascolare a quello interstiziale per effetto della permeabilità vascolare. Infine, per ciascuno dei quattro parametri perfusionali il plug-in costruisce una mappa perfusionale colorimetrica della sezione in esame (*figura 3*).



**Figura 1.** *posizionamento delle Region Of Interest (ROI) nel tessuto patologico (verde) e nel parenchima epatico sano (magenta).*

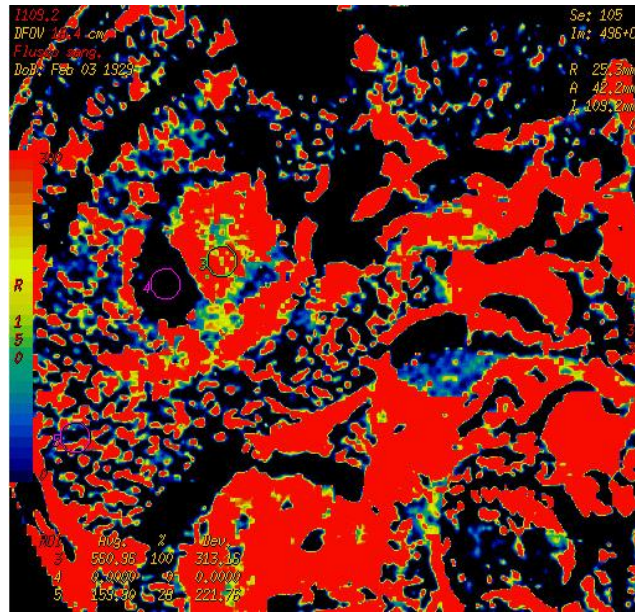


**Figura 2a.**

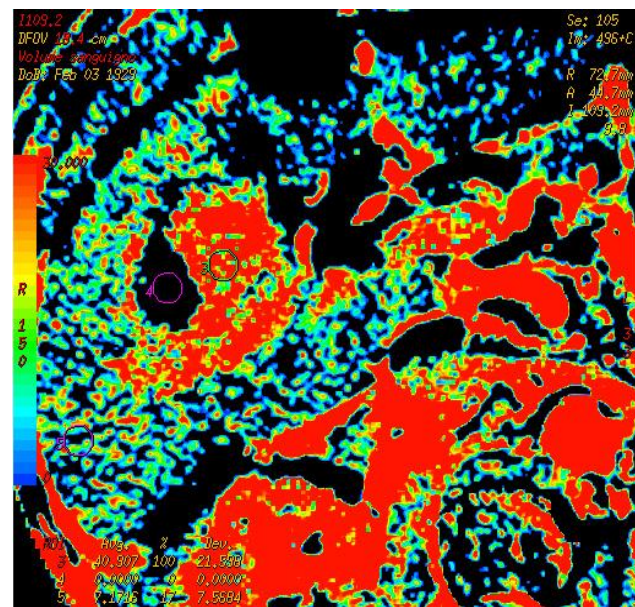


**Figura 2b.**

**Figura 2.** HCC del V segmento epatico. (a) posizionamento della ROI in aorta (per la determinazione di AIF) e nella vena porta; (b) curva dell'AIF, che esprime la variazione di densità (in HU) in funzione del tempo all'interno della ROI in arteria.

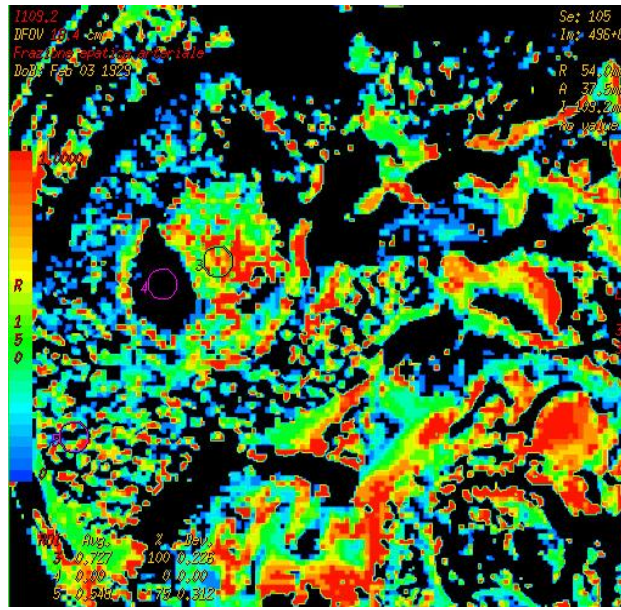


a.

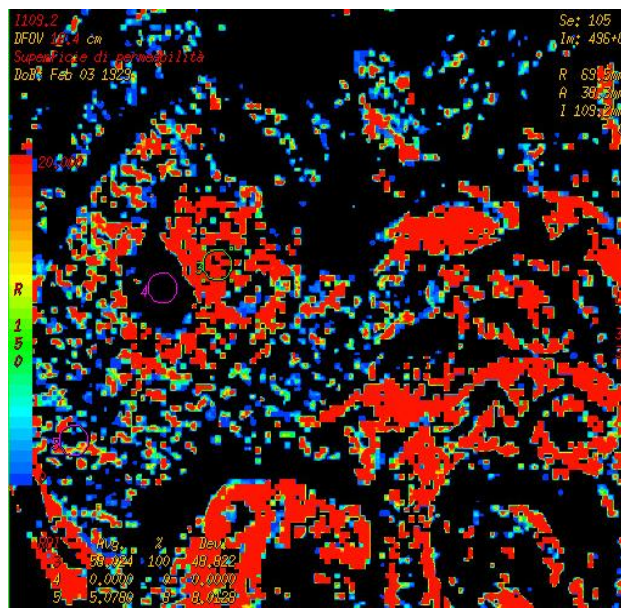


b.

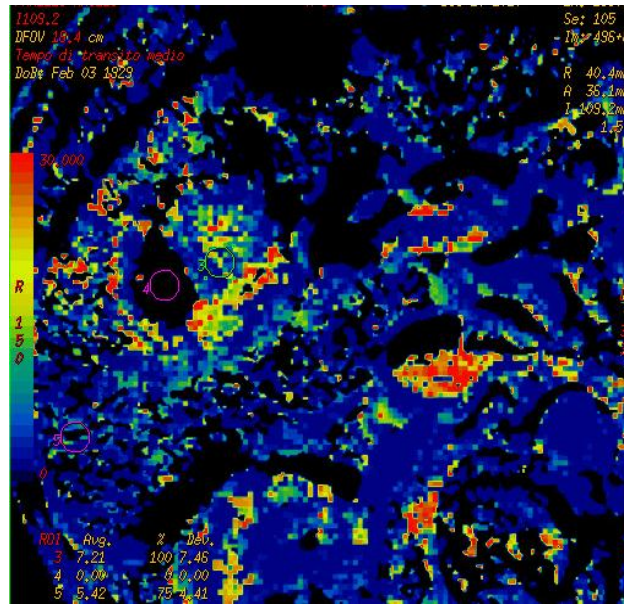




c.



d.



e.

**Figura 3.** Mappe perfusionali elaborate per la misurazione dei parametri quantitativi di perfusione:

- (a) *BF (Blood Flow), Flusso ematico;*
- (b) *BV (Blood Volume), Volume ematico;*
- (c) *HAF (Harterial Epathic Fraction), Frazione epatica arteriale;*
- (d) *PS (Pemeability- Surface Products), Prodotto permeabilità- superficie;*
- (e) *MTT (Mean Transit Time), Tempo di transito medio.*



### **Analisi statistica.**

I valori dei parametri perfusionali (BF, BV, MTT, HAF e PS) sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Tali parametri, misurati al tempo zero rispettivamente sulle lesioni HCC e nel parenchima epatico circostante, sono stati confrontati fra loro utilizzando il test t di Student a due code.

Gli stessi parametri perfusionali misurati al tempo zero e ai successivi controlli TC sono stati confrontati fra loro usando il test t di Student per dati appaiati.

Infine, mediante test di Pearson è stata calcolata la correlazione fra ciascun parametro perfusionale al tempo zero e la variazione di  $\alpha$ FP fra l'ultimo controllo TC e il valore di essa misurato al tempo zero.

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma GraphPad Prism 5.04 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Come soglia di significatività statistica è stato posto  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

Al tempo zero, i valori di BF, BV, HAF e PS erano significativamente aumentati e MTT era significativamente ridotto nell'HCC rispetto al parenchima circostante (*Tabella 1*).

Parametro (tempo zero)	HCC	Parenchima circostante	p
<b>BF<sub>0</sub></b>	397.64 ± 297.78	129.86 ± 125.18	0.0002*
<b>BV<sub>0</sub></b>	34.97 ± 45.31	6.79 ± 6.60	0.0007*
<b>HAF<sub>0</sub></b>	0.47 ± 0.22	0.27 ± 0.20	0.0058*
<b>PS<sub>0</sub></b>	32.17 ± 24.16	15.92 ± 20.25	0.0196*
<b>MTT<sub>0</sub></b>	5.15 ± 1.87	8.98 ± 2.86	0.0097*

*Tabella 1. Parametri TC perfusionali misurati al tempo zero. \*Statisticamente significativo (p<0.05).*

Dopo trattamento con sorafenib, i valori di BF, BV, HAF e PS tendono a diminuire nelle lesioni HCC rispetto al parenchima circostante, sebbene in maniera non significativa; MTT è invece l'unico parametro che aumenta in maniera significativa (p=0.0017; *Tabella 2*).

	<b>ΔBF</b>	<b>ΔBV</b>	<b>ΔHAF</b>	<b>ΔPS</b>	<b>ΔMTT</b>
<b>Variazione post-terapia</b>	78.3 ± 225.3	-6.7±59.3	-0.10 ± 0.31	3.58 ± 40.6	3.08 ± 2.76
<b>p</b>	0.5097	0.7444	0.8905	0.4118	0.0017*

*Tabella 2. Variazione dei parametri perfusionali dopo terapia. \*Statisticamente significativo (p<0.05).*

In *Tabella 3* sono riportati i coefficienti di correlazione fra parametri TC perfusionali misurati al tempo zero e variazione della concentrazione plasmatica di αFP fra l'ultimo controllo TC e il valore

di essa misurato al tempo zero: tale correlazione è statisticamente significativa per BF e MTT (quest'ultima inversa).

<b>Parametri perfusionali</b>	<b>BF<sub>0</sub></b>	<b>BV<sub>0</sub></b>	<b>HAF<sub>0</sub></b>	<b>PS<sub>0</sub></b>	<b>MTT<sub>0</sub></b>
<b>r</b>	0.6476	0.3846	0.2466	0.3004	-0.6685
<b>p</b>	0.0167*	0.1944	0.4166	0.3186	0.0125*

**Tabella 3.** Correlazione fra parametri TC perfusionali al tempo zero e variazione di aFP dopo terapia. *r*

*r* rappresenta il coefficiente di correlazione di Pearson. \*Statisticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSIONE

Il ruolo dell'analisi TC di perfusione nella valutazione della patologia focale epatica non è ancora stato chiarito e sono tuttora pochi gli studi [184,203] che hanno esaminato il suo potenziale contributo nello studio dell'HCC. In particolare, non risultano pubblicazioni concernenti l'analisi perfusionale quantitativo della patologia focale epatica con TC a 64 canali.

Negli ultimi anni la TC ha conosciuto una notevole evoluzione tecnologica [208] che ha consentito importanti progressi anche nello studio TC della perfusione tissutale. In particolare:

- la disponibilità di una più ampia copertura del fascio radiante lungo l'asse longitudinale del paziente rispetto ad apparecchi TC di generazioni precedenti permette lo studio di volumi tissutali più estesi, il che può essere vantaggioso sia in termini di maggiore esplorabilità della lesione di interesse e di regioni ad essa limitrofe, sia per la riduzione di eventuali artefatti di disallineamento degli strati in rapporto a movimento del paziente durante l'acquisizione perfusionale [209,210,211];
- la tecnologia TC multistrato, unitamente all'impiego di detettori con ampiezza submillimetrica lungo l'asse longitudinale, consente l'acquisizione contemporanea di sezioni anche ultrasottili, con evidenti vantaggi in termini di risoluzione spaziale e di precisione del campionamento nelle regioni di interesse.

I risultati ottenuti indicano che, al tempo zero, i valori di BV, BF, HAF e PS erano significativamente maggiori nelle lesioni HCC rispetto al parenchima epatico circostante, mentre il valore di MTT era significativamente ridotto. Questi parametri riflettono l'aumento della vascolarizzazione arteriosa nell'HCC in rapporto alla neoangiogenesi, che si traduce in un incremento sia del volume ematico (BV) che del flusso ematico (BF) come conseguenza rispettivamente del reclutamento di neovasi disposti in parallelo fra loro e dell'aumentata pressione

di perfusione intralesionale.

La frazione epatica arteriale (HAF) esprime la quota di vascolarizzazione arteriosa misurata nella regione di interesse e il suo aumento nelle lesioni HCC è dovuto al fatto che i circoli neoangiogenetici al loro interno sono sostenuti da rami dell'arteria epatica.

Molto indicativa è anche la riduzione significativa del MTT rispetto al parenchima epatico circostante. Tale reperto si può spiegare con la formazione di shunt artero-venosi intralesionali che determinano una drastica riduzione delle resistenze vascolari intralesionali, cui concorre l'aumentata pressione di perfusione rivelata dall'aumento di BF. In tal senso, Zhu et al [61] hanno ipotizzato che la riduzione di MTT sia associata allo sviluppo di circoli neoangiogenetici a bassa resistenza con aumentato flusso ematico intralesionale e maggiore permeabilità microvascolare.

L'incremento del prodotto permeabilità-superficie (PS) esprime la maggiore permeabilità dell'endotelio dei neovasi rispetto al microcircolo normale. Infatti, PS è un indicatore della frazione di mdc che diffonde dallo spazio intravascolare a quello interstiziale durante il *first pass*, ossia nella sua fase di biodistribuzione intravascolare, per effetto della permeabilità dell'endotelio vasale. I neovasi tumorali sono tipicamente più permeabili dei capillari normali, in quanto caratterizzati da un'anomala architettura del neoendotelio, che risulta ampiamente fenestrato, privo di tonaca media e contenente foci di necrosi: ciò facilita lo stravasamento precoce di mdc nell'interstizio durante il *first pass* intravascolare e, viceversa, la sua retrodiffusione nel compartimento intravascolare durante la fase di ricircolo. D'altra parte, anche in ambito extraepatico Goh et al. [212] hanno trovato una correlazione statisticamente significativa fra densità microvascolare (determinata mediante marcatura immuno-istochimica con anticorpi anti-CD34) e PS e BV nell'adenocarcinoma del retto, mentre Bisdas et al. [189] hanno riscontrato un aumento di PS - sebbene statisticamente non significativo - in neoplasie parotidiche con un elevato rapporto fra cellularità e stroma (come i tumori di Warthin) rispetto a tumori maligni. Quest'ultimo reperto dipende probabilmente dal fatto che i

tumori di Warthin contengono molti capillari ed uno stroma ipercellulare, al contrario dei tumori maligni, come i carcinomi, i quali possiedono anch'essi un microcircolo sviluppato, ma presentano uno stroma ipocellulare [189].

L'aumento di BF, BV e PS e la riduzione di MTT riflettono alterazioni generali dell'endotelio neoplastico rispetto a quello normale e sono stati documentati in letteratura anche in neoplasie extraepatiche, come i carcinomi del retto [192,217], del polmone [218], del tratto aerodigestivo superiore [193,219] e nel carcinoma endocrino pancreatico [189]. Inoltre, i nostri risultati sono in accordo con quelli ottenuti da altri Autori [184,203] su lesioni HCC utilizzando apparecchiature TC con 16 strati e copertura anatomica minore (2cm) rispetto al nostro protocollo.

In particolare, la significativa riduzione di MTT nell'HCC rispetto al parenchima epatico circostante trova riscontro negli analoghi risultati ottenuti da Sahani et al e Zhu et al [61,184] nell'HCC e, in ambito extraepatico, rispettivamente da Gandhi et al. [196] nei tumori maligni del distretto testa-collo e da Li et al. [216] nel carcinoma polmonare. Inoltre, Rumboldt et al. [194] hanno suggerito che, nei tumori del distretto testa-collo, una riduzione di MTT correla con la natura maligna della lesione, in quanto nella loro esperienza lesioni maligne presentano un MTT medio minore di 3.5 secondi, mentre lesioni benigne hanno un MTT mediamente maggiore di 5.5 secondi. In maniera analoga, i nostri risultati indicano che alla terapia antiangiogenetica con sorafenib consegue un significativo allungamento di MTT e che bassi valori di MTT prima dell'inizio del trattamento correlano con maggiori differenze di  $\alpha$ FP dopo terapia (ovvero con una migliore risposta terapeutica). Ciò, peraltro, è in linea con i risultati di Zhu et al [61], che hanno trovato un'associazione fra aumento di MTT e risposta alla terapia con bevacizumab in pazienti con HCC.

La valutazione dell'attività angiogenetica dei tumori è ancora oggetto di studio: i potenziali biomarker dell'angiogenesi fino a oggi utilizzati, sia immunoistochimici, come la conta dei microvasi (MVD) e la determinazione dei recettori per il fattore di crescita vascolare endoteliale

(VEGF), che sierici, come la conta delle cellule endoteliali circolanti (CEC), hanno dato risultati incoraggianti, ma poco uniformi [215]. Non sorprende, pertanto, che nessuno di questi sia considerato un indicatore definitivo dell'attività angiogenetica, utilizzabile per la caratterizzazione funzionale dei tumori. Questi potenziali biomarcatori, inoltre, richiedono tecniche costose, invasive e non diffuse sul territorio: essi sembrano poco adatti per il monitoraggio seriale delle terapie anti-angiogenetiche nella routine clinica.

La TC perfusionale, invece, è stata dimostrata essere in grado di evidenziare una riduzione della perfusione dopo una singola somministrazione del farmaco antiangiogenetico nell'HCC e in altri tumori solidi [216,217,218]. Il potenziale impiego della TC perfusionale a fini prognostici risulta importante, in quanto sarebbe necessario effettuare una valutazione precoce della possibilità di risposta al sorafenib. Questo farmaco, infatti, è molto costoso e provoca molteplici effetti collaterali come astenia, diarrea, perdita di peso, eruzioni cutanee, dolore addominale e reazioni cutanee, che risultano notevolmente invalidanti in pazienti già notevolmente compromessi dall'insufficienza epatica che è solitamente associata alla loro condizione.

Una possibile spiegazione dei risultati sopra descritti consiste nel fatto che una bassa perfusione tumorale determina una cattiva risposta alla chemioterapia, dato che tumori poco perfusi sono raggiunti difficilmente dai farmaci antitumorali. Una TC perfusionale eseguita prima dell'inizio della terapia potrebbe dunque identificare i pazienti candidati a una cattiva risposta, indirizzandoli a trattamenti personalizzati o alternativi.

Una limitazione di questo studio è rappresentata dal numero esiguo di pazienti arruolati: ciò è dovuto al fatto che il trattamento con sorafenib rappresenta l'ultima di una serie di terapie previste e pertanto comprende soltanto pochi pazienti che non hanno risposto alle terapie precedenti. In ogni caso, è stato dimostrato che il sorafenib permette un buon controllo della malattia o, quanto meno, ne rallenta la progressione [184].

Un'altra limitazione - comune ad altri studi - è che non disponiamo di una correlazione diretta con i dati anatomopatologici, in quanto non appare giustificabile (anche su un piano etico) sottoporre ripetutamente i pazienti a prelievo biotico per la determinazione immunocistochimica dei markers di neoangiogenesi tumorale. Peraltro, la biopsia epatica comporterebbe rischi non trascurabili in questi pazienti, frequentemente affetti da cirrosi e coagulopatia. Ciò che caratterizza il nostro studio, tuttavia, è il fatto che, diversamente da altri lavori presenti in letteratura, abbiamo considerato come marcatore non un parametro dimensionale-morfologico, ma un parametro biologico-funzionale come l' $\alpha$ FP.

Un'altra limitazione intrinseca al nostro studio (e, in generale, a tutti quelli riguardati la TC perfusionale) è la dose radiante erogata ai pazienti per l'esecuzione dell'acquisizione perfusionale, che si somma a quella necessaria per lo studio morfologico convenzionale multifasico del fegato. A tale proposito, il protocollo di acquisizione utilizzato consente di somministrare una dose relativamente contenuta, grazie all'impiego di una bassa tensione anodica (80kV rispetto ai 120kV standard) e di tecniche di modulazione angolare e longitudinale della corrente del tubo [219,220]. Il peggior rapporto segnale-rumore conseguente alla riduzione della dose radiante viene compensato sia dalla ricostruzione delle immagini con un filtro a bassa frequenza (ossia a basso rumore), sia dall'altissima risoluzione di contrasto dovuta alla maggiore attenuazione dei fotoni X per prevalente effetto fotoelettrico a 80kV [221], unitamente all'elevata velocità di iniezione del mezzo di contrasto. Fra l'altro, le immagini TC di perfusione possono essere acquisite con rapporto segnale/rumore relativamente basso, in quanto non sono destinate ad una diagnosi morfologica, bensì al calcolo di parametri funzionali da parte di un software dedicato. Inoltre, l'elevato carico radiante dello studio morfologico multifasico convenzionale fa sì che l'ulteriore dose radiante dovuta all'acquisizione perfusionale sia relativamente esigua (intorno al 25% dello studio morfologico stesso), il che può probabilmente essere accettabile visto il potenziale beneficio derivante dall'acquisizione di informazioni sulla perfusione tissutale in pazienti candidati a terapia



con sorafenib. E' verosimile, poi, che la diffusione di apparecchi TC con più di 64 canali, dotati di una copertura anatomica sull'asse longitudinale ancora più ampia (fino a 16cm) e di algoritmi di ricostruzione iterativa delle immagini, renda possibile lo studio perfusionale di interi organi a tavolo fermo con dosi radianti nettamente inferiori [220].

Un'altra limitazione è costituita dal fatto che la TC a 64 strati da noi utilizzata consente lo studio perfusionale a tavolo fermo con una copertura longitudinale di soli 4cm: se questo rappresenta un progresso rispetto ad apparecchiature TC di generazioni precedenti [184], non mette comunque del tutto al riparo da artefatti da movimento (in particolare legati al respiro del paziente durante l'acquisizione TC perfusionale), essendo il fegato un organo dotato di mobilità elevata in relazione al suo rapporto stretto con il diaframma e poiché al paziente è richiesta una apnea abbastanza prolungata (40 secondi). Tuttavia, la notevole ridondanza dei dati perfusionali raccolti durante il *first pass* ha fatto sì che, almeno nella nostra esperienza, non si siano osservati significativi artefatti dovuti a disallineamento delle immagini ottenute, che avrebbero potuto introdurre errori nel calcolo dei parametri perfusionali quantitativi.

Considerando che i mezzi di contrasto paramagnetici convenzionali hanno la stessa biodistribuzione intravascolare-interstiziale dei mezzi di contrasto organo-iodati uro-angiografici, ci si potrebbe chiedere perché si sia scelto di utilizzare per lo studio perfusionale la TC anziché la RM, la quale, oltre a presentare i noti vantaggi di mancata esposizione a radiazioni ionizzanti e a mezzo di contrasto potenzialmente nefrotossico, consentirebbe di acquisire dati perfusionali con bobine dedicate su volumi teoricamente molto più estesi su piani diversi da quello assiale. Esiste addirittura la possibilità di valutare la perfusione tissutale con RM senza mezzo di contrasto mediante l'impiego di particolari sequenze di impulsi sensibili al flusso ematico (Arterial Spin Labelling, ASL) o all'ossigenazione tissutale (Blood Oxygen Level Dependent, BOLD). Tuttavia, queste ultime tecniche non sono - almeno allo stato attuale della tecnologia - utilizzabili per lo studio perfusionale dell'HCC a causa della loro estrema sensibilità ad artefatti da suscettività magnetica,

del loro scarso rapporto segnale-rumore e della loro bassa risoluzione spaziale. Inoltre, la RM non è in grado - almeno allo stato attuale della tecnologia - di garantire una quantificazione accurata della perfusione tissutale (e, in particolare, epatica) poiché, a differenza di quanto accade in TC con il mezzo di contrasto iodato (la cui attenuazione fotonica varia linearmente con la sua concentrazione), l'intensità di segnale in RM non varia linearmente con la concentrazione del mezzo di contrasto paramagnetico, ma subisce un calo paradossale per concentrazioni elevate (effetto T2). Il segnale RM, poi, dipende da variabili intrinseche al tipo di acquisizione effettuata - come la sequenza di impulsi e la bobina impiegata, l'intensità del campo magnetico statico e dei gradienti - che rendono la quantificazione dei parametri perfusionali scarsamente riproducibile e poco precisa.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che lesioni HCC presentano un significativo allungamento di MTT dopo terapia con sorafenib e che il valore di MTT al tempo zero correla inversamente con la riduzione di  $\alpha$ FP dopo terapia. Ciò suggerisce che MTT possa essere utilizzato sia come marcatore della risposta terapeutica, sia come predittore di risposta pre-trattamento in pazienti con HCC avanzato candidati a terapia con sorafenib.

## BIBLIOGRAFIA

1. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003;37(2):429-442;
2. 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(3):421-430;
3. Stroffolini T, Andreone P, Andriulli A, et al. Characteristics of hepatocellular carcinoma in Italy. *J Hepatol* 1998;29:944-952;
4. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N Engl J Med* 1997;336:1855-1859;
5. Nishiguchi S, Shiomi S, Nakatani S, et al. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis. *Lancet* 2001;357:196-197;
6. Tan A, Yeh SH, Liu CJ, Cheung C et al. Viral hepatocarcinogenesis: from infection to cancer. *Liver International* 2008; 28(2): 175-88;
7. Orito E, Ichida T, Sakugawa H et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 2001; 34:590-4;
8. Ding X, Mizokami M, Yao G, et al. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001; 44: 43-7;
9. Fattovich G, Giustina G, Degos F, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997; 112:463;
10. Hu KQ, Tong MJ. The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. *Hepatology* 1999; 29:1311;
11. Garcia-Samaniego J, Rodriguez M, Berenguer J, et al. Hepatocellular carcinoma in HIV infected patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:179-183;

12. Geller SA . Hepatitis B and hepatitis C. Clin Liver Dis 2002; 6: 317–34;
13. Kojiro M (2007) Diagnostic discrepancy of early hepatocellular carcinoma between Japan and West. Hepatology Res;37:S249-S252;
14. International Working Party (1995) Terminology of nodular hepatocellular lesions. HEPATOLOGY;22:983-993;
15. Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC Press 2000;
16. Hytioglou P, Park Y N., Krinsky G et al. Hepatic Precancerous Lesions and Small Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterol Clin N Am 2007; 36: 867–887;
17. Kojiro M. Focus on Dysplastic Nodules and Early Hepatocellular Carcinoma:An Eastern Point of View. Liver Transplantation 2004; 10(2): S3–S8.;
18. Pathologic Diagnosis of Early Hepatocellular Carcinoma (2009) A Report of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia HEPATOLOGY, Vol. 49, No. 2;
19. Choi B. Hepatocarcinogenesis in liver cirrhosis: Imaging diagnosis. J Korean Med Sci 1998;13:103-106;
20. Choi B. The current status of imaging diagnosis of hepatocellular carcinoma. Liver Transpl 2004;10:S20-S25;
21. Yamaguchi R, Yano H, Iemura A et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 1998; 28:68-77;
22. Theise ND. Macroregenerative (dysplastic) nodules and hepatocarcinogenesis: theoretical and clinical considerations. Semin Liver Dis 1995;15(4):360–71;
23. Lee TY, Purdie TG, Stewart E. CT imaging of angiogenesis. Q J Nucl Med 2003;47:171-187;
24. Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, et al. Malignant transformation of adenomatous hyperplasia to hepatocellular carcinoma.Lancet 1990;336:1150–3;

25. Takayama T, Makuuchi M, Kojiro M, et al. Early Hepatocellular Carcinoma: Pathology, Imaging, and Therapy. *Annals of Surgical Oncology* 2008 ; 15(4):972–978;
26. Kojiro M. *Pathology of hepatocellular carcinoma*. Malden: Blackwell Publishing Inc (USA) 2006;
27. Kondo F, Kondo Y, Nagato Y, et al. Interstitial tumour cell invasion in small hepatocellular carcinoma. Evaluation in microscopic and low magnification views. *J Gastroenterol Hepatol* 1994; 9(6):604–12;
28. Park YN, Kojiro M, Di Tommaso L, et al. Ductular reaction is helpful in defining early stromal invasion, small hepatocellular carcinomas, and dysplastic nodules. *Cancer* 2007;109(5):915-23;
29. Nakashima O, Sugihara S, Kage M, et al. Pathomorphologic characteristics of small hepatocellular carcinoma: a special reference to small hepatocellular carcinoma with indistinct margins. *Hepatology* 1995;22(1):101–5;
30. Kojiro M, Nakashima O. Histopathologic evaluation of hepatocellular carcinoma with special reference to small early stage tumors. *Semin Liver Dis* 1999; 19(3):287–96;
31. Sakamoto M, Hirohashi S, Shimosato Y. Early stages of multistep hepatocarcinogenesis: adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 1991;22(2):172–8;
32. Eggel H. Uber das primare Carcinom der Leber. *Beitr Pathol Anat Allg Pathol* 1901; 30: 506;
33. Liver Cancer Study Group of Japan. *Classification of Primary Liver Cancer*. Tokyo: Kanehara, Ltd; 2000;
34. Nakamura K, Zen Y, Sato Y, et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor Flk-1, and hypoxia inducible factor-1a are involved in malignant transformation in dysplastic nodules of the liver. *Human Pathology* 2007; 38: 1532– 1546;
35. Ueda K, Matsui O, et al. Hypervascular hepatocellular carcinoma: evaluation of hemodynamics with dynamic CT during hepatic arteriography. *Radiology* 1998;206(1):161-6;
36. Collier J, Sherman M. Screening for Hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;27:273-278;

37. Oka H, Tamori A, Kuroki T, Kabayashi K, Yamamoto S. Prospective study of alphafetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994;19:61-66;
38. Sherman M, Peltekian KM, Lee C. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* 1995;22:432-438;
39. Pateron D, Ganne N, Trinchet JC, et al. Prospective study of screening for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1994;20:65-71;
40. Torzilli G, Minagawa M, Takayama T, et al. Accurate preoperative evaluation of liver mass lesions without fine needle biopsy. *Hepatology* 1999;30:889-893;
41. Velazquez RF, Rodriguez M, Navascues CA , et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2003;37:520-527;
42. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907-1917;
43. Sheu JC, Sung JL, Chen DS, et al. Growth rates of asymptomatic hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *Gastroenterology* 1985;89:259-266;
44. Bruix J, Sherman M; Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Disease. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:1208-1236;
45. Pons F, Varela M, Llovet J, et al. Staging systems in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*. 2005;7:35-41;
46. Nakashima T, Kojiro M. *Hepatocellular Carcinoma*. Tokyo: Springer Verlag, 1987;
47. Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2002;122:160
48. Trevisani F, D'Intino PE, Grazi GL, et al. Clinical and pathologic features of hepatocellular carcinoma in young and older Italian patients. *Cancer* 1996;77:2223-2232;

49. Bartolozzi C, Crocetti L, Della Pina MC. How to differentiate liver lesions in cirrhosis. *JBR-BTR* 2007; 90(6): 475-81;
50. Valls C, Cos M, Figueras J, et al. Pretransplantation diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: value of dual-phase helical CT. *AJR Am Roentgenol* 2004;182(4):1011-7;
51. Marrero JA, Hussain HK, Nghiem HV, et al. Improving the prediction of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with an arteriallyenhancing liver mass. *Liver Transpl* 2005;11(3):281-9;
52. Bolondi L, Gaiani S, Celli N, et al. Characterization of small nodules in cirrhosis by assessment of vascularity: the problem of hypovascular hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42(1):27-34;
53. Choi BI, Kim CW, Han MC, et al. Sonographic characteristics of small hepatocellular carcinoma. *Gastrointest Radiol* 1989;14:255-261;
54. Taylor KJ, Ramos I, Morse SS, Fortune KL, Hammers L, Taylor CR. Focal liver masses: differential diagnosis with pulsed Doppler US. *Radiology*. 1987;164:643-647;
55. Gaiani S, Volpe L, Piscaglia F et al. Vascularity of liver tumours and recent advances in doppler ultrasound. *J Hepatol*. 2001;34:474-482;
56. Rubin JM, Bude RO, Carson PL et al. Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. *Radiology*. 1994;190:853-856;
57. Mitchell DG. Color Doppler imaging: principles, limitations, and artifacts. *Radiology*. 1990;177:1-10;
58. Schlieff R, Staks T, Mahler M, Rufer M, Fritsch T, Seifert W. Successful opacification of the left heart chambers on echocardiographic examination after intravenous injection of a new saccharide based contrast agent. *Echocardiography*. 1990;7:61-64;

59. Shiraishi J, Sugimoto K, Moriyasu F et al Computer-aided diagnosis for the classification of focal liver lesions by use of contrast-enhanced ultrasonography. *Med Phys.* 2008 May;35(5):1734-46;
60. Ferrara KW, Merritt CR, Burns PN et al. Evaluation of tumor angiogenesis with US: Imaging, Doppler, and contrast agents *Acad Radiol* 2000;7:824–839;
61. Zhu AX, Holalkere NS, Muzikansky A et al. Early antiangiogenic activity of bevacizumab evaluated by computed tomography perfusion scan in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *The Oncologist* 2008;13:120-125;
62. Guenther F, von zur Muhlen C, Ferrante EA et al; An ultrasound contrast agent targeted to P-selectin detects activated platelets at supra-arterial shear flow conditions. *Invest Radiol.* 2010 Oct;45(10):586-91;
63. Mehier-Humbert S, Bettinger T, Yan F, et al; Influence of polymer adjuvants on the ultrasound-mediated transfection of cells in culture. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009 Aug;72(3):567-73. Epub 2009 Mar 4;
64. Earls JP, Theise ND, Weinreb JC, et al (1996) Dysplastic nodules and hepatocellular carcinoma: thin-section MR imaging of explanted cirrhotic livers with pathologic correlation. *Radiology*; 201: 207-214;
65. Yamashita Y, Fan ZM, Yamamoto H, et al (1994) Spin-echo and dynamic gadolinium-enhanced FLASH MR imaging of hepatocellular carcinoma: correlation with histopathologic findings. *J Magn Reson Imaging*; 4: 83-90;
66. Marti-Bonmati L.: MR imaging characteristics of hepatic tumors. *Eur RADIOL* 1997, 7. 249-258;
67. Inoue E., Kuroda C., Fujita M. et al.: MR features of various histological grades of small hepatocellular carcinoma. *J Comput Assist Tomogr* 1993; 17: 75-79;



68. Krinsky G.A., Lee V.S., Theise N.D. et al.: Hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in patients with cirrhosis: prospective diagnosis with MR imaging and explantation correlation. *Radiology* 2001; 219: 445-454;
69. Ebara M., Fukuda H., Kojima Y. et al.: Small hepatocellular carcinoma: relationship of signal intensity to histopathologic findings and metal content of the tumor and surrounding hepatic parenchyma. *Radiology* 1999; 210: 81-88;
70. Kadoya M., Matsui O., Takashima T. et al.: Hepatocellular carcinoma: correlation of MR imaging and histopathologic findings. *Radiology* 1992; 183: 819-825;
71. Rode A, Bancel B, Douek P, et al (2001) Small nodule detection in cirrhotic livers: evaluation with US, spiral CT, and MRI and correlation with pathologic examination of explanted liver. *J Comput Assist Tomogr*; 25: 327-336;
72. Lim JH, Choi D, Cho SK, et al (2001) Conspicuity of hepatocellular nodular lesions in cirrhotic livers at ferumoxides-enhanced MR imaging: importance of Kupffer cell number. *Radiology*; 220: 669-676;
73. Hahn PF, Saini S (1998) Liver-specific MR imaging contrast agents. *Radiol Clin North Am*; 36: 287-297;
74. Reimer P, Schneider G, Schima W, et al (2004) Hepatobiliary contrast agents for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development and applications. *Eur Radiol*; 14(4): 559-78;
75. Schneider G, Maas R, Schultze KL, et al (2003) Low-dose gadobenate dimeglumine versus standard dose gadopentate dimeglumine for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of the liver: an intra-individual crossover comparison. *Invest Radiol*; 38: 85-94;
76. Schumann-Giampieri G, Schmitt-Willich H, Press WR, et al (1992) Preclinical evaluation of Gd-EOB-DTPA as a contrast agent in MR imaging of the hepatobiliary system. *Radiology*; 183: 59-64;

77. Schuhmann-Giampieri G, Mahler M, Roll G, et al (1997) Pharmacokinetics of the liverspecific contrast agent Gd-EOB-DTPA in relation to contrast-enhanced liver imaging in humans. *J Clin Pharmacol*; 37: 587-96;
78. Reimer P, Rummeny EJ, Shamsi K, et al (1996) Phase II Clinical Evaluation of GD-EOBDTPA: Dose, Safety Aspects, and Pulse Sequence; *Radiology*; 199: 177-183;
79. Mori K, Yoshioka H, Takahashi N et al (2005) Triple Arterial Phase Dynamic MRI with Sensitivity Encoding for Hypervascular Hepatocellular Carcinoma: Comparison of the Diagnostic Accuracy Among the Early, Middle, Late, and Whole Triple Arterial Phase Imaging. *AJR*; 184:63-69;
80. Herédia V, Altun E, Ramalho M et al (2007) Magnetic resonance imaging of the liver: a review. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, Vol. 1, No. 2: 213–223;
81. Ramalho et al. 2007;
82. Merkle and Nelson 2006;
83. Lim JH, Cho JM, Kim EY et al (2000) Dysplastic nodules in liver Cirrhosis: Evaluation of Haemodynamics with CT during Arterial Portography and CT Hepatic Arteriography. *Radiology*; 214:869-874;
84. Weg N, Scheer MR, Gabor MP. Liver lesions: improved detection with dual-detector- array CT and routine 2.5-mm thin collimation. *Radiology* 1998; 209: 417-426;
85. Lim JH, Kim CK, Lee WJ, et al. Detection of hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules in cirrhotic livers: accuracy of the helical CT in transplant patients. *Am J Radiol* 2000; 175:693-698;
86. Oliver JH, Baron RL. Helical Biphasic contrast-enhanced CT of the liver: technique, indications, interpretation, and pitfalls. *Radiology* 1996; 201:1-14

87. Iannaccone R, Laghi A, Catalano C, et al. Hepatocellular Carcinoma: Role of Unenhanced and Delayed Phase Multi-Detector Row Helical CT in Patients with Cirrhosis. *Radiology* 2005; 234:460–467;
88. Ronzoni A, Artioli D, Scardina R, et al. Role of MDCT in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Cirrhosis Undergoing Orthotopic Liver Transplantation. *AJR* 2007; 189:792–798;
89. Laghi A, Iannaccone R, Rossi P, et al. Hepatocellular Carcinoma: detection with triple-phase multi-detector row helical CT in patients with chronic hepatitis. *Radiology* 2003;226:543- 549;
90. Hwang GJ, Kim MJ, Yoo HS, et al. Nodular hepatocellular carcinomas: detection with arterial-, portal-, and delayed-phase images at spiral CT. *Radiology* 1997; 202:383-388;
91. Lim JH, Kim MJ, Park CK, et al. Dysplastic nodules in liver cirrhosis: detection with triple phase helical dynamic CT. *The British Journal of Radiology*, 2004; 77: 911–916;
92. Takayasu K, Muramatsu Y, Mizuguchi Y, et al. Imaging of Early Hepatocellular Carcinoma and Adenomatous Hyperplasia (Dysplastic Nodules) with Dynamic CT and a Combination of CT and Angiography: Experience with Resected Liver Specimens. *Intervirolgy* 2004;47:199–208;
93. Taouli B, Krinsky GA. Diagnostic imaging of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis before liver transplantation. *Liver trans* 2006 12:S1-S7;
94. Levy I, Sherman M, Liver Cancer Study Group of the University of Toronto. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda and Child-Pugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. *Gut* 2002;50(6):881-5;
95. Llovet JM, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999;19:329-338;
96. Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:698 –711;

97. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular Carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States From 1975 to 2005. *Journal Clinical Oncology* 2009;27 (9): 1485-91;
98. Livraghi T, Bolondi L, Buscarini L, et al. No treatment, resection and ethanol injection in hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of survival in 391 patients with cirrhosis. Italian Cooperative HCC Study Group. *J Hepatol* 1995;22:522-526;
99. Sakamoto M, Hirohashi S. Natural history and prognosis of adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma: multiinstitutional analysis of 53 nodules followed up for more than 6 months and 141 patients with single early hepatocellular carcinoma treated by surgical resection or percutaneous ethanol injection. *Jpn J Clin Oncol* 1998;28:604-608;
100. Takayama T, Makuuchi S, Hirohashi S, et al. Early hepatocellular carcinoma as an entity with high rate of surgical cure. *Hepatology* 1998;28:1241-46;
101. Aii S, Yamaoka Y, Futagawa S, et al. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinoma: a retrospective and nationwide survey in Japan. *Hepatology* 2000;32:1224-29;
102. Barbara L, Benzi G, Gaiani S, et al. Natural History of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology* 1992;16:132, 37;
103. Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:519-524;
104. Llovet JM, Bustamante J, Castells A, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999;29:62-76;
105. Wayne JD, Lawers GY, Ikai I, et al. Preoperative predictors of survival after resection of small hepatocellular carcinomas. *Ann Surg* 2002;235:722-731;

106. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001;33:1394-403;
107. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334:693-699;
108. Ohwada S, Kawate S, Hamada K, et al. Perioperative real-time monitoring of indocyanine green clearance by pulse spectrophotometry predicts remnant liver functional reserve in resection of hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2006;93:339-346;
109. Bruix J, Castells A, Bossch J, et al. Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure. *Gastroenterology* 1996;11:1018-22;
110. Shwartz JD, Schwartz M, Mandeli J, et al. Neoadjuvant and adjuvant therapy for resectable hepatocellular carcinoma: Review of the randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 2002;3:593-603;
111. Lau WJ, Leung TW, Ho SK, et al. Adjuvant intra-arterial iodine-131- labelled lipiodol for resectable hepatocellular carcinoma: a prospective diagnosis with MR imaging and explantation correlation. *Radiology* 2001;219:445-454;
112. Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, et al. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2000;356(9232):802-7;
113. Kawata A, Une Y, Hosokawa M, et al. Adjuvant chemoimmunotherapy for hepatocellular carcinoma patients. Adriamycin, interleukin-activated killer cells versus adriamycin alone. *Am J Clin Oncol* 1995;18(3):257-62;
114. United Network for Organ Sharing. Annual report 2002. [1http://www.uos.org/data/annualReport.asp](http://www.uos.org/data/annualReport.asp);

115. Freeman R, Wiesner R, Harper A, et al. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl* 2002;8:851-58;
116. Bismuth H, Majno PE, Adam R. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1999;19:311-322;
117. Lesurtel M, Müllhaupt B, Pestalozzi BC, et al. Transarterial Chemoembolization as a Bridge to Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: An Evidence-Based Analysis. *Am J Transplant* 2006;6(11):2644-2650;
118. Trotter J, Washs M, Everson G, et al. Adult-to-adult transplantation of the right hepatic lobe from living donor. *N Engl J Med* 2002;14:1074-82;
119. Bartolozzi C, Lencioni R. Ethanol injection for the treatment of hepatic tumors. *Eur Radiol* 1996;6:682-696;
120. Livraghi T, Giorgio A, Marin G, et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 2005;197:101-108;
121. Pompili M, Rapaccini GL, Covino M, et al. Prognostic factors for survival in patients with compensated cirrhosis and small hepatocellular carcinoma after percutaneous ethanol injection therapy. *Cancer* 2001;92:126-135;
122. Teratani T, Ishikawa T, Shiratori Y, et al. Hepatocellular carcinoma in elderly patients: beneficial therapeutic efficacy using percutaneous ethanol injection therapy. *Cancer* 2002;95:816-823;
123. Kan KN, Yatsunami H, Yamasaki K, et al. Prospective analysis of risk factors for early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma following ethanol injection. *J Hepatol* 2000;32:269-278;
124. Koda M, Murawaki Y, Mitsuda A, et al. Predictive factors for intrahepatic recurrence after percutaneous injection therapy for small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;88:529-537;

125. Lencioni R, Allgaier HP, Cioni D, et al. Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radiofrequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology* 2003;228:235- 240;
126. Goldberg SN, Gazelle GS, Halpern EF, et al. Radiofrequency tissue ablation: importance of local temperature along the electrode tip exposure in determining lesion size and shape. *Acad Radiol* 1996;3:212-218;
127. Goldberg SN, Gazelle GS, Mueller PR. Thermal ablation therapy for focal malignancies: a unified approach to underlying principles, techniques, and diagnostic imaging guidance. *AJR Am J Roentgenol* 2000;174:323-331;
128. Llovet JM, Real MI, Montana X, et al. Arterial embolization or chemoembolization versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;359:1734-39;
129. Lo CM, Ngan H, Tso WK, et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35(5):1164-71;
130. Ernst O, Sergent G, Mitzarahi D, et al. Treatment of HCC by TACE: comparison of planned periodic chemoembolization and chemoembolization planned on tumor response. *AJR Am J Roentgenol* 1999;172:59-64;
131. Poyanli A, Rozanes J, Acunas B, Sencer S. Palliative treatment of hepatocellular carcinoma by Chemoembolization. *Acta Radiol* 2001;42:602-607;
132. Sasaki A, Iwashita Y, Shibata K, et al. Preoperative transcatheter arterial chemoembolization reduces long-term survival rate after hepatic resection for resectable hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:773-779;
133. Vogl TJ, Trapp M, Schroeder H, et al. Transarterial chemoembolization for hepatocarcinoma: volumetric and morphologic CT criteria for assessment of prognosis and therapeutic success - results from a liver transplantation center. *Radiology* 2000;214:349-357;

134. Camma C, Schepis F, Orlando A, et al. Transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: metaanalysis of randomized controlled trial. *Radiology* 2002;224:47-54;
135. Graziadei IW, Sandmueller H, Waldenberger P, et al. Chemoembolization followed by liver transplantation of hepatocellular carcinoma impedes tumor progression while on the waiting list and leads to excellent outcome. *Liver Transpl* 2003;9(6):557-563;
136. Maddala YK, Stadheim L, Andrews JC, et al. Drop-out rates of patients with hepatocellular cancer listed for liver transplantation: outcome with chemoembolization. *Liver Transpl* 2004;10(3):449-455;
137. Cheng YF, Huang TL, Chen TY, et al. Impact of pre-operative transarterial embolization on the treatment of hepatocellular carcinoma with liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2005;11(10):1433-1438;
138. Brown K , Nevins AB, Gtrajdman GI, et al. Particle embolization for hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 1998;9:822-828;
139. Derdeyn CP, Graves VB, Salamat MS, et al. Collagen-coated acrylic microspheres for embolotherapy: in vivo and in vitro characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1997 Apr;18(4):647-53;
140. Brown KT, Nevins AB, Getrajdman GI, et al. Particle embolization for hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol.* 1998 Sep-Oct;9(5):822-8;
141. Brown KT. Fatal pulmonary complications after arterial embolization with 40-120- micro m tris-acryl gelatin microspheres. *J Vasc Interv Radiol.* 2004 Feb;15(2 Pt 1):197-200;
142. Grosso M, Vignali C, Quaretti P, et al. Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma with drug-eluting microspheres: preliminary results from an Italian multicentre study. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2008 Nov-Dec;31(6):1141-9. Epub 2008 Aug 12;



143. Hong K, Khwaja A, Liapi E, et al. New intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: preclinical assessment in a rabbit model of liver cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(8):2563-2567;
144. Varela M, Real MI, Brunet M, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *Journal of Hepatology* 2007;46:407-481;
145. Poon RT, Tso WK, Pang RW et al.: A phase I/II trial of chemoembolization for Hepatocellular Carcinoma Using a Novel Intra- Arterial Drug Eluting Bead. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5(9):1100- 1108;
146. Geschwind JF, Ramsey DE, Cleffken B, et al. Transcatheter arterial chemoembolization of liver tumors: effects of embolization protocol on injectable volume of chemotherapy and subsequent arterial patency. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2003 Mar-Apr;26(2):111-7. Epub 2003 Mar 6;
147. Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, et al. 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11:184–9
148. Woodburn JR. 1999. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 82:241;
149. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. 2004. BAY 43–9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*, 64:7099–109;
150. El-Serag HB, Mason AC. 1999. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, 340:745–50;
151. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359:378–90;

152. Hood JD, Bednarski M, Frausto R, et al. 2002. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science*, 296:2404–7;
153. Liu L, Cao Y, Chen C, et al. 2006. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*, 66:11851–8;
154. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Oct;5(10):835-44;
155. Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, et al. 2006. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin Oncol*, 33:392–406;
156. Chang YS, Adnane J, Trail PA, et al. 2007. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol*, 59:561–74;
157. Avila MA, Berasain C, Sangro B, et al. 2006. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 25:3866–84;
158. Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, et al. 1997. Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 236:54–8;
159. Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, et al. 1998. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 27:951–8;
160. Huynh H, Nguyen TT, Chow KH, et al. 2003. Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol*, 3:19–39;

161. Giambartolomei S, Covone F, Levrero M, et al. 2001. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene*,20:2606–10;
162. Chen J, Siddiqui A. 2007. Hepatitis B virus X protein stimulates the mitochondrial translocation of Raf-1 via oxidative stress. *J Virol*, 81:6757–60;
163. Miura H, Miyazaki T, Kuroda M, et al. 1997. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 27:854–61;
164. Yamaguchi R, Yano H, Iemura A, et al. 1998. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 28:68–77;
165. Chao Y, Li CP, Chau GY, et al. 2003. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin in patients with resectable hepatocellular carcinoma after surgery. *Ann Surg Oncol*, 10:355–62;
166. Poon RT, Ho JW, Tong CS, et al. 2004. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg*, 91:1354–60;
167. Strumberg D, Richly H, Hilger RA, et al. 2005. Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43–9006 in patients with advanced refractory solid tumors. *J Clin Oncol*, 23:965–72;
168. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al. 2006. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, 24:4293–300;
169. Cheng AL, Kang Y, Chen Z, et al. 2008. Randomized phase III trial of sorafenib versus placebo in Asian patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 26:215s, #4509;
170. Ikai I, Arai S, Ichida T, et al. 2005. Report of the 16th follow-up survey of primary liver cancer. *Hepatol Res*, 32:163–72;

171. Kudo M, Okanoue T; Japan Society of Hepatology. 2007. Management of hepatocellular carcinoma in Japan: consensus-based clinical practice manual proposed by the Japan Society of Hepatology. *Oncology*, 72(Suppl 1):2–15;
172. Furuse J, Ishii H, Nakachi K, et al. 2008. Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 99:159–65;
173. Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, et al. 1973. Transection of the esophagus for bleeding esophageal varices. *Br J Surg*, 60:646–54;
174. Gish RG, Marrero JA, Benson AB. A multidisciplinary approach to the management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2010 Mar;6(3 Suppl 6):1-16;
175. Abou-Alfa GK, Johnson P, Knox J, et al. Final results from a phase II (PhII), randomized, double-blind study of sorafenib plus doxorubicin (S+D) versus placebo plus doxorubicin (P+D) in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma. Abstract presented at: American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium; January 25-27, 2008; Orlando, FL;
176. Lai CL, Wu PC, Chan GC, et al. 1988. Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial. *Cancer*, 62:479–83;
177. Colleoni M, Nole F, Di Bartolomeo M, et al. 1992. Mitoxantrone in patients affected by hepatocellular carcinoma with unfavorable prognostic factors. *Oncology*, 49:139–42;
178. Leung TW, Patt YZ, Lau WY, et al. 1999. Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 5:1676–81;
179. Boucher E, Corbinais S, Brissot P, et al. 2002. Treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) with systemic chemotherapy combining epirubicin, cisplatin and infusional 5-fluorouracil (ECF regimen). *Cancer Chemother Pharmacol*, 50:305–8;

180. Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, et al. 2003. Phase II trial of systemic continuous fluorouracil and subcutaneous recombinant interferon Alfa-2b for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, 21:421–7;
181. Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, et al. 2005. A phase II trial of continuous infusion of 5-fluorouracil, mitoxantrone, and cisplatin for metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 103:756–62;
182. Yeo W, Mok TS, Zee B, et al. 2005. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/ fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 97:1532–8;
183. Cittadini G. La Tomografia Computerizzata in “Diagnostica per Immagini e Radioterapia”, ECIG, VI Edizione, 2008, pp 55-63;
184. Sahani DV, Holalkere NS, Mueller PR, et al. Advanced hepatocellular carcinoma: CT perfusion of liver and tumor tissue. Initial experience. *Radiology* 2007;243:736-743;
185. Park MS, Klotz E, Kim MJ et al. Perfusion CT: noninvasive surrogate marker for stratification of pancreatic cancer response to concurrent chemo- and radiation therapy. *Radiology* 2009;250:110-117;
186. Kandel S, Kloeters C, Meyer H, et al. Whole-organ perfusion of the pancreas using dynamic volume CT in patients with primary pancreas carcinoma: acquisition technique, post-processing and initial results. *Eur Radiol* 2009 May 27;
187. Li Y, Yang ZG, Chen TW, et al. Peripheral lung carcinoma: correlation of angiogenesis and first-pass perfusion parameters of 64-detector row CT. *Lung Cancer* 2008;61:44-53;
188. Bellomi M, Petralia G, Sonzogni A, et al. CT perfusion for the monitoring of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in rectal carcinoma: initial experience. *Radiology* 2007;244:486-493;

189. Bisdas S, Baghi M, Wagenblast J et al. Differentiation of benign and malignant parotid tumors using deconvolution-based perfusion CT imaging: feasibility of the method and initial results. *Eur J Radiol* 2007;64:258-265;
190. Bisdas S, Medov L, Baghi M et al. A comparison of tumour perfusion assessed by deconvolution-based analysis of dynamic contrast-enhanced CT and MR imaging in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Eur Radiol* 2008;18:843-850;
191. Bisdas S, Spicer K, Rumboldt Z. Whole-tumor perfusion CT parameters and glucose metabolism measurements in head and neck squamous cell carcinomas: a pilot study using combined positron-emission tomography/CT imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008;29:1376-1381;
192. Gandhi D, Chepeha DB, Miller T et al. Correlation between initial and early follow-up CT perfusion parameters with endoscopic tumor response in patients with advanced squamous cell carcinomas of the oropharynx treated with organpreservation therapy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27:101-106;
193. Hermans R, Meijerink M, Van den Bogaert W, et al. Tumor perfusion rate determined noninvasively by dynamic computed tomography predicts outcome in head-and-neck cancer after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:1351-1356;
194. Rumboldt Z, Al-Okaili R, Deveikis JP. Perfusion CT for head and neck tumors: pilot study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005;26:1178-1185;
195. Zima A, Carlos R, Gandhi D, et al. Can pretreatment CT perfusion predict response of advanced squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract treated with induction chemotherapy? *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28(2):328-334;
196. Gandhi D, Hoeffner EG, Carlos RC, et al. Computed tomography perfusion of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. Initial results. *J Comput Assist Tomogr* 2003;27:687-693;

197. Miles KA, Griffiths MR. Perfusion CT: a worthwhile enhancement? *Br J Radiol* 2003;76:220-231;
198. Kambadakone AR, Sahani DV. Body perfusion CT: technique, clinical applications, and advances. *Radiol Clin North Am* 2009;47:161-178;
199. Miles KA. Tumour angiogenesis and its relation to contrast enhancement on computed tomography: a review. *Eur J Radiol* 1999;30:198-205; 35;
200. Lee TY. Functional CT: physiological models. *Trends Biotechnol* 2002;20:S3-S10;
201. Axel L. Cerebral blood flow determination by rapid-sequence computed tomography: theoretical analysis. *Radiology* 1980;137:679-686;
202. Oto A, Tamm EP, Szklaruk J. Multidetector row CT of the liver. *Radiol. Clin. North.Am.*2005; 43: 827–48;
203. Pandharipande PV, Krinsky GA, Rusinek H, et al. Perfusion imaging of the liver:current challenges and future goals. *Radiology* 2005; 234 (3): 661-73;
204. Ippolito D, Sironi S, Pozzi M, Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Liver Disease: Functional Computed Tomography With Perfusion Imaging in the Assessment of Tumor Vascularization *Acad Radiol* 2008; 15:919–927;
205. Koop AF, Heuschmid M, Claussen CD et al. Multidetector helical CT of the liver for tumor detection and characterization, *Eur Radiol* (2002) 12:745–752;
206. Materne R, Van Beers BE, Smith AM et al. Non-invasive quantification of liver perfusion with dynamic computed tomography and a dual-input one-compartmental model. *Clin Sci (Lond)*. 2000 Dec;99(6):517-25;
207. Nakayama Y, Awai K, Funama Y, et al. Abdominal CT with Low Tube Voltage: Preliminary Observations about Radiation Dose, Contrast Enhancement, Image Quality, and Noise. *Radiology* 2005; 237:945–951;

208. Dalrymple NC, Prasad SR, El-Merhi FM, et al. Price of isotropy in multidetector CT. *Radiographics*. 2007 Jan-Feb;27(1):49-62;
209. Laghi A. Multidetector CT (64 Slices) of the liver: examination techniques. *Eur Radiol*. 2007 Mar;17(3):675-83;
210. Faggioni L, Neri E, Cerri F, et al. 64-row MDCT perfusion of head and neck squamous cell carcinoma: technical feasibility and quantitative analysis of perfusion parameters. *Eur Radiol*. 2011 Jan;21(1):113-21.;
211. Faggioni L, Neri E, Bartolozzi C. CT perfusion of head and neck tumors: how we do it. *AJR Am J Roentgenol*. 2010 Jan;194(1):62-9;
212. Goh V, Halligan S, Daley F, Colorectal Tumor Vascularity: Quantitative Assessment with Multidetector CT—Do Tumor Perfusion Measurements Reflect Angiogenesis? *Radiology*: Volume 249: Number 2—November 2008;
213. Sahani DV, Kalva SP, Hamberg LM et al (2005) Assessing tumor perfusion and treatment response in rectal cancer with multisection CT: initial observations. *Radiology* 234:785–792
214. Sitarchouk I, Roberts HC, Pereira AM et al (2008) Computed tomography perfusion using first pass methods for lung nodule characterization. *Invest Radiol* 43:349–358;
215. Petralia G, Preda L, Giugliano G et al (2009) Perfusion computed tomography for monitoring induction chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: correlation between changes in tumor perfusion and tumor volume. *J Comput Assist Tomogr* 33:552–559;
216. Xiong HQ, Herbst R, Faria SC et al. (2004) A phase I surrogate endpoint study of SU6668 in patients with solid tumors. *Invest New Drugs* 22:459–466 33;
217. Meijerink MR, van Crujisen H, Hoekman K et al. (2007) The use of perfusion CT for the evaluation of therapy combining AZD2171 with gefitinib in cancer patients. *Eur Radiol* 17: 1700–1713 34;



218. McNeel DG, Eickhoff J, Lee FT et al. (2005) Phase I trial of a monoclonal antibody specific for integrin (MEDI-522);
219. Wintermark M, Maeder P, Verdun FR et al. Using 80 kVp versus 120 kVp in perfusion CT measurement of regional cerebral blood flow. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000;21:1881-1884;
220. Kalender WA, Buchenau S, Deak P et al. Technical approaches to the optimisation of CT. *Phys Med* 2008;24:71-79;
221. Kalva SP, Sahani DV, Hahn PF, Saini S. Using the K-edge to improve contrast conspicuity and to lower radiation dose with a 16-MDCT: a phantom and human study. *J Comput Assist Tomogr* 2006;30:391-397;
222. Sagara Y, Hara AK, Pavlicek W et al. Abdominal CT: comparison of low-dose CT with adaptive statistical iterative reconstruction and routine-dose CT with filtered back projection in 53 patients. *AJR Am J Roentgenol*. 2010 Sep;195(3):713-9.