



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

**DOTTORATO di RICERCA in
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE
XXXII CICLO**

**DIPARTIMENTO DI FISIOPATOLOGIA MEDICO-CHIRURGICA
e DEI TRAPIANTI**

**ASSOCIAZIONE TRA SCORE GENETICO GRS
E RISCHIO DI EPATOCARCINOMA IN
PAZIENTI CON CIRROSI HCV TRATTATI
CON FARMACI ANTIVIRALI DIRETTI**

SETTORE SCIENTIFICO E DISCIPLINARE: MED/12

Tesi di

Elisabetta DEGASPERI

Matricola R11587

Tutor: Prof. Flavio CAPRIOLI

Coordinatore del Corso: Prof. Emilio BERTI

Anno Accademico 2018-2019

INDICE

Il virus dell'epatite C	4
Caratteristiche del virione ed organizzazione genomica.....	4
Ciclo replicativo di HCV.....	6
Eterogeneità genetica: genotipi, sottotipi e quasi specie.....	7
Epidemiologia dell'infezione da HCV	9
Storia naturale dell'infezione da HCV	12
Infezione acuta.....	13
Infezione cronica.....	15
Cofattori di progressione del danno epatico HCV-correlato.....	20
Complicanze della cirrosi HCV.....	28
Manifestazioni extraepatiche dell'infezione HCV	34
Terapia dell'infezione HCV	35
Storia naturale dell'infezione HCV dopo l'eradicazione virale	39
Genetica dell'HCC: stratificazione del rischio per una medicina personalizzata	54
Razionale dello studio	60
Materiali e Metodi	62
Risultati	65
Discussione	70
Tabelle	75
Figure	81
Tabelle Supplementari	86

Figure Supplementari.....	88
Bibliografia.....	90

IL VIRUS DELL'EPATITE C

Caratteristiche del virione ed organizzazione genomica

Il virus dell'epatite C (HCV), in passato definita epatite non-A, non-B, è stato identificato da Choo e collaboratori nel 1989 [1-3]. L'esistenza di un nuovo agente eziologico di epatite virale era già stata sospettata negli anni '70, a seguito a osservazioni epidemiologiche e cliniche. L'introduzione di test sensibili per la ricerca dei virus dell'epatite A (HAV) e dell'epatite B (HBV) ha poi confermato l'esistenza di una malattia infettiva epatica non nota, responsabile di più del 95% delle epatiti post-trasfusionali, alla quale venne quindi dato il nome di epatite virale non-A, non-B, in seguito ribattezzata epatite C.

HCV è un virus a RNA a singola elica appartenente alla famiglia Flaviviridae, genere Hepacivirus. L'infezione HCV è acquisita mediante trasmissione parenterale: i fattori di rischio includono la trasfusione di emoderivati, procedure medico-chirurgiche prima del 1990-1992 (data in cui è stato introdotto il test anticorpale anti-HCV), l'abuso di droghe per via endovenosa, l'esecuzione di piercing e tatuaggi, e i rapporti sessuali a rischio (specialmente omosessuali), mentre la trasmissione verticale (materno-fetale) è di più rara occorrenza [4,5].

Il virus HCV ha forma sferica di circa 50 nm di diametro, dotato di un involucro lipoproteico [6]. Esso è in grado di legarsi sia a lipoproteine sieriche a bassa densità (LDL), sia ad anticorpi in complessi a più elevata densità. Durante la fase acuta di infezione, le LDL facilitano l'ingresso del virus negli epatociti [7]. Durante l'infezione cronica, invece, il virus circola legato ad anticorpi a formare

complessi antigene-anticorpo [8]. HCV è inattivato da formalina, cloroformio e calore secco a 60°, e sembra essere molto resistente nell'ambiente [9].

Il genoma di HCV è costituito da un singolo filamento lineare di RNA a polarità positiva di circa 9,5 kb, contenente un unico *open reading frame* (frammento di lettura ORF), che codifica per una poliproteina di circa 3000 aminoacidi da cui vengono scisse le singole componenti virali [10]. Una porzione del genoma (regione C e regioni E1 ed E2/NS1) codifica per le proteine strutturali, un'altra parte di esso (regioni NS2, NS3, NS4, NS5) è preposta alla produzione di proteine funzionali non strutturali (proteasi, RNA polimerasi e proteine regolatrici) [11]. La regione 5' non codificante (NC) è costituita da 340 nucleotidi; l'elevato grado di conservazione di questa regione ha fatto sì che potesse venire utilizzata in test per la ricerca del genoma virale (HCV-RNA) e per la tipizzazione del genotipo virale [12].

Ciclo replicativo di HCV

La realizzazione di nuovi sistemi di coltura del virus HCV in linee cellulari in vitro (anziché nel modello animale in vivo) ha permesso nell'ultimo decennio di studiare e comprendere le diverse fasi del ciclo replicativo di HCV, fattore chiave per il successivo sviluppo di molecole farmacologiche aventi come target le principali fasi della replicazione virale [13].

Dopo l'ingresso nelle cellule mediante il recettore delle LDL, il genoma di HCV viene rilasciato (*uncoating*) dall'involucro lipoproteico nel citoplasma della cellula, e l'RNA di HCV viene tradotto in una lunga poliproteina, che contiene in sequenza tutte le proteine strutturali e non strutturali [14,15]. Alcune proteasi dell'ospite e la proteasi virale (proteina non strutturale NS3) hanno quindi il compito di scindere la poliproteina nei diversi componenti. La successiva replicazione dell'RNA virale è mediata dal cosiddetto "complesso replicativo", costituito dall'RNA polimerasi (proteina non strutturale NS5B), dalla proteina NS5A e da altre proteine che facilitano l'adesione del complesso replicativo all'RNA virale. L'RNA polimerasi non è dotata di un meccanismo di "correzione di bozze"; pertanto, la replicazione virale genera continuamente errori e sostituzioni nucleotidiche che sono alla base dell'elevatissima variabilità genetica di HCV (vedi paragrafo successivo).

Dopo la replicazione dell'RNA virale, il nuovo virione viene quindi assemblato e rilasciato dalla cellula, processo in cui sembra coinvolta la proteina non strutturale NS5A [16].

Eterogeneità genetica: genotipi, sottotipi e quasispecie

L'eterogeneità genetica è una caratteristica fondamentale del genoma di HCV: il tasso di sostituzioni nucleotidiche è molto alto, pari a circa 10^2 - 10^3 sostituzioni per sito nucleotidico/anno [17], ed è dovuto all'assenza di sistema di "correzione di bozze" dell'RNA polimerasi.

La storia dell'evoluzione del virus HCV è caratterizzata dall'insorgenza di variabili filogenetiche maggiori del virus chiamate genotipi. Sono stati ad oggi identificati 9 diversi genotipi, numerati nella classificazione originaria di Peter Simmonds da 1 a 6, e ulteriori tre di più recente isolamento. I diversi genotipi presentano un'omologia di sequenza compresa tra il 55% e il 72% [18].

Sono stati inoltre individuati più di 50 sottotipi diversi, 11 dei quali classificati con le lettere a, b, c a seconda dell'ordine di scoperta, e tutti caratterizzati da un'omologia di sequenza compresa tra il 75% e l'86% [19]. Sempre in relazione all'elevata variabilità propria del genoma di HCV, nello stesso soggetto è presente una popolazione virale eterogenea costituita da elementi tra loro geneticamente correlati, ma non identici, che assumono la prerogativa di "quasispecie" virale [20]. Il modello della quasispecie prevede la presenza nello stesso individuo di una popolazione virale costituita in parte da elementi con sequenze genomiche in comune, e in parte da un numero elevatissimo di varianti che vengono continuamente generate. La presenza nello stesso soggetto di molteplici popolazioni virali ha come conseguenza la selezione e l'emergenza di quelle varianti che, meglio adattandosi alle condizioni ambientali, riescono a evadere la sorveglianza immunitaria oppure la pressione farmacologica. La resistenza cosiddetta "naturale", cioè la presenza di varianti resistenti ad un determinato

farmaco, pre-esiste l'esposizione al farmaco stesso, ed è il risultato della casuale generazione di varianti resistenti durante la replicazione virale. A seguito della pressione farmacologica, le varianti naturalmente resistenti al farmaco vengono progressivamente selezionate a scapito della popolazione virale *wild-type* e diventano prevalenti all'interno della quasispecie virale.

EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA HCV

I dati sulla prevalenza dell'infezione HCV a livello mondiale sono influenzati da molteplici fattori, che rendono difficile una corretta stima della reale epidemiologia. In primo luogo, in molti casi gli studi sono stati condotti in soggetti esposti a fattori di rischio o donatori di sangue, di fatto non rappresentativi della popolazione reale. Inoltre, esistono notevoli differenze in termini di sensibilità e la specificità dei test sierologici utilizzati, come anche nella distinzione dei pazienti positivi per anticorpi anti-HCV rispetto all'identificazione dei pazienti viremici. Infine, l'epidemiologia dell'infezione HCV a livello mondiale è influenzata da numerosi variabili dinamiche, come la mortalità legata all'invecchiamento della popolazione infetta e allo sviluppo di complicanze fegato-correlate, le nuove infezioni, il contributo apportato dai flussi migratori e, soprattutto, la capacità dei singoli Paesi di diagnosticare i pazienti infetti e di garantire la diffusione e l'accessibilità ai regimi terapeutici ad oggi disponibili. Infatti, in molti Paesi non esistono registri nazionali dell'infezione, pertanto, una variabile quota di pazienti a livello mondiale risulta ad oggi non diagnosticata, soprattutto nei Paesi emergenti. Si stima, infatti, che in alcuni Paesi come Egitto e Turchia solo il 15% dei pazienti infetti siano stati diagnosticati, rispetto all'80% di Paesi come Svezia e Australia [21].

I dati disponibili circa l'attuale epidemiologia dell'infezione HCV stimano una prevalenza della positività per anticorpi anti-HCV a livello mondiale di circa il 2%, corrispondente a 120-150 milioni di persone. Di questi, si stima che 70-100 milioni di persone rappresentino pazienti effettivamente viremici, con una prevalenza globale dell'1-1.4% [22].

Esiste una notevole variabilità geografica nella distribuzione a livello mondiale dell'infezione: si distinguono infatti Paesi a bassa prevalenza (<1.5%), come il Nord America, l'America Latina, e regioni Pacifiche dell'Asia; Paesi a prevalenza intermedia (1.5-3.5%), che includono il Sud-Est Asiatico, l'Africa Sub-Sahariana, l'Oceania, l'Australia, l'Europa occidentale; Paesi ad alta prevalenza (>3.5%), che comprendono invece l'Asia e l'Europa orientale, l'Africa Centrale, e il Nord Africa, con punte di prevalenza fino al 15% in Egitto [23]. In Europa, la prevalenza dell'infezione presenta un gradiente nord-sud variabile dallo 0,1% dei Paesi nordici al 3,2% dei Paesi mediterranei, con un'incidenza annuale di 6,2/100.000 abitanti [24,25]. L'Italia rappresenta un Paese a media prevalenza, stimata da alcuni studi di popolazione intorno al 2,6% [26,27].

Il genotipo 1 è a livello mondiale il genotipo HCV maggiormente diffuso, circa il 46% dei pazienti infetti (22% di sottotipo 1b), seguito dal genotipo 3 (22%) e dai genotipi 2 e 4 (13%) [22,28]. Il sottotipo 1a è più frequentemente riscontrato in Nord Europa e Nord America, mentre il sottotipo 1b è quello più diffuso in Giappone e Sud-Est Europa. Globalmente, genotipo 1 rappresenta il 53-71% delle infezioni in Australia, Europa e Nord America.

L'infezione da genotipo 3 è endemica nel Sud-Est asiatico, dove in Asia rappresenta il 40% delle infezioni, mentre in molte regioni europee è riscontrata in pazienti giovani che hanno fatto uso di sostanze stupefacenti per via endovenosa. Il genotipo 4 è diffuso in Medio Oriente, Egitto e Africa Centrale; il tipo 5 viene rilevato soltanto in Sud Africa, e il genotipo 6 quasi esclusivamente ad Hong Kong, Vietnam e Macao [22].

Se le proiezioni circa l'andamento dell'epidemiologia dell'infezione HCV fino al 2030 stimano che il numero totale di infezioni sia destinato a declinare, la prevalenza dei pazienti con epatopatia avanzata e la mortalità legata allo sviluppo di complicanze fegato-correlate sono destinate ancora ad aumentare. Le complicanze dell'infezione cronica da HCV rappresentano ad oggi l'indicazione principale al trapianto di fegato sia in Europa sia negli Stati Uniti [29,30].

Le caratteristiche con cui la mortalità per complicanze HCV-correlate è destinata ad evolvere nei diversi Paesi dipendono da alcune differenze legate all'epidemiologia locale e all'epoca in cui si è osservata la maggiore diffusione del contagio. Ad esempio, nei Paesi con pattern di prevalenza intermedia quali il Giappone e l'Europa, la popolazione anziana rappresenta la fascia di età maggiormente colpita, indicando che il rischio di infezione è stato più elevato in un passato più remoto, approssimativamente fra il primo e il secondo dopoguerra, quando si ritiene che l'utilizzo di materiale sanitario infetto abbia avuto un ruolo predominante nella trasmissione del virus. In questi Paesi, il picco legato allo sviluppo di epatopatia avanzata e delle sue complicanze si è già verificato e si stima che la mortalità fegato-correlata sia destinata a diminuire lentamente nei prossimi anni. In Paesi con pattern di prevalenza bassa, quali gli Stati Uniti e l'Australia, il maggior numero di persone infette ha contratto l'infezione negli anni '60, con l'abuso di sostanze stupefacenti endovena quale fattore di rischio predominante. In questi Paesi, lo sviluppo di complicanze fegato-correlate e la conseguente mortalità devono ancora raggiungere il massimo picco [21, 31].

STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE DA HCV

La storia naturale dell'infezione HCV è stata estesamente studiata in passato, in quanto, a seguito dell'assenza di un trattamento antivirale efficace, molti pazienti erano sottoposti unicamente a follow-up clinico-strumentale, permettendo la conduzione di numerosi studi osservazionali.

Tuttavia, la conoscenza della storia naturale di HCV è stata ostacolata dal decorso asintomatico dell'infezione, sia in fase acuta che cronica. Pertanto, molti studi condotti nel campo della storia naturale hanno arruolato selettivamente coorti di pazienti caratterizzati da fattori di rischio per infezione HCV (donatori di sangue, infezioni HCV post-trasfusionali), criterio che da un lato facilitava la possibilità di diagnosticare l'infezione in fase precoce, ma che potenzialmente poteva condurre ad un *bias* di selezione, studiando la storia naturale solo in alcune categorie di pazienti. Ulteriori studi meno selezionati hanno generato dati in casistiche retrospettive o longitudinali, dove la stima della data di infezione HCV era eseguita a partire dall'anamnesi del paziente. Tuttavia, queste casistiche derivavano soprattutto da centri secondari o terziari, introducendo il cosiddetto *referral bias*, in quanto i pazienti riferiti a centri specialistici rappresentavano di solito il gruppo di pazienti con malattia maggiormente progressiva. Nonostante queste limitazioni, la storia naturale dell'infezione HCV è stata estesamente studiata sia nella fase acuta che cronica, sia per quanto concerne le complicanze dell'epatopatia [4].

Infezione acuta

L'HCV-RNA è rilevabile 7-21 giorni dopo l'infezione, mentre i valori di transaminasi (ALT) aumentano dopo 4-12 settimane. L'infezione acuta è asintomatica nel 70-80% dei pazienti, mentre solo il 20-30% sviluppa sintomi aspecifici (come sindrome simil-influenzale) o un quadro clinico di epatite acuta itterica. L'anticorpo anti-HCV è rilevabile 1-3 mesi dopo l'esposizione, tuttavia, la finestra di sieroconversione può variare da 20 a 250 giorni e gli anticorpi anti-HCV risultano negativi nei pazienti immunocompromessi, pertanto la diagnosi di infezione acuta HCV si basa comunque sulla determinazione sierica dell'HCV-RNA. Anche in caso di epatite acuta sintomatica, di solito il quadro è autolimitante e decorre con buona prognosi, mentre il quadro di epatite fulminante è raro. La guarigione spontanea di HCV si manifesta solo nel 20-30% dei pazienti, ed è caratterizzata da una progressiva riduzione dei livelli di ALT e HCV-RNA fino alla negativizzazione della viremia circa 3-4 mesi dopo l'infezione acuta; nel 15% dei pazienti si può invece osservare un andamento fluttuante dei valori di ALT e HCV-RNA prima della clearance spontanea. Nel 70-80% dei casi, tuttavia, l'infezione acuta cronicizza; si definisce infezione cronicizzata la persistenza di HCV-RNA positivo 6 mesi dopo l'esordio clinico/infezione acuta [32-36].

Numerosi fattori sono stati associati alla clearance spontanea di HCV: la più giovane età all'infezione, il sesso femminile, il decorso sintomatico dell'infezione acuta, la risposta immunitaria e, più recentemente, fattori genetici [37-42]. È stato dimostrato che il virus HCV è capace di interferire con la risposta immunitaria innata, tramite le proteine strutturali (E2, core) e non strutturali (NS3-4A, NS5A) e interferendo con la trasduzione del segnale da parte dei recettori Toll-like [43-

46]. Inoltre, l'infezione HCV è stata anche associata con la disregolazione dell'immunità specifica mediante l'attivazione delle cellule T reg e lo shift della risposta da Th1 a Th2-mediata [47,48]. Alcuni studi si sono anche concentrati sul ruolo delle cellule NK nella clearance virale, sebbene altri studi abbiano dimostrato la capacità del virus HCV di interferire anche con l'attività citotossica delle cellule NK [49,50].

Più recentemente, il polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) *rs12979860* vicino al gene dell'Interleuchina 28B (IL28B), inizialmente identificato come il più forte predittore genetico di risposta alla terapia antivirale basata su Interferone (IFN), è stato associato anche con la probabilità di guarigione spontanea: la condizione di omozigosi per l'allele C, infatti, conferisce oltre il 70% di probabilità di clearance spontanea di HCV, e l'alta prevalenza del genotipo CC nei Paesi dell'Asia Orientale giustifica probabilmente gli eccellenti risultati della terapia antivirale con IFN e la buona prognosi dell'infezione HCV in queste aree geografiche [51-54].

Infezione cronica

L'infezione cronica da HCV è caratterizzata dalla persistente infiammazione a livello epatico, che conduce alla progressiva deposizione di tessuto fibrotico nel fegato, determinando infine lo sviluppo della cirrosi e delle sue complicanze. Molti studi hanno tentato di stimare la velocità di progressione della fibrosi e di descrivere questo complesso processo, che è influenzato da molti fattori propri dell'ospite, del virus e dell'ambiente, che rendono la progressione della fibrosi un processo con un'elevata variabilità individuale. Sebbene la biopsia epatica rappresenti ancora il *gold-standard* riconosciuto per valutare la quantità di fibrosi nel fegato e stadare la severità dell'epatopatia, essa può essere influenzata dall'errore di campionamento e potenzialmente può misclassificare il corretto stadio di fibrosi a causa dell'inadeguatezza del campione (scarsa rappresentatività), irregolare distribuzione della fibrosi nel fegato e variabilità inter/intraindividuale fra anatomo-patologi [55]. Infine, trattandosi di una metodica invasiva, non è scevra da complicanze (emorragia, pneumotorace), sebbene fortunatamente in mani esperte l'incidenza sia inferiore all'1%. L'entità dell'attività infiammatoria e della fibrosi nel tessuto epatico possono essere quantificate mediante *score* numerici: tra questi, lo *score* di Knodell, che gradua l'infiammazione da 0 a 18 e la fibrosi da 0 a 4, lo *score* di Ishak, che si differenzia dal precedente per la valutazione dello *staging* secondo una scala che va da 0 a 6, e il Metavir, che assegna al *grading* un punteggio che va da 0 a 3 e allo *staging* uno che va da 0 a 4 [56-58]. Gli stadi Knodell e Metavir 4 e Ishak 6 definiscono la cirrosi istologica, dove il sovvertimento strutturale del parenchima epatico è caratterizzato dall'estesa presenza di setti fibrotici che delimitano noduli

contenenti epatociti. Negli ultimi anni, sono state sviluppate numerose metodiche non invasive per la stadiazione della fibrosi nei pazienti con infezione cronica HCV, dotate di buona accuratezza diagnostica (es. test sierologici basati sulla combinazione di parametri biochimici, metodiche elastografiche basate sulla misurazione della *stiffness* epatica come il Fibroscan®). Attualmente, pertanto, l'esecuzione della biopsia epatica è riservata in casi selezionati: per escludere la presenza di comorbidità significative, nei casi in cui le metodiche non-invasive risultino fra loro discrepanti, o per motivi di ricerca.

Gli studi clinici condotti nell'ambito della storia naturale dell'infezione HCV hanno utilizzato principalmente due diversi approcci per descrivere la progressione della fibrosi: il primo è basato sull'esecuzione di biopsie epatiche seriate e calcola la velocità di progressione della fibrosi considerando l'intervallo di tempo fra ogni valutazione (approccio diretto), il secondo deriva la velocità di progressione della fibrosi da una singola biopsia epatica, prendendo come punto di partenza la data stimata di infezione HCV nella storia clinica del paziente (approccio indiretto). L'approccio diretto con biopsie epatiche seriate ha il vantaggio di calcolare la velocità di transizione per ogni stadio di fibrosi, tuttavia, pochi studi hanno utilizzato questa metodica: nel 2003, Ghany e coautori hanno valutato la velocità di progressione della fibrosi in una coorte di 123 pazienti HCV non trattati, sottoposti a due biopsie epatiche ad un intervallo medio di 44 (range 4-212) mesi. Il 39% dei pazienti dimostrava una progressione della fibrosi: il 75% di questi presentava un incremento di 1 punto nello score di Ishak, 25% un incremento ≥ 2 punti e il 9% dimostrava una progressione a cirrosi. La velocità di progressione globale risultava di 0.12 punti di fibrosi per anno, compatibile con lo

sviluppo di cirrosi in 50 anni, assumendo una progressione lineare della fibrosi [59]. Questi risultati sono stati parzialmente replicati da Ryder e colleghi in 214 pazienti HCV non trattati con fibrosi lieve (188/214 pazienti con fibrosi 0-1 secondo lo score di Ishak), seguiti prospetticamente e sottoposti a biopsie seriate a intervallo mediano di 2.5 anni: 70/219 (33%) pazienti dimostravano una progressione della fibrosi di almeno 1 punto, mentre 23 pazienti (11%) progredivano almeno di 2 punti in un follow-up mediano di 30 mesi. I predittori indipendenti di progressione della fibrosi erano l'età e lo stadio di fibrosi alla prima biopsia [60].

La maggior parte degli studi di letteratura sulla progressione della fibrosi sono invece stati condotti con l'approccio indiretto, derivando cioè la velocità di progressione della fibrosi da una singola biopsia epatica e dalla durata di malattia calcolata in base alla data stimata di infezione HCV. Lo studio paradigmatico in questo campo è stato condotto nel 1997 da Poynard e colleghi su 2.235 pazienti HCV non trattati di tre differenti coorti Francesi con una biopsia epatica disponibile, stadiata secondo lo score di Metavir. La velocità di progressione della fibrosi era calcolata come rapporto fra lo stadio di fibrosi al momento della biopsia e la durata di malattia desunta dalla storia clinica del paziente: la velocità di progressione media risultava 0.133 punti di fibrosi per anno (95% CI 0.125-0.143); l'intervallo medio dall'infezione acuta alla cirrosi era di 30 anni (range 28-32). Tuttavia, l'analisi condotta permetteva di identificare tre diversi gruppi di pazienti che differivano per velocità di progressione dell'epatopatia: infatti 377 (33%) pazienti progredivano a cirrosi in meno di 20 anni (*rapid progressors*), 356 (31%) non dimostravano alcuna progressione a cirrosi in più di 50 anni (*slow*

progressors) e i rimanenti erano in una condizione intermedia (*intermediate progressors*). I predittori indipendenti di rapida progressione di fibrosi erano l'età all'infezione, l'introito alcolico >50 g/die e il sesso maschile, dove il tempo di sviluppo di cirrosi oscillava da 13 anni nei pazienti di sesso maschile con età all'infezione >40 anni fino a 42 anni in pazienti di sesso femminile astemie con età all'infezione <40 anni [61]. Molti altri studi pubblicati successivamente al lavoro di Poynard hanno dimostrato risultati eterogenei, principalmente legati a notevoli variabilità in termini di disegno dello studio, popolazione di pazienti studiati e metodi per stimare la velocità di progressione della fibrosi. Riassumendo, circa il 10-20% dei pazienti va incontro allo sviluppo di cirrosi dopo 20-30 anni di infezione cronica; studi retrospettivi condotti in centri terziari hanno spesso riportato prevalenze di cirrosi maggiori, fino al 51%, rispetto a dati prospettici derivanti da casistiche di donatori di sangue, dove veniva riportato lo sviluppo di cirrosi nell'1-2% dei pazienti dopo 20 anni [4;62-68]. Queste discrepanze possono essere facilmente spiegate dal *bias* di osservazione (*ascertainment bias*), in quanto i pazienti seguiti presso centri terziari sono più probabilmente affetti da malattia maggiormente avanzata, che costituiva l'indicazione a considerare il trattamento antivirale e ad inviare il paziente ad un centro specialistico. Una recente metanalisi di 111 studi su 33.121 pazienti HCV ha riportato una prevalenza di cirrosi stimata del 16% a 20 anni e 41% a 30 anni, confermando tassi inferiori negli studi retrospettivi-prospettivi rispetto a studi trasversali condotti in centri di riferimento. Secondo un modello Markoviano, il tasso medio annuale di migrazione di stadio era 0.117 (da stadio F0 a F1 secondo Metavir), 0.085 (da F1 a F2), 0.120 (da F2 a F3) and 0.116 (da F3 a F4). Secondo

questo modello, come precedentemente riportato in altri studi, la fibrosi non segue una progressione lineare, ma una curva con progressione accelerata all'aumentare dell'età e della durata di infezione [69].

Cofattori di progressione del danno epatico

HCV- correlato

Numerosi fattori dell'ospite, virali e ambientali sono in grado di influenzare la storia naturale dell'infezione cronica HCV, rendendo la progressione dell'epatopatia variabile a livello individuale: età, sesso, etnia, genetica, genotipo virale, livelli di transaminasi, co-infezione con virus dell'immunodeficienza umana (HIV) o dell'epatite B (HBV), consumo alcolico e sindrome metabolica.

Età

L'età all'infezione ha una correlazione diretta con lo sviluppo di epatopatia avanzata: infatti, i pazienti che acquisiscono l'infezione cronica in età infantile di solito mostrano una malattia scarsamente progressiva. Questo è stato estesamente confermato in molti studi condotti nel modello della trasmissione post-trasfusionale o post-chirurgica: uno studio tedesco che valutava pazienti infettati in età infantile a seguito di chirurgia cardiaca ha dimostrato che solo 3/67 (4%) pazienti sviluppavano una malattia progressiva in 20 anni di infezione [70]. D'altro lato, l'età all'infezione superiore ai 40 anni costituiva un fattore indipendente di progressione della fibrosi nello studio francese di Poynard [61], dato confermato anche da altri studi [71,72]. La velocità di progressione della fibrosi sembra accelerare esponenzialmente in età avanzata, sebbene sia difficile valutarla separatamente da altri cofattori dell'ospite e ambientali. Si suppone che i meccanismi coinvolti nell'accelerata progressione della fibrosi possano essere legati alla senescenza cellulare e al cambiamento della risposta immunitaria.

Sesso

Il sesso maschile è stato associato con un'accelerata progressione di malattia, più del 30% in più rispetto al sesso femminile (0.154 contro 0.111 unità di fibrosi per anno, $p < 0.001$) [61]. In due studi prospettici condotti rispettivamente in Irlanda e Germania, il tasso di sviluppo di cirrosi risultava dello 0.5% e 2% dopo circa 20 anni di infezione in coorti di pazienti di sesso femminile infettate a seguito di infusione di immunoglobuline peripartum [65,66,73]. I livelli di estrogeni sembrano essere i responsabili del ruolo protettivo del sesso femminile, in quanto l'estradiolo è in grado di inibire l'attività delle cellule stellate, che sono coinvolte nella deposizione di tessuto fibrotico nel fegato [74,75]. In accordo con questi dati, uno studio retrospettivo condotto in 710 donne HCV positive ha dimostrato una correlazione fra il periodo post-menopausale ed epatopatia avanzata, suggerendo che la velocità di progressione della fibrosi aumenti proporzionalmente alla riduzione del livello di estrogeni [76,77].

Etnia

I pazienti Afro-Americani dimostrano negli studi maggiori tassi di sviluppo di fibrosi avanzata e complicanze fegato-correlate rispetto ai pazienti Caucasici [78,79], sebbene alcuni autori ipotizzino che questi dati possano risultare anche da un limitato accesso alle cure in questo gruppo etnico [89]. Tuttavia, uno studio retrospettivo su 812 pazienti HCV con biopsia epatica disponibile ha dimostrato prevalenza più elevata di cirrosi nei pazienti Ispanici rispetto alle altre etnie (50% nei pazienti Ispanici, 38% nei bianchi non-Ispanici e 24% negli Afro-Americani,

$p < 0.001$). All'analisi multivariata, l'etnia risultava significativamente associata alla cirrosi insieme all'indice di massa corporea [81].

Genetica

Numerosi studi hanno cercato di identificare fattori genetici associati ad un'accelerata progressione della fibrosi nei pazienti con infezione cronica HCV, analizzando i geni del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (HLA), i geni coinvolti nel turnover della matrice extracellulare e nella deposizione di fibrosi e i geni regolatori delle vie infiammatorie. Gli alleli di classe II DRB*0405 e DQB1*0401 del complesso maggiore di compatibilità HLA sono stati associati con accelerata progressione di fibrosi, mentre altri alleli come DRB1*11 e DQB1*03 hanno dimostrato un ruolo protettivo [64,82,83]. La fibrosi è stata inoltre associata alla sovra-regolazione di 11 geni che includono fattori coinvolti nella produzione/rimodellamento della matrice extracellulare (TIMP1, MMP7), recettori di fattori di crescita (CCR2, CXCR3, CXCR4) e citochine (CXCL6, IL-8, IL-2) [84]. Più recentemente, la conduzione di studi di associazione *genome-wide* ha permesso di testare estesamente numerosi SNPs in ampie coorti di pazienti. In uno studio di coorte condotto in Svizzera su 1461 pazienti HCV con biopsia epatica disponibile e data di infezione nota, gli SNPs *rs9380516* (TULP1), *rs4374383* (MERTK) e *rs910049* (complesso HLA) erano associati ad una progressione di fibrosi più rapida. I risultati sono stati replicati in tre ulteriori coorti indipendenti e una successiva meta-analisi [85,86].

Molti studi hanno cercato di valutare il potenziale ruolo del genotipo IL28B (predittore di clearance spontanea e IFN-mediata dell'infezione HCV) nella storia

naturale dell'infezione HCV, con risultati contrastanti: alcuni autori hanno dimostrato una associazione significativa fra l'allele sfavorevole T di IL28B e la progressione della fibrosi, mentre altri studi non hanno replicato questi dati [87,88]. Infine, molta ricerca si è concentrata sullo SNP *rs738409 C>G* di *patatin-like phospholipase domain-containing protein 3* (PNPLA3), che è un riconosciuto determinante genetico di steatosi e fibrosi nel modello dell'epatopatia metabolica (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD): il genotipo omozigote mutato GG è stato associato con la severità del danno epatico in termini di steatosi e aumentata fibrosi anche in pazienti con infezione cronica HCV in due studi che hanno valutato complessivamente 1.356 pazienti [89,90].

Genotipo virale

Il ruolo del genotipo di HCV sulla progressione della fibrosi è stato molto dibattuto, in quanto numerosi studi condotti in passato suggerivano lo sviluppo di una malattia più aggressiva nei pazienti di genotipo 1b [91-95]. Tuttavia, altri autori non hanno replicato gli stessi risultati, in quanto il genotipo HCV non risultava più significativo aggiustando l'analisi statistica in base alla durata di infezione e all'età del paziente, a significare che il supposto ruolo del genotipo era legato ad un *bias* di selezione dei pazienti con durata di malattia maggiore [96-98]. Inoltre, la scarsa efficacia del trattamento antivirale nei pazienti con genotipo HCV-1b poteva rendere ragione di una prognosi peggiore rispetto a pazienti con genotipi maggiormente responsivi alla terapia antivirale basata su IFN e Ribavirina (RBV). Il genotipo 2 è stato inoltre associato ad una aumentata velocità di progressione a seguito dell'occorrenza dei *flare* epatitici (incrementi di

ALT > 400) che sono caratteristici dei pazienti HCV-2 rispetto ad altri genotipi [99,100]. Il genotipo 3, invece, è stato associato allo sviluppo di steatosi epatica a seguito dell'effetto steatogenico della proteina *core* HCV-3 [101,102]. Più recentemente, in un ampio studio di coorte condotto in Svizzera su 1.189 pazienti con data di infezione nota, il genotipo 3 risultava un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di fibrosi (OR 1.89, 95% CI 1.37-2.61, p<0.001) [103,104]. A parte un potenziale ruolo del genotipo 3 nella progressione della fibrosi, bisogna considerare che l'infezione HCV-3 è legata da un punto di vista epidemiologico a fattori di rischio come l'abuso di droghe per via endovenosa e l'abuso alcolico, che potrebbero contribuire ad un decorso più aggressivo di malattia.

Valori di transaminasi (ALT)

I pazienti con valori di ALT persistentemente nella norma sembrano dimostrare una malattia lentamente progressiva rispetto a pazienti con andamento di ALT fluttuanti [105-107]: i parametri biochimici, infatti sono marcatori surrogati di infiammazione epatica, che emerge in molti studi come determinante di progressione di fibrosi. Tuttavia, anche pazienti con ALT persistentemente normali possono dimostrare progressione di malattia e fino al 10% possono presentare fibrosi avanzata alla biopsia [107,108].

Co-infezione HBV e HIV

La prevalenza della co-infezione HBV/HCV è stimata intorno al 5-20% nei pazienti HBsAg positivi e 2-10% nei pazienti HCV, in quanto entrambi i virus

condividono vie di trasmissione e fattori di rischio [109,110]. HBV e HCV interferiscono reciprocamente, dando luogo a molteplici possibili scenari di replicazione virale: più frequentemente, HCV replica attivamente rispetto a HBV, ma HBV può prevalere su HCV o entrambi i virus possono contemporaneamente replicare attivamente. Sebbene manchino dati prospettici, il decorso della co-infezione HBV/HCV è considerato più severo della mono-infezione, con più elevati tassi di progressione a cirrosi e alle sue complicanze [111-116]. Anche nei pazienti con co-infezione HCV/HIV è riconosciuta una accelerata progressione di malattia e aumentata comparsa di complicanze [117-119]. In passato, la co-infezione HIV rappresentava un predittore di ridotta risposta al trattamento con IFN e RBV, tuttavia ad oggi lo sviluppo di nuovi farmaci antivirali diretti ha uniformato i tassi di guarigione per pazienti mono- e co-infetti.

Consumo alcolico

Il problema principale per la valutazione del ruolo dell'alcol nella storia naturale dell'infezione HCV è la scarsa standardizzazione del consumo alcolico, che è spesso riportato come informazione auto-riferita dal paziente, sebbene siano stati sviluppati numerosi questionari per migliorare una valutazione oggettiva. Inoltre, sebbene il concetto di “*standard drink*”, definito come la quantità di bevanda contenente una dose fissa di alcol (100 ml vino = 1 bottiglietta di birra = 1 bicchierino di superalcolico), sia stato largamente adottato in letteratura per incrementare la riproducibilità del dato, la quantità di alcol contenuta in uno *standard drink* varia a seconda delle diverse aree geografiche (es. 10 g/alcol in Europa, 12 g in USA e 23 g in Giappone) [120,121].

Molti studi hanno dimostrato efficacemente che l'alcol accelera la progressione della fibrosi nell'infezione HCV, sebbene siano stati proposti numerosi *cut-off* diversi per identificare la dose di alcol a rischio: nello studio francese di Poynard e colleghi, un introito alcolico di 50 g/die era associato con un incremento del 34% nella velocità di progressione della fibrosi, indipendentemente da età del paziente e durata di malattia [61]. Un altro studio ha suggerito un danno significativo anche per dosi minori di alcol assunto (es. oltre i 20 g/die). Un consumo alcolico moderato (31-50 g/die) era indipendentemente associato alla progressione della fibrosi all'analisi multivariata [122]. Più recentemente, un gruppo di lavoro scozzese ha dimostrato che in 1.620 pazienti HCV con data di infezione nota, l'introito alcolico sopra i 50 drink/settimana per almeno 6 mesi determinava un rischio attribuibile di cirrosi >50%, a dire che una proporzione significativa dei pazienti HCV sviluppava cirrosi a seguito del consumo alcolico invece che per l'infezione stessa da HCV [123].

Oltre al danno tossico diretto dell'etanolo sugli epatociti, la progressione accelerata della fibrosi nei pazienti HCV con consumo alcolico è stata legata alla relazione sinergica fra alcol e HCV: infatti l'alcol sembra ridurre la risposta immunitaria verso le proteine non strutturali di HCV, determinando una polarizzazione in senso Th2 [124]. Altri autori hanno suggerito un effetto promuovente dell'alcol sulla replicazione virale [125].

È ancora dibattuto, invece, quale modalità di consumo alcolico (giornaliera rispetto a episodica) determini il maggior danno epatico, in quanto numerosi studi sono stati pubblicati a conferma di entrambe le ipotesi [126-130].

Steatosi, obesità e sindrome metabolica

La steatosi rappresenta un fattore indipendente di progressione della fibrosi in molti studi [131,132]. La presenza di steatosi alla biopsia epatica in 985 pazienti dello studio HALT-C risultava un fattore prognostico di progressione di malattia insieme all'insulino-resistenza e all'incremento ponderale [133]. Il ruolo della steatosi come predittore indipendente di fibrosi è stato inoltre confermato da una meta-analisi condotta su 3.068 pazienti [134]. In realtà, l'interazione fra steatosi, virus HCV, insulino-resistenza e obesità è molto più complessa e difficilmente studiabile separatamente. L'aumentata prevalenza di diabete di tipo 2 osservata nei pazienti HCV suggerisce che il virus sia coinvolto attivamente e direttamente nei meccanismi patogenetici del diabete [135]. Infatti, il virus HCV inibisce il *signaling* mediato dal recettore dell'insulina, causando direttamente insulino-resistenza, che è il primo step del processo che conduce all'insorgenza di diabete [136]. Questo è confermato dal fatto che l'eradicazione virale di HCV ha dimostrato di ridurre l'insulino-resistenza e lo sviluppo di diabete nei pazienti trattati [137-140]. L'insulino-resistenza e il diabete di tipo 2 rappresentano fattori di rischio di progressione della fibrosi e sviluppo di complicanze fegato-correlate [141,142]. Uno studio di coorte condotto a Taiwan su 6.251 pazienti ha dimostrato come la comparsa di diabete costituisca un fattore di rischio indipendente di sviluppo di cirrosi e scompenso epatico in un follow-up di 10 anni rispetto ai pazienti non diabetici [143]. Anche dopo l'eradicazione virale, i cofattori metabolici e specialmente il diabete giocano un ruolo fondamentale nel determinare il rischio residuo di complicanze fegato correlate (vedi capitolo Storia naturale dell'infezione HCV dopo l'eradicazione virale)

Complicanze della cirrosi HCV

Le complicanze della cirrosi comprendono lo scompenso ascitico, l'insufficienza epatica (ittero ed encefalopatia porto-sistemica), il sanguinamento da varici e il carcinoma epatocellulare (HCC).

I principali meccanismi patogenetici che sostengono le complicanze della cirrosi includono l'infiammazione cronica, la deposizione di fibrosi con conseguente alterazione strutturale e progressiva perdita di parenchima funzionante, ma soprattutto lo sviluppo di ipertensione portale.

Ipertensione portale: scompenso, insufficienza epatica ed emorragia da varici

Da un punto di vista patogenetico, lo sviluppo dell'ipertensione portale rappresenta il principale meccanismo alla base delle manifestazioni cliniche dello scompenso epatico e della comparsa di varici. Si definisce ipertensione portale l'incremento della pressione all'interno della vena porta ≥ 6 mmHg (normalmente 3-5 mmHg); al di sopra di 10 mmHg si definisce l'ipertensione portale clinicamente significativa (*Clinically significant portal hypertension, CSPH*), sopra i 12 mmHg si determina un elevato rischio di sanguinamento da varici. L'incremento della pressione portale, inizialmente attribuita alla maggiore resistenza al flusso portale opposta dal fegato fibrotico (cirrotico), è sostenuta secondo più recenti studi anche da complessi meccanismi di rimodellamento vascolare, indotti dalla liberazione di mediatori (es. ossido nitrico, NO) a seguito dello *shear stress* portale. Ciò induce anche la vasodilatazione del circolo splancnico, che contribuisce a determinare il quadro di volemia inefficace che attiva il sistema renina-angiotensina-aldosterone e perpetua la ritenzione idro-

salina alla base della comparsa dell'ascite, facilitata anche dalla riduzione della sintesi epatica delle proteine con attività oncotica (albumina). La vasodilatazione splancnica e l'instaurarsi del cosiddetto "stato di circolazione iperdinamica" autoalimentano i meccanismi di ritenzione idro-salina e il progressivo incremento della pressione portale; la liberazione di mediatori di angiogenesi, inoltre, facilita la generazione dei circoli collaterali fra il circolo portale e la circolazione sistemica, come le varici esofagee [144,145]. La ridotta capacità metabolica del fegato cirrotico e lo sviluppo di circoli collaterali porto-sistemici determinano anche l'aumento della concentrazione nella circolazione sistemica di prodotti di degradazione intestinale come l'ammonio, meccanismi alla base della comparsa dell'encefalopatia porto-sistemica.

Da un punto di vista clinico, una revisione sistematica della letteratura pubblicata da D'Amico e colleghi ha proposto una classificazione della cirrosi in quattro stadi, che si differenziano per tassi di incidenza di complicanze e prognosi. Lo stadio 1 è caratterizzato dalla cirrosi compensata senza varici esofagee o ascite, e ha un'ottima prognosi (sopravvivenza 90-95% a 5 anni, mortalità 1% per anno). La progressione dallo stadio 1 ad altri stadi si verifica in circa l'11% dei pazienti per anno, a seguito dello sviluppo di varici. Lo stadio 2 è caratterizzato dalla presenza di varici non sanguinanti e ha un tasso annuo di mortalità del 3.4%. Si stima che rispettivamente il 6.6% e 4% dei pazienti per anno sviluppino ascite o sanguinamento da varici, che rappresentano la progressione allo stadio 3 o 4. Lo stadio 3 è caratterizzato da ascite con o senza varici, con tasso di mortalità che aumenta al 20% per anno, mentre lo stadio 4 è definito dalla comparsa del sanguinamento da varici con o senza ascite; in questo ultimo stadio il tasso di

mortalità a 1 anno arriva al 57%. Riassumendo, gli stadi 1 e 2 (cirrosi con o senza varici) identificano i pazienti con cirrosi compensata, mentre gli stadi 3 e 4 (cirrosi con ascite e/o varici sanguinanti) definiscono la cirrosi scompensata [146]. Nella comune pratica clinica, la cirrosi è classificata mediante lo score di Child-Pugh-Turcotte (CPT) in tre stadi (A,B,C), sulla base della combinazione di criteri clinici (presenza di ascite, encefalopatia) e laboratoristici (valore di albumina, tempo di protrombina e bilirubina sierica): lo stadio A rappresenta la cirrosi compensata, gli stadi B e C la cirrosi scompensata [147].

Uno studio di coorte che includeva 214 pazienti HCV con cirrosi compensata seguiti per un follow-up mediano di 17 anni ha riportato che il 28% dei pazienti progrediva da cirrosi compensata a scompensata nel periodo dello studio. Nel dettaglio, i tassi di incidenza annuali delle singole complicanze della cirrosi risultavano 3.9% per lo sviluppo di HCC, ascite 2.9%, ittero 2.0%, sanguinamento da varici 0.7% ed encefalopatia 0.1%. L'HCC era la principale causa di morte (44%) e la prima complicanza ad insorgere nel 27% dei pazienti, seguito dall'ascite (14%), ittero (9%) e sanguinamento da varici (1%), con un tasso di mortalità del 4% per anno [148]. Questi dati sono stati replicati da un altro studio prospettico con follow-up di 10 anni, dove il 31% dei pazienti sviluppava almeno una complicanza alla fine del periodo di osservazione: l'insorgenza di HCC era la più frequente e la prima complicanza a manifestarsi, seguita da ascite, sanguinamento da varici ed encefalopatia. [149].

Ad ulteriore conferma del ruolo chiave dell'ipertensione portale sulla prognosi del paziente come determinante degli eventi fegato-correlati, lo studio di Bruno e colleghi, condotto in 194 pazienti HCV con follow-up mediano di 14 anni, ha

dimostrato che la presenza di varici esofagee si associava allo scompenso epatico (HR=2.09; 95% CI 1.33-3.30) e alla mortalità fegato-correlata (HR=2.27; 95% CI 1.41-3.66). Lo sviluppo di HCC determinava un incremento del rischio di scompenso di 5 volte (HR=5.52; 95% CI 3.77-8.09), mentre lo scompenso rimaneva la causa principale di morte [150].

Carcinoma epatocellulare (HCC)

L'epatocarcinoma rappresenta il quinto tumore più frequente e la seconda causa di mortalità per tumore nel mondo [151]. Il tasso di incidenza di HCC nel paziente con cirrosi HCV con infezione attiva è stato stimato circa nel 3-5% per anno [148-149,152-153], mentre l'HCC nel paziente non cirrotico con epatite cronica costituisce un evento raro, a suggerire che lo sviluppo di epatopatia avanzata e l'aumentare della durata di malattia siano determinanti del rischio oncologico [153,154]. Di conseguenza, considerando le peculiarità epidemiologiche nella diffusione dell'infezione HCV nelle diverse aree geografiche, l'incidenza di HCC sta aumentando soprattutto in Nord America ed Europa settentrionale, paesi caratterizzati da una prevalente diffusione dell'infezione dopo gli anni '60 del secolo scorso a seguito dei fattori di rischio parenterale (abuso di droghe per via endovenosa). Nei paesi dell'Europa Mediterranea, Giappone e Hong Kong, dove la diffusione dell'infezione è avvenuta nelle prime decadi del 1900 a seguito di pratiche medico-sanitarie, l'incidenza di HCC sta diminuendo dopo l'introduzione di misure preventive per la trasmissione iatrogena [155,156].

I principali co-fattori di rischio clinici per lo sviluppo di HCC nel paziente con cirrosi HCV identificati dalla letteratura sono età, sesso maschile, il diabete di tipo

2 e la sindrome metabolica, l'assunzione di alcol e la co-infezione con altri virus epatici (HBV) [115, 151-152, 157-160]. Negli ultimi anni, a seguito dello sviluppo delle conoscenze sul genoma umano, numerosi studi hanno inoltre cercato di studiare e identificare specifiche mutazioni o profili genetici associati alla carcinogenesi nel tumore primitivo del fegato (vedi capitolo *Genetica dell'HCC: Stratificazione del rischio per una medicina personalizzata*).

L'HCC presenta alcune peculiari caratteristiche che determinano una specifica gestione dello screening, della diagnosi e del trattamento rispetto ad altri tipi di tumore non epatici. In primo luogo, a seguito della stima del tempo di raddoppiamento del tumore, la sorveglianza per la diagnosi precoce dell'HCC nel paziente con cirrosi è raccomandata con cadenza semestrale, in quanto questo lasso temporale permette eventualmente di diagnosticare il tumore in fase precoce, criterio chiave per determinare la possibilità di un trattamento radicale [151]. A differenza di altri tumori, l'HCC nel fegato cirrotico può essere diagnosticato mediante sole indagini radiologiche, dato il particolare comportamento del tumore alle indagini contrastografiche (TAC o RMN addome), utilizzate dopo il reperto ecografico di nodulo epatico sospetto. Infatti, l'HCC è dotato di vascolarizzazione arteriosa, a fronte del parenchima epatico che riceve apporto ematico prevalentemente venoso. Questa differenza si esplica alle indagini contrastografiche con un tipico pattern del tumore che, se presente, permette di prescindere da accertamenti istologici.

Infine, un'altra peculiarità dell'HCC è rappresentata dall'insorgenza all'interno di un fegato con un'epatopatia cronica, fattore che condiziona in modo importantissimo le possibilità terapeutiche del tumore stesso. Il grado di

insufficienza epatica, infatti, da una parte determina la possibilità o meno di procedere al trattamento del tumore, dall'altra condiziona la mortalità a breve termine del paziente con HCC, sia prima che dopo eventuali trattamenti specifici. L'insorgenza di HCC, infatti, può essere accompagnata dal punto di vista clinico dall'evento scompenso epatico, che rappresenta anche una delle cause di morte più comune dei pazienti con HCC [148-150].

MANIFESTAZIONI EXTRAEPATICHE

DELL'INFEZIONE HCV

L'infezione cronica da HCV è ormai considerata una vera malattia sistemica, in quanto è associata alla presenza di numerose manifestazioni extraepatiche, che determinano ulteriori comorbidità e impattano sulla qualità della vita dei pazienti con HCV [161,162]. Una stretta relazione causale con l'infezione HCV è stata definita per la crioglobulinemia mista e malattie ematologiche quali il linfoma non-Hodgkin, dove l'eradicazione virale rappresenta una vera terapia eziologica, a conferma del diretto ruolo patogenetico della replicazione virale in queste condizioni [163]. La lista delle manifestazioni extraepatiche di HCV è in continua crescita, ad esempio è stata riconosciuta un'associazione con malattie dermatologiche come il lichen planus, le gammopatie monoclonali in ambito ematologico, la fibromialgia e la sindrome secca in campo reumatologico [161]. Negli ultimi anni, inoltre, molti studi hanno dimostrato una forte associazione fra infezione HCV e insulino-resistenza, diabete, rischio cardiovascolare, glomerulopatie croniche e disordini neurocognitivi [137-140, 164]. Queste osservazioni sono state confermate da ampi studi di popolazione, che hanno dimostrato come la cura dell'infezione da HCV si associ con il miglioramento anche degli *outcomes* clinici non epatici, come ad esempio ridotta incidenza di insufficienza renale terminale, sindrome coronarica acuta e ictus [164,165]. Pertanto, l'eradicazione di HCV mediante trattamento antivirale incide positivamente non solo sulle complicanze fegato-correlate, ma determina anche una generale riduzione del tasso di mortalità per tutte le cause [166,167].

TERAPIA DELL'INFEZIONE HCV

La terapia dell'infezione da HCV è in grado di ottenere una completa eradicazione del virus dall'organismo ospite e, pertanto, la guarigione virologica rappresenta lo scopo principale del trattamento antivirale. L'eradicazione virale è definita come la negativizzazione della viremia di HCV (HCV-RNA) nel sangue, mantenuta per almeno 12 settimane dopo il termine del trattamento, detta anche risposta virologica sostenuta (SVR) [168]. Numerosi studi hanno confermato la persistenza dell'SVR nel tempo; ad oggi, infatti, non sono stati dimostrati reservoir virali che sostengano la possibilità di una recidiva in un'infezione eradicata, mentre la guarigione virologica non conferisce un'immunità e, pertanto, è possibile la reinfezione in caso di nuovo contatto con il virus HCV. Il raggiungimento della SVR rappresenta anche un surrogato di importanti *outcomes* clinici in grado di modificare la storia naturale dell'infezione e la prognosi a medio e lungo termine dei pazienti (vedi capitolo seguente).

Dalla scoperta del virus HCV alla prima decade degli anni 2000, la terapia antivirale dell'infezione HCV si è basata sull'uso dell'Interferone (IFN), inizialmente in monoterapia e, a partire dalla fine degli anni '90, in combinazione con la Ribavirina (RBV). Questa terapia, che ha rappresentato lo standard di cura per più di vent'anni, era purtroppo largamente imperfetta sia dal punto di vista dell'efficacia, ma soprattutto per quanto riguarda l'aspetto della sicurezza del trattamento. Infatti, i tassi di SVR con IFN erano limitati al 10%, se somministrato in monoterapia, e al 40-50% con l'avvento dell'IFN Peghilato (IFN combinato con una molecola di Peg per aumentarne l'emivita) in combinazione con la RBV, con efficacia più elevata nei genotipi HCV-2 e 3 (fino al 70-80%) [169]. Tuttavia,

il problema principale relativo all'uso di IFN e RBV era rappresentato dagli effetti collaterali del trattamento: sindrome simil-influenzale (astenia, febbre, artralgie), alterazioni del tono dell'umore, mielosoppressione (leuco-piastrinopenia) per quanto riguarda IFN; anemia e secchezza delle mucose per RBV. La presenza di tali effetti collaterali e il meccanismo di azione immunomodulante dell'IFN rendeva la terapia antivirale controindicata in numerose categorie di pazienti (epatopatia avanzata e/o scompensata, patologie autoimmuni e psichiatriche, trapiantati di organo solido), di fatto quindi limitando l'accesso al trattamento spesso in quelle categorie di pazienti maggiormente esposti al rischio di complicanze dell'infezione da HCV [170].

La svolta che ha determinato lo sviluppo di nuove molecole antivirali è avvenuta grazie alla conoscenza del ciclo replicativo di HCV, resa possibile dalla disponibilità di nuovi sistemi di coltura del virus in linee cellulari, che hanno permesso lo studio e la comprensione della replicazione virale e, pertanto, hanno identificato le principali proteine non strutturali che rappresentano i target farmacologici per i nuovi farmaci antivirali.

Di conseguenza, il paradigma della terapia antivirale è passato da un farmaco con azione immunomodulante antivirale "aspecifica" come l'IFN ad un ventaglio di molecole dirette contro le tre principali proteine non strutturali fondamentali per il ciclo replicativo di HCV, chiamati antivirali diretti (DAA, *direct-acting antivirals*) [168].

Le tre classi di DAA ad oggi disponibili comprendono:

- Inibitori della proteasi (NS3-4A) → suffisso -previr (es. Glecaprevir, Grazoprevir, Voxilaprevir)

- Inibitori della polimerasi (NS5B) → suffisso –buvir (Sofosbuvir, Dasabuvir)
- Inibitori dell'NS5A → suffisso –asvir (Velpatasvir, Pibrentasvir, Elbasvir)

Per ottenere una terapia antivirale efficace, è necessaria la combinazione di almeno 2 molecole di classi diverse, che garantiscano allo stesso tempo una adeguata efficacia antivirale unita ad una significativa barriera all'elevata variabilità genetica di HCV responsabile del meccanismo di resistenza.

Le combinazioni commercialmente disponibili nel 2019 in Italia comprendono:

- Sofosbuvir/Velpatasvir (Epclusa®): 400/100 mg, inibitore nucleosidico di NS5B (Sofosbuvir) e di NS5A (Velpatasvir)
- Glecaprevir/Pibrentasvir (Maviret®): 100/40 mg, inibitore di NS3-4A (Glecaprevir) e di NS5A (Pibrentasvir)
- Grazoprevir/Elbasvir (Zepatier®): 100/50 mg, inibitore di NS3-4A (Grazoprevir) e di NS5A (Elbasvir)
- Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir (Vosevi®): 400/100/100 mg, inibitore nucleosidico di NS5B (Sofosbuvir), di NS5A (Velpatasvir) e di NS3-4A (Voxilaprevir)

Queste combinazioni, basate su regimi interamente orali (IFN era somministrato per via parenterale sottocute), garantiscono ad oggi una breve durata del trattamento (8-16 settimane rispetto alle 24-48 con regimi a base di IFN) e, soprattutto, tassi di SVR superiori al 95% in tutte le categorie di pazienti, con riduzione di efficacia dimostrata solo nei pazienti con epatopatia scompensata. Alcune delle combinazioni ad oggi disponibili comprendono inoltre regimi pangenotipici (che agiscono su tutti i genotipi di HCV: Sofosbuvir/Velpatasvir ± Voxilaprevir, Glecaprevir/Pibrentasvir).

Il fallimento virologico rappresenta circa il 1-3% con i regimi di ultima generazione, e solitamente si manifesta tramite recidiva (*relapse*) virologico, caratterizzato da una negativizzazione di HCV-RNA in terapia, con ripositivizzazione dopo la sospensione del trattamento. Più rare modalità di fallimento ad oggi sono rappresentate dal *breakthrough* (negativizzazione di HCV-RNA in terapia, con ripositivizzazione prima della fine del trattamento oppure aumento della viremia in corso di trattamento), e dalla *Non risposta* (persistenza di positività per HCV-RNA nonostante il trattamento in corso) [168].

Oltre ad un sostanziale incremento dei tassi di SVR, e pertanto dell'efficacia del trattamento, l'avvento dei nuovi farmaci antivirali diretti ha cambiato radicalmente il paradigma della terapia, grazie al miglioramento del profilo di sicurezza e alla scomparsa degli effetti collaterali legati all'IFN. Pertanto, la disponibilità di regimi IFN-free ha permesso di estendere il trattamento anche ai pazienti precedentemente non candidabili a terapia antivirale basata su IFN, come ad esempio pazienti con comorbidità, trapiantati di organo solido e pazienti con cirrosi scompensata. Ad oggi, le uniche residue controindicazioni al trattamento antivirale con regimi IFN-free sono rappresentate dalla presenza di alcune terapie farmacologiche concomitanti (es. amiodarone), dall'epatopatia scompensata (solo con i regimi a base di inibitori dell'NS3-4A), insufficienza renale terminale (solo con i regimi a base di Sofosbuvir), nonché le comorbidità non epatiche che determinino una prognosi infausta a breve termine del paziente. L'elevata efficacia e sicurezza dei DAA ha reso pertanto quasi universale l'accesso alla terapia antivirale e ha avuto un importantissimo impatto sulla storia naturale dell'infezione HCV (vedi capitolo seguente).

STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE HCV

DOPO L'ERADICAZIONE VIRALE

Nei pazienti con epatite cronica HCV, il raggiungimento dell'SVR a seguito del trattamento antivirale impedisce di fatto la progressione allo stadio di cirrosi e lo sviluppo delle sue complicanze. Nei pazienti con cirrosi conclamata al momento del trattamento antivirale, l'eradicazione virale è considerata un obiettivo di importante rilevanza clinica, in quanto determina un miglioramento e/o la prevenzione delle complicanze fegato-correlate [166-167,171-172], e un sostanziale incremento dei tassi di sopravvivenza; alcuni studi suggeriscono addirittura che la sopravvivenza del paziente cirrotico SVR ritorni paragonabile a quella della popolazione generale di pari età e sesso [173]. Studi più recenti indicano inoltre che l'eradicazione virale si associa anche ad un miglioramento della sopravvivenza per quanto riguarda le cause di morte non epatiche, in quanto l'eradicazione virale si associa anche ad un miglioramento delle manifestazioni extraepatiche dell'infezione HCV (mortalità cardiovascolare, sviluppo di DM, malattie ematologiche) [164-165,174].

Regressione della cirrosi

Il concetto che la cirrosi rappresentasse un punto di non ritorno nella storia naturale dell'infezione HCV è stato messo in discussione negli ultimi anni da numerosi studi, i quali hanno dimostrato come il raggiungimento dell'SVR dopo la terapia antivirale determini un miglioramento istologico, in termini di rimodellamento della fibrosi fino addirittura alla regressione della cirrosi stessa.

La regressione della cirrosi è stata infatti documentata da numerosi studi nel 30%-60% dei pazienti sottoposti a biopsia epatica a distanza di 3-5 anni dopo aver ottenuto l'SVR a seguito di terapia antivirale basata su IFN [175-182]. Questi risultati sono stati anche confermati da un'ampia analisi di quattro studi randomizzati, che ha incluso più di 3.000 pazienti trattati con IFN con biopsia epatica disponibile sia pre- che post-trattamento: la regressione della cirrosi è stata osservata in 75/153 (49%) dei pazienti con una diagnosi istologica di cirrosi pre-terapia [177].

È interessante notare come il miglioramento della fibrosi si verifici non solo come regressione della cirrosi in accordo agli score semiquantitativi utilizzati in ambito anatomopatologico per la stadiazione del danno epatico (Ishak o Metavir), ma anche in termini di riduzione del contenuto totale di collagene nel fegato. Questo dato è stato dimostrato in uno studio pilota che ha valutato 38 pazienti con diagnosi di cirrosi istologica pre-trattamento, sottoposti ad una seconda biopsia 48-108 mesi dopo il raggiungimento dell'SVR: la regressione della cirrosi si verificava nel 61% dei casi, ma nella quota di pazienti che non raggiungeva i criteri per la regressione della cirrosi si osservava comunque una riduzione quantitativa del contenuto di collagene nel fegato [183].

La potenziale rilevanza clinica della regressione della fibrosi/cirrosi è stata sottolineata da un piccolo studio multicentrico francese, che ha dimostrato come le complicanze fegato-correlate (HCC, sanguinamento da varici e insufficienza epatica) si verificassero esclusivamente nei pazienti che non ottenevano la regressione della cirrosi, associando così per la prima volta un evento istologico ad un corrispettivo clinico [180]. Pertanto, l'identificazione della regressione della

cirrosi potrebbe guadagnare una rilevanza clinica, con l'obiettivo di individuare i pazienti ancora a rischio di complicanze e stabilire quindi strategie individualizzate di sorveglianza delle complicanze fegato-correlate. Ad oggi, purtroppo, questo è difficilmente perseguibile nella pratica clinica per diversi motivi: in primo luogo, infatti, i tassi riportati dagli studi circa la regressione della cirrosi sono molto eterogenei, e dipendono dai diversi intervalli di tempo trascorsi fra biopsia pre- e post-terapia. In secondo luogo, l'accuratezza diagnostica della biopsia risente della lunghezza del frustolo ottenuto e del possibile errore di campionamento legato all'irregolare distribuzione della fibrosi nel fegato. Infine, lo sviluppo di metodiche non invasive per stadiare la fibrosi, validate soprattutto nel modello dell'epatite cronica HCV, ha significativamente ridotto l'esecuzione di biopsie epatiche pre-trattamento. Tali metodiche non invasive, d'altra parte, se utilizzate per stadiare la fibrosi post-SVR vanno incontro ad una sostanziale perdita di accuratezza, in quanto sono basate soprattutto sulla combinazione di parametri biochimici che vanno incontro a normalizzazione post-SVR (transaminasi...) [184]. Anche la *stiffness* epatica risente sia della riduzione dell'infiammazione, così come della riduzione del contenuto di collagene nel fegato, pertanto anche le metodiche non invasive elastografiche (Fibroscan®) hanno scarsa performance diagnostica nella stadiazione della fibrosi post-SVR [185-187]. In conclusione, la regressione della cirrosi, sebbene sia stata dimostrata istologicamente in letteratura nell'ambito di studi clinici e rappresenti verosimilmente il corrispettivo istologico dei benefici clinici osservati nei pazienti con cirrosi HCV dopo l'SVR, non è attualmente diagnosticabile senza ricorso all'istologia e non rappresenta ad oggi un target diagnostico con l'obiettivo di

modificare la sorveglianza delle complicanze dell'epatopatia nei pazienti SVR, tuttavia rappresenta un'interessante campo di ricerca futura per la stratificazione individuale del rischio di complicanze fegato-correlate.

Ipertensione portale

La valutazione dei benefici dell'SVR sull'ipertensione portale nei pazienti con cirrosi HCV è stata in passato resa difficile dal fatto i pazienti con questa condizione clinica presentavano spesso controindicazioni all'utilizzo di IFN (bassa conta piastrinica, scompenso epatico) e, pertanto, non ricevevano terapia antivirale. Tuttavia, nei pazienti con ipertensione portale ma cirrosi compensata, i dati di letteratura generati in epoca di IFN erano concordi nel dimostrare che il raggiungimento dell'SVR determinasse un sostanziale miglioramento dell'ipertensione portale misurata mediante il gradiente pressorio venoso epatico (*hepatic venous pressure gradient*, HVPG) [188,189]. Dal punto di vista clinico, il raggiungimento dell'SVR era in grado di prevenire o ritardare la comparsa delle varici esofagee: una sottoanalisi di uno studio prospettico che includeva 218 pazienti con cirrosi HCV senza varici (149 trattati con IFN) seguiti per 12 anni, ha dimostrato che nessuno dei 34 (22.8%) pazienti con SVR sviluppava varici, rispetto a 22/69 (32%) pazienti non trattati e 45/115 (39%) pazienti senza SVR [190]. Questi risultati sono stati parzialmente ridimensionati da un successivo studio di D'Ambrosio e colleghi, che ha incluso 127 pazienti con cirrosi HCV sottoposti a trattamento con IFN; 17 di questi presentavano varici piccole al basale. In un follow-up mediano di 68 mesi dopo il trattamento, 2/57 (3.5%) pazienti sviluppavano varici de novo, rispetto a 8/53 (15.1%) pazienti non-SVR

($p=0.047$), le varici progredivano in 3 pazienti e 2 pazienti non-SVR presentavano un sanguinamento da varici. Questi risultati suggeriscono che, nonostante i benefici dell'SVR sull'ipertensione portale nei pazienti con cirrosi HCV compensata, la sorveglianza endoscopica è ancora raccomandata nel follow-up del paziente guarito [191].

La disponibilità di regimi senza IFN ha permesso di sottoporre al trattamento pazienti con ipertensione portale severa e scompenso; di conseguenza numerosi studi hanno potuto valutare i cambiamenti emodinamici e gli *outcomes* clinici dopo l'SVR anche in questo sottogruppo di pazienti. Lo studio pilota di Afdhal e colleghi ha valutato l'andamento dell'ipertensione portale (misurata mediante HVPG) in due gruppi di 25 pazienti con cirrosi HCV (scompensata nel 64%, varici nel 74%), randomizzati a trattamento con farmaci antivirali diretti immediato o differito di 24 settimane. Analizzando i 37 pazienti che disponevano di misurazioni di HVPG pre- e post-terapia, a fine trattamento l'HVPG si riduceva nel 12-24% dei casi (considerando rispettivamente una riduzione sotto i 12 mmHg e del 20% del valore basale). Considerando invece le modificazioni dell'HVPG 48 settimane dopo il trattamento in un piccolo sottogruppo di pazienti, in 8 su 9 (89%) pazienti SVR con un HVPG sopra i 12 mmHg si verificava una riduzione del 20% del valore assoluto, che scendeva sotto i 12 mmHg in tre casi. Nonostante i piccoli numeri, questo studio è stato il primo a dimostrare, nell'epoca dei farmaci IFN-free, che l'SVR si associa ad una riduzione dell'HVPG e ad un miglioramento del quadro di ipertensione portale post-terapia nel breve e medio-lungo termine [192]. Questi risultati sono stati ripresi da un più vasto studio condotto in Austria da Mandorfer e colleghi, che ha incluso retrospettivamente

100 pazienti con cirrosi HCV con SVR a regimi basati su DAA e HVPG basale compatibile con ipertensione portale (≥ 6 mmHg). All'interno dello studio, un gruppo di 60 pazienti veniva sottoposto a HVPG post trattamento. A differenza dello studio di Afdhal, la maggior parte dei pazienti in questo studio presentava una cirrosi compensata (93%) e la prevalenza delle varici al basale era del 36%. 41/60 (68%) pazienti presentavano una ipertensione portale clinicamente significativa (HVPG >10 mmHg). Dopo l'SVR, i valori di HVPG si riducevano significativamente in tutti i pazienti e scendevano sotto il *cut-off* per la diagnosi di ipertensione portale (HVPG >6 mmHg) rispettivamente nel 63% dei pazienti con HVPG basale 6-9 mmHg e nel 43% dei pazienti con HVPG 10-15 mmHg. In 8/20 (40%) pazienti con valore ≥ 16 mmHg al basale, l'HVPG si riduceva sotto i 10 mmHg (ipertensione portale clinicamente significativa), tuttavia nessun paziente regrediva completamente l'ipertensione portale e in 4 pazienti si verificava un incremento, a significare che stadi più avanzati di ipertensione portale sono associati ad una minore probabilità di migliorare dopo il raggiungimento dell'SVR. Nei pazienti con ipertensione portale clinicamente significativa (>10 mmHg), l'HVPG scendeva del 20% o sotto i 12 mmHg in 16/29 (52%) pazienti [193]. Questi risultati sono stati replicati da uno studio spagnolo, che ha valutato le modificazioni dell'HVPG in pazienti con ipertensione portale clinicamente significativa (HVPG >10 mmHg) che raggiungevano l'SVR dopo terapia basata su DAA, valutati a 96 settimane dopo il termine del trattamento. Globalmente, i valori di HVPG andavano incontro ad una progressiva riduzione rispetto al basale, in particolare a 96 settimane solo il 77% dei pazienti aveva ancora valori di HVPG >10 mmHg e il 53% presentava un HVPG sopra i 12 mmHg. Tuttavia, da

un punto di vista clinico, lo scompenso epatico si verificava ancora nel 5-20% dei pazienti e le varici esofagee andavano incontro ad una progressione nel 20% dei casi dopo l'SVR [194].

Sebbene siano necessari più ampi studi (con un follow-up maggiormente esteso) per valutare i cambiamenti a lungo termine dell'ipertensione portale nei pazienti con cirrosi HCV che raggiungono l'SVR dopo regimi IFN-free, i dati ad oggi disponibili confermano che il'SVR si traduce in un significativo beneficio sul quadro di ipertensione portale. Tuttavia, il miglioramento è limitato nei pazienti con epatopatia più avanzata pre-trattamento e il complesso rimodellamento che porta ad un beneficio sul quadro di ipertensione portale è un processo lento, pertanto i pazienti potrebbero essere esposti ancora a complicanze nel breve-medio termine (scompenso, ascite, sanguinamento). Pertanto, le attuali linee guida internazionali raccomandano di continuare la sorveglianza endoscopica per lo screening delle varici esofagee nei pazienti che raggiungono l'SVR, basando il timing del follow-up sulla base della severità della epatopatia e sulla presenza di varici pre-trattamento [195].

Scompenso e insufficienza epatica

Lo sviluppo delle terapie basate sui farmaci antivirali diretti ha determinato un sostanziale impatto in particolare sugli *outcomes* clinici della popolazione di pazienti con epatopatia più avanzata. Questo sottogruppo di pazienti, più esposto al rischio di sviluppare complicanze fegato-correlate e pertanto con una ridotta sopravvivenza nel breve-medio termine, non poteva beneficiare di terapie basate su IFN per le controindicazioni legate all'utilizzo dell'IFN stesso (scompenso,

rischio infettivo) e, di conseguenza, si trovava esposto al paradosso di rappresentare la popolazione più urgente da trattare in assenza di una terapia adeguata. I benefici del trattamento con DAA nel paziente con epatopatia scompensata sono emersi già negli studi registrativi delle prime combinazioni di farmaci IFN-free: la terapia antivirale nel paziente con cirrosi in stadio B o C secondo lo score di Child era in grado di ottenere un miglioramento del quadro di scompenso in una quota variabile dal 50 al 70% dei pazienti negli studi SOLAR-1 e 2 condotti su più di 200 pazienti con malattia scompensata pre-trattamento [196,197]. Tale miglioramento clinico-laboratoristico si traduceva inoltre in una riduzione degli eventi fegato-correlati e della mortalità nel breve-medio termine: nel programma di accesso anticipato ai DAA condotto in Gran Bretagna su 409 pazienti con cirrosi scompensata, il gruppo di 261 pazienti che riceveva un trattamento differito di soli 6 mesi presentava un tasso di eventi avversi (insufficienza epatica, morte, sviluppo di HCC, sepsi, ospedalizzazione) significativamente più alto rispetto ai pazienti che avevano la possibilità di accedere al trattamento immediatamente [198]. Analizzando gli *outcomes* dei pazienti 15 mesi post-trattamento, il tasso di eventi avversi era significativamente più elevato per chi presentava pre-terapia un punteggio >15 secondo lo score di MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*), lo score attualmente usato per predire la sopravvivenza a breve termine nel paziente cirrotico, e che costituisce ad oggi il criterio per attribuire la priorità ai pazienti in lista per trapianto di fegato. Questi risultati sono stati riconfermati anche da un successivo studio Spagnolo, che ha quantificato in circa il 60% la percentuale di pazienti che migliora il quadro di scompenso o rimane stazionaria; in questo studio, il *cut-off*

di MELD>18 punti era in grado di separare due gruppi di pazienti che differivano significativamente per probabilità di sopravvivenza [199]. Sebbene un miglioramento clinico sia quindi dimostrato nella maggioranza di pazienti scompensati trattati con DAA, ad oggi, tuttavia, non è stato effettivamente identificato un univoco *cut-off* in grado di discriminare pazienti che beneficiano significativamente del trattamento, anche se è intuitivo il concetto che il “punto di non ritorno” sia direttamente proporzionale al grado di insufficienza epatica. Inoltre, dato il breve periodo di follow-up legato alla recente commercializzazione dei DAA, è necessario valutare prospetticamente se l’impatto del trattamento sia duraturo nel tempo. Questo concetto è fondamentale ai fini di comprendere se i pazienti scompensati che vanno incontro ad un miglioramento clinico mantengano stabilmente questa condizione e il trattamento antivirale sia effettivamente in grado di evitare la necessità di ricorrere ad un trapianto di fegato. I primi dati in proposito, sembrano estremamente incoraggianti: un recente lavoro multicentrico che ha analizzato il follow-up di pazienti inseriti in lista di trapianto di fegato per cirrosi HCV scompensata, e successivamente sospesi dalla lista (*delisting*) per miglioramento clinico a seguito della terapia antivirale, sembrano mantenere tale condizione anche nei successivi 2 anni [200]. Inoltre, i dati dell’ultimo decennio del registro Europeo dei trapianti di fegato dimostrano chiaramente come l’avvento dei DAA si sia tradotto in una sostanziale riduzione della cirrosi HCV scompensata come indicazione al trapianto di fegato [201].

Carcinoma epatocellulare (HCC)

Numerosi studi condotti nell'epoca delle terapie basate su IFN hanno dimostrato che il raggiungimento dell'SVR si associa ad una riduzione del rischio di HCC nei pazienti con cirrosi HCV: una meta-analisi condotta su 30 studi, che ha incluso un totale di 31.528 pazienti trattati con IFN, ha evidenziato una riduzione del rischio di HCC del 75% nei pazienti con HCV e qualunque stadio di fibrosi (HR 0.24, 95% CI 0.18-0.31) in un follow-up da 2 a 14 anni [202]. Più recentemente, un ampio studio di coorte, condotto sui 33.005 Veterani Americani HCV trattati con IFN + RBV dal 1999 al 2009, ha riportato un tasso di incidenza annuale di HCC dello 0.33% in 10.738 pazienti SVR rispetto all'1.32% nei pazienti che non ottenevano l'eradicazione virale, confermando pertanto che l'SVR si associa ad una riduzione significativa del rischio di HCC (HR: 0.49, 95% CI 0.46-0.53). Tuttavia, il rischio di HCC rimaneva più alto nei pazienti con cirrosi (1.39% per anno), a significare che questi pazienti necessitano ancora di continuare la sorveglianza per HCC, che è considerata costo-efficace al di sopra di un tasso di incidenza dell'1% per anno. All'analisi multivariata, la cirrosi risultava il più forte predittore indipendente di HCC (HR 6.69, 95% CI 4.32-10.35), seguita dal diabete (HR 1.88, 95% CI 1.21-2.91) e l'età più avanzata al momento del raggiungimento dell'SVR (HR 4.51, 95% CI 1.96-10.4 per età > 65) [203]. Un'ampia revisione di dati clinici pubblicati su 1.000 pazienti con fibrosi avanzata o cirrosi ha riportato un tasso cumulativo di incidenza di HCC nel paziente con SVR dell'8.7% a 8 anni (95% CI 0.0-4.3), corrispondente quindi a circa 1% per anno in questa popolazione di pazienti con epatopatia severa. Le variabili indipendenti associate al rischio residuo di HCC risultavano anche in questo caso l'età, il diabete e la bassa conta

piastrinica (indicatore indiretto di epatopatia più avanzata). Stratificando i tassi di HCC sulla base dell'età del paziente a inizio trattamento, l'incidenza di HCC risultava 2.6% nei pazienti <45 anni, 9.7% fra 45 e 60 anni e 12.2% nei pazienti con più di 60 anni al momento della terapia antivirale, suggerendo quindi un importante beneficio nell'eradicazione precoce del virus HCV [171].

A partire dalla disponibilità di regimi IFN-free, molti dati sono stati generati circa il rischio di HCC dopo il trattamento con DAA, con risultati inizialmente contrastanti: infatti, mentre alcuni studi hanno dimostrato che l'SVR non sembra ridurre il rischio di HCC nei primi 6-12 mesi dopo l'eradicazione HCV, altri lavori hanno evidenziato tassi inaspettatamente alti di incidenza di HCC poco dopo il raggiungimento dell'SVR, e altri studi hanno invece mostrato un ruolo protettivo dell'SVR sul rischio HCC, replicando così i precedenti dati ottenuti con regimi basati su IFN.

Per quanto riguarda gli studi con incrementato rischio di HCC, Conti e coautori hanno riportato un'incidenza di HCC del 3.1% a 6 mesi in pazienti con cirrosi HCV dopo trattamento con DAA, mentre altri due studi con un follow-up esteso a 12 mesi hanno riportato un tasso di sviluppo di HCC dal 6 al 7.4% [204-206]. Analizzando invece i pazienti con una storia di HCC precedente al trattamento antivirale, l'HCC recidivava post-terapia in 17/59 pazienti (28.8%) nello studio di Conti e in 16/58 (27.6%) pazienti di uno studio del gruppo di lavoro di Barcellona, sebbene il ridotto follow-up post terapia e il breve intervallo di tempo fra l'ultimo trattamento dell'HCC e l'inizio della terapia antivirale potessero determinare l'inclusione di pazienti con HCC attivo al basale [207,208]. Infatti, l'analisi di 267 pazienti HCV con pregresso HCC sottoposti a terapia antivirale in

uno studio francese non confermava questi dati, in quanto i tassi di ricorrenza di HCC risultavano 0.73/100 pazienti-mese nei 189 pazienti trattati con DAA rispetto a 0.66/100 in nei 78 pazienti non trattati [209].

Molti altri studi hanno successivamente dimostrato in maniera solida che l'incidenza di HCC nei pazienti cirrotici sottoposti a trattamento con DAA si riduce, confermando il ruolo protettivo del raggiungimento dell'SVR. Il vasto studio *real-life* di Cheung e colleghi, derivante dai dati del programma di accesso compassionevole anticipato al trattamento con DAA per 667 pazienti cirrotici in Gran Bretagna, ha potuto offrire la possibilità di valutare l'incidenza di HCC nei pazienti cirrotici trattati con regime IFN-free rispetto ad un "braccio controllo" in cui il trattamento veniva differito di 6 mesi: durante il periodo di osservazione, l'8.9% dei pazienti non trattati sviluppava HCC rispetto al 6.7% dei pazienti non responsivi al trattamento, rispetto a 3.5% dei pazienti che raggiungevano l'SVR [210]. La riduzione dell'incidenza di HCC è stata inoltre confermata da un ampio studio Italiano condotto in più di 3.300 pazienti con fibrosi avanzata o cirrosi, dove l'HCC si sviluppava in 41 (1.21%) pazienti in un follow-up mediano di 225 giorni dopo il trattamento con DAA, corrispondente ad un'incidenza di 1.64 x 100 persone/anno [211].

Più recentemente, uno studio retrospettivo condotto nei Veterani Americani ha valutato il rischio di HCC post SVR in una vastissima coorte di 22.500 pazienti con HCV trattati con DAA. Fra i 19.518 pazienti che raggiungevano l'SVR (39% della popolazione aveva una diagnosi di cirrosi), si osservavano 271 nuovi casi di HCC (183 nei pazienti SVR). Il raggiungimento dell'SVR era associato ad una riduzione del rischio di HCC del 76% (HR 0.28, 95% CI 0.22-0.36), mentre, come

atteso, i pazienti con cirrosi presentavano un tasso di incidenza maggiore rispetto ai non-cirrotici (1.82 rispetto a 0.34/100 persone/anno, HR 4.73, 95% CI 3.34-6.68). L'effetto protettivo dell'SVR si evidenziava precocemente ma la sua influenza cresceva nel tempo [212].

Numerosi studi hanno cercato di identificare i predittori associati all'insorgenza di HCC nel paziente HCV cirrotico guarito dopo terapia con DAA: complessivamente, l'età più avanzata, il sesso maschile, la presenza di diabete/sindrome metabolica e lo stadio più avanzato di epatopatia pre-trattamento (espresso da variabili cliniche come la bassa conta piastrinica, lo score di Child e l'elevata *stiffness* epatica alle indagini elastografiche) sono risultate le variabili indipendentemente associate all'insorgenza di HCC post trattamento [213-215].

Analizzando criticamente la vasta letteratura riguardante il rischio di HCC nei pazienti trattati con DAA, l'eterogeneità dei risultati rispetto a quelli ottenuti con IFN può essere parzialmente spiegata da un *bias* temporale e di selezione: lo sviluppo dei regimi IFN-free ha permesso un accesso al trattamento antivirale quasi universale, includendo pazienti con epatopatia più avanzata e cirrosi scompensata, popolazione che ha un rischio naturalmente più elevato di sviluppare HCC. Inoltre, grazie all'ottimale profilo di sicurezza dei DAA, la popolazione trattata con regimi IFN-free è caratterizzata da un'età media più avanzata e da maggiori comorbidità rispetto ai pazienti trattati in epoca di IFN; queste caratteristiche cliniche (età avanzata, diabete) rappresentano predittori indipendenti e addizionali di tumore. Di conseguenza, non è sorprendente che gli studi condotti con regimi basati su IFN riportino tassi di incidenza di HCC minori rispetto ai pazienti trattati con DAA, soprattutto nel breve termine. Inoltre,

bisogna considerare che, nelle fasi iniziali del trattamento con DAA (2014-2016), in molti paesi è stato dato accesso preferenziale e anticipato ai pazienti con malattia più avanzata, che quindi nel breve termine possono essere esposti ad un rischio di complicanze maggiore.

Pertanto, pur considerando la diversa popolazione di pazienti trattata con IFN e DAA, il raggiungimento dell'SVR riduce il rischio di HCC nel paziente cirrotico HCV, indipendentemente dal tipo di trattamento utilizzato per ottenere la cura virologica. Questo specifico aspetto è stato riconfermato da una vastissima analisi condotta su 62.354 pazienti provenienti dalla casistica dei Veterani Americani, che ha valutato 40.406 pazienti trattati con regimi contenenti IFN e 21.948 pazienti trattati con DAA: il raggiungimento dell'SVR si associava ad una riduzione del rischio di HCC del 71% [HR 0.29; 95% CI 0.23-0.37], ma, soprattutto, l'effetto protettivo dell'SVR era indipendente dal trattamento considerato (IFN vs. DAA) [216].

In conclusione, sebbene il raggiungimento dell'SVR si associ ad una progressiva riduzione dell'incidenza di HCC, la persistenza di un rischio residuo di HCC nei pazienti con cirrosi al momento dell'eradicazione virale giustifica la raccomandazione delle attuali linee guida internazionali di mantenere la sorveglianza per HCC anche dopo il raggiungimento dell'SVR, mediante ecografia addome ogni 6 mesi [151]. Sebbene questa raccomandazione sia costo-efficace (stimando un rischio globale di HCC nel paziente cirrotico guarito dell'1-2% per anno), il mantenimento a lungo termine della sorveglianza mediante l'esecuzione di ecografia addome con cadenza semestrale in tutta la popolazione dei pazienti cirrotici determina un alto dispendio di risorse economiche e sanitarie

[217]. Pertanto, è necessario migliorare la stratificazione del rischio su base individuale, considerando o combinando altri predittori clinici. Ad esempio, uno studio condotto a Taiwan ha cercato di sviluppare uno score predittivo di HCC nei pazienti trattati con IFN, identificando tre profili di rischio sulla base di predittori di HCC come età, fibrosi, alfa-fetoproteina e conta piastrinica [218].

Nei pazienti trattati con DAA, Ioannou e colleghi hanno generato uno score clinico basato sulla combinazione di variabili laboratoristiche (es. conta piastrinica) e cliniche (età, genotipo virale, stadio di fibrosi), che si propone di predire a livello individuale il rischio di HCC dopo SVR [219]. Al di là di questi tentativi, la ricerca attuale si sta cercando di dirigere sempre di più verso una medicina personalizzata, ad esempio prendendo in considerazione anche variabili genetiche, al fine di individualizzare al massimo la stratificazione del rischio di HCC e definire pertanto modelli personalizzati di sorveglianza.

GENETICA DELL'HCC: STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO PER UNA MEDICINA PERSONALIZZATA

Grazie allo sviluppo delle conoscenze nell'ambito dello studio del genoma umano, negli ultimi anni la ricerca si è concentrata sull'identificazione di geni o varianti genetiche potenzialmente implicate nella patogenesi di diverse malattie. Tali obiettivi sono stati perseguiti sia mediante studio di singoli geni coinvolti nelle note vie patogenetiche della malattia in esame (studi *single gene-based* o *biological hypothesis-based*), sia mediante la conduzione di vasti studi di associazione definiti *genome-wide association studies (GWAS)*. In questi studi, si confronta la frequenza di molteplici varianti genetiche in un'estesa popolazione di casi e controlli, identificando eventuali varianti che presentano una differenza statisticamente significativa nella popolazione affetta dalla patologia presa in esame rispetto ai controlli sani. Gli studi GWAS conducono quindi all'identificazione di possibili varianti genetiche candidate che si dimostrano associate con la patologia in esame, prima ancora di comprendere la plausibilità biologica dell'associazione riscontrata e senza pertanto limitarsi alle vie patogenetiche note di una certa patologia. Il vantaggio di questi studi è inoltre quello di essere solitamente condotti su popolazioni molto estese e, pertanto, di presentare una elevata potenza statistica per suffragare l'associazione dimostrata.

Gli studi condotti nell'ambito dell'HCC nei pazienti con infezione cronica da HCV hanno identificato numerose varianti genetiche, soprattutto polimorfismi a

singolo nucleotide (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) che possano rappresentare fattori di aumentata suscettibilità dell'ospite allo sviluppo di HCC: di seguito sono riportati i principali SNPs che abbiano dimostrato le associazioni maggiormente significative.

PNPLA3

Il polimorfismo *rs738409* C>G è caratterizzato da una sostituzione amminoacidica isoleucina con metionina in posizione 148 a livello del gene *patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3)* del cromosoma 22: la proteina codificata è espressa nell'uomo soprattutto a livello epatico e ha un ruolo nel turnover lipidico intracellulare, localizzandosi a livello delle gocce lipidiche e regolando, grazie alla propria attività di idrolasi, la ripartizione dei trigliceridi fra membrana cellulare e gocce lipidiche stesse. Il polimorfismo genetico altera la degradazione della proteina PNPLA3 e determina la ridotta esportazione di lipidi dagli epatociti, costituendo il meccanismo patogenetico alla base dell'associazione fra la variante di PNPLA3 e l'accumulo di trigliceridi a livello epatico (steatosi) [220-222]. Numerosi studi hanno dimostrato la correlazione fra la variante di PNPLA3 e severità di steatosi, steatoepatite e progressione di fibrosi soprattutto nei pazienti con epatopatia metabolica (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) [223-227]. Inoltre, nel modello dell'epatopatia alcolica, dove la steatosi rappresenta istologicamente il primo riscontro dell'effetto tossico dell'etanolo, la variante di PNPLA3 è emersa come uno degli SNPs associati allo sviluppo di cirrosi alcolica in uno studio GWAS e in numerosi studi condotti in pazienti con epatopatia alcolica [228,229].

Più recentemente, altri studi hanno riconfermato l'associazione di PNPLA3 con steatosi, fibrosi ed epatopatia maggiormente progressiva anche nel modello dell'infezione cronica HCV [230]. Per quanto concerne il rischio di HCC, l'associazione dello SNPs PNPLA3 *rs738409* C>G con lo sviluppo di HCC è stata dimostrata da numerosi studi condotti in ampie casistiche [231-237] e da almeno quattro metanalisi che hanno analizzato complessivamente più di 14.000 pazienti con HCC nell'epatopatia metabolica (NAFLD) e alcolica provenienti da casistiche Europee ed Asiatiche [233,238-240]. L'associazione fra HCC e variante di PNPLA3 è stata confermata anche nel modello dell'epatopatia HCV-correlata, sia da alcuni studi condotti nel mondo Asiatico [241,242], sia da una recente metanalisi [233], anche se l'associazione fra PNPLA3 e HCC risultava statisticamente meno forte rispetto a quanto osservato nel modello dell'epatopatia metabolica-alcolica (OR 1.55 vs. 2.20 nell'epatopatia alcolica). Uno studio Italiano ha inoltre suggerito un impatto prognostico negativo della variante di PNPLA3 nei pazienti con HCC su base metabolica; infatti la variante mutata si associava ad una presentazione del tumore in fase più avanzata e ad una ridotta sopravvivenza [243].

Il meccanismo patogenetico alla base dell'associazione fra PNPLA3 e HCC potrebbe comprendere la lipotossicità legata all'incremento della concentrazione degli acidi grassi liberi, con conseguente attivazione di vie intracellulari che conducono alla perossidazione lipidica, stress ossidativo e danno cellulare e del DNA [223]. La via patogenetica mediata dalla steatosi avrebbe inoltre una plausibilità biologica anche nel modello dell'infezione HCV, dove la steatosi e i co-fattori metabolici sono fattori clinici riconosciuti come determinanti del rischio

di progressione dell'epatopatia nella storia naturale e predittori di HCC sia nel paziente viremico, sia dopo l'avvenuta eradicazione virale.

TM6SF2 e MBOAT7

Il polimorfismo *rs58542926* C>T è caratterizzato da una sostituzione di base nel nucleotide 499 del gene TM6SF2 (*Transmembrane six superfamily member 2*), che determina l'incorporazione dell'amminoacido lisina al posto del glutammato nel residuo 167 (E167K). Il gene TM6SF2 è localizzato sul cromosoma 19 e codifica per una proteina di 351 aminoacidi con 7-10 domini transmembrana, espressa prevalentemente a livello epatico ed intestinale e coinvolta nella regolazione del metabolismo lipidico a livello epatico [244-246]. La variante E167K determina una riduzione dell'espressione della proteina, ed è associata ad una ridotta secrezione di lipoproteine VLDL e ad un conseguente aumento della concentrazione epatica di trigliceridi (steatosi) [247,248]. Numerosi studi hanno confermato l'impatto della variante E167K sulla steatosi epatica in pazienti affetti da NAFLD, riportando anche un'associazione con un aumentato rischio di sviluppare steatoepatite (NASH) e progressione della fibrosi [249,250]. TM6SF2 è stato associato inoltre ad un aumento del rischio cardiovascolare, sebbene altri studi abbiano suggerito che la ridotta secrezione di VLDL determinerebbe ridotti livelli di colesterolo sierico e pertanto rappresenterebbe, al contrario, un fattore protettivo da eventi cardiovascolari [251,252]. L'associazione fra la variante E167K di TM6SF2 e lo sviluppo di HCC è stata riportata da uno studio Asiatico condotto in pazienti con epatopatia non virale e da due studi Europei che consideravano pazienti con epatopatia metabolica e cirrosi alcolica [228,231-

232,236]. Nei pazienti affetti da epatopatia HCV-correlata, la variante E167K di TM6SF2 è stata associata con la severità della steatosi e attività necroinfiammatoria a livello epatico, rappresentando un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di fibrosi e cirrosi in un recente studio condotto su più di 1.400 pazienti appartenenti a due coorti Europee [253]. Questi dati sono stati riconfermati anche da un più piccolo studio monocentrico italiano condotto su 148 pazienti affetti da epatite cronica HCV-correlata, dove TM6SF2 e da un'analisi condotta su 2023 pazienti con infezione cronica HCV, provenienti da un database internazionale di genetica nelle malattie di fegato [254,255]. L'associazione fra TM6SF2 e HCC è stata dimostrata in uno studio Europeo condotto su 480 pazienti con epatopatia HCV, dove l'allele mutato T si associava ad un incrementato rischio di HCC (OR 1.78, 95% CI 1.09-2.90) [231].

MBOAT

Il polimorfismo *rs641738* C>T è situato a livello del locus MBOAT7-TMC4 (*membrane bound O-acyltransferase domain containing 7-transmembrane channel-like 4*) nel cromosoma 19, che codifica per un enzima chiamato lisofosfatidilinositolo-aciltransferasi 1, espresso in molti tessuti incluso il fegato: tale enzima catalizza il trasferimento di acidi grassi polinsaturi, ed è implicato in meccanismi antinfiammatori attraverso la regolazione dei livelli di acido arachidonico nei granulociti neutrofili [256]. L'allele T *rs641738* determina una riduzione dell'espressione dell'enzima, causando un'alterazione del normale rapporto fra i diversi fosfatidilinositoli a livello epatico, che predispone allo sviluppo di steatosi. L'associazione fra MBOAT7 e la steatosi epatica è stata

dimostrata in più di 3.800 pazienti Americani e 1149 Europei, dove rappresentava inoltre un fattore di rischio indipendente di sviluppo di fibrosi [257]. In 1.121 pazienti non cirrotici con infezione HCV ed epatopatia alcolica, la presenza dell'allele mutato T si è dimostrato indipendentemente associato al rischio di HCC in uno studio condotto da un gruppo Italiano (OR 1.93, 1.07-3.58) [258].

Altri SNPs

La variante EGF *rs4444903* è stata identificata come fattore di rischio per HCC in pazienti Caucasici e Asiatici con fibrosi epatica avanzata ed epatopatia prevalentemente virale [259,260]. Molti studi si sono inoltre concentrati sul valutare una potenziale associazione fra HCC e lo SNP *rs12979860* di IL28B, già identificato come più forte predittore di guarigione da HCV spontanea o IFN-mediata. Sebbene un ruolo di IL28B nella storia naturale dell'infezione HCV sia stato escluso da alcuni studi, altri hanno suggerito una potenziale associazione di IL28B con lo sviluppo di HCC [261,262].

Da ultimo, la variante *Tolloid like 1 gene (TLL1) rs17047200* è stata associata allo sviluppo di HCC post-eradicazione virale in uno studio GWAS condotto su pazienti HCV Giapponesi sottoposti a trattamento con IFN; tuttavia, un successivo studio non ha riconfermato gli stessi dati nel modello dei pazienti con cirrosi guariti dopo trattamento basato su DAA [263,264].

RAZIONALE DELLO STUDIO

Lo sviluppo dei farmaci antivirali diretti ha rivoluzionato il trattamento dell'infezione cronica da HCV, permettendo di raggiungere tassi di guarigione virologica superiori al 95%. Inoltre, il miglioramento del profilo di sicurezza delle molecole ha permesso di estendere il trattamento a quelle categorie di pazienti con precedente controindicazione all'utilizzo di IFN. Nonostante l'eradicazione virale si traduca in un sostanziale cambiamento della storia naturale dell'infezione HCV, grazie alla riduzione dell'incidenza di complicanze fegato-correlate, i pazienti che hanno già sviluppato la cirrosi prima della guarigione virologica rimangono a rischio di HCC. Di conseguenza, le linee guida internazionali raccomandano la prosecuzione della sorveglianza per lo screening e la diagnosi precoce di HCC mediante ecografia addome a cadenza semestrale in tutti i pazienti con diagnosi di cirrosi pre-trattamento, per un tempo attualmente indeterminato [151]. Tale strategia di sorveglianza universale può, tuttavia, determinare elevati costi sanitari, pertanto molti studi hanno cercato di identificare predittori di HCC nei pazienti cirrotici HCV guariti, con lo scopo di ottenere una migliore stratificazione del rischio e sviluppare programmi di sorveglianza individualizzata.

In aggiunta ai predittori clinici come età, sesso, co-fattori metabolici (diabete), epatopatia più avanzata al momento della guarigione, negli ultimi anni numerosi studi si sono concentrati nell'identificare anche predittori genetici associati all'insorgenza di HCC. Numerosi polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) hanno dimostrato associazione con lo sviluppo di HCC specialmente nel modello del paziente HCV viremico e in altre epatopatie, soprattutto l'epatopatia metabolica.

Fra gli SNPs identificati, PNPLA3 *rs738409*, MBOAT7 *rs641738* e TM6SF2 *rs5842926* hanno dimostrato le più forti evidenze circa l'associazione con HCC; inoltre queste varianti hanno anche una plausibilità biologica, in quanto i prodotti genici da esse codificati sono coinvolti nella regolazione del contenuto di grasso epatico e proprio i co-fattori metabolici sono forti predittori clinici di HCC. Tuttavia, la maggior parte degli studi è stata condotta nel modello del paziente HCV viremico o guarito con IFN, pertanto i dati nel paziente cirrotico guarito dopo trattamento con DAA sono attualmente mancanti. Inoltre, la principale limitazione degli studi genetici si basa sulla scarsa potenza di un modello a singolo gene di predire un evento complesso come l'HCC. Un recente studio ha dimostrato che la combinazione di più SNPs in uno score genetico di rischio (GRS), basato su quattro geni (PNPLA3, MBOAT7, TM6SF2, GCKR) è associata con la severità del contenuto di grasso epatico (steatosi) e con la fibrosi in pazienti con epatopatia metabolica [265]; non è tuttavia noto il suo ruolo in altre epatopatie o la potenziale associazione con altri *outcomes* clinici differenti dalla fibrosi, come l'HCC. Pertanto, scopo dello studio è stato quello di valutare l'associazione fra GRS e rischio HCC in un'ampia coorte di pazienti con cirrosi HCV sottoposti a trattamento con DAA.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Lo studio ha retrospettivamente incluso in modo consecutivo tutti i pazienti con cirrosi HCV che hanno iniziato un trattamento antivirale con DAA fra Dicembre 2014 e Dicembre 2016 in un singolo Centro epatologico. I principali criteri di esclusione erano rappresentati dalla co-infezione HIV, dalla presenza di HCC attivo o di noduli epatici atipici/non caratterizzabili all'inizio del trattamento antivirale, come precedentemente descritto [213]. La presenza di cirrosi è stata diagnosticata istologicamente (stadio Metavir F4 alla biopsia epatica), oppure mediante metodiche non invasive, tramite l'elastografia transiente (TE, Fibroscan®), con un cut-off di *stiffness* epatica ≥ 12.0 kPa per la definizione di cirrosi. I pazienti hanno prestato il consenso alla partecipazione allo studio e all'analisi genetica, così come alla raccolta di dati clinici e demografici per lo studio, che si conformava alle linee guida etiche della Dichiarazione di Helsinki del 1975.

Efficacia del trattamento antivirale e sorveglianza per HCC

La risposta virologica sostenuta (SVR) è stata definita come HCV-RNA non rilevabile 12 settimane dopo il termine del trattamento, secondo una metodica PCR ad elevata sensibilità (Abbott-RT PCR, limite minimo di detettabilità 12 IU/mL).

La sorveglianza per HCC veniva effettuata mediante esecuzione di ecografia addominale con cadenza semestrale nei pazienti senza storia precedente di HCC. Nei pazienti con anamnesi positiva per HCC, la sorveglianza veniva effettuata

mediante ecografia semestrale nei pazienti che avevano ottenuto una risposta completa (RC) al precedente trattamento per HCC da più di 2 anni; nei pazienti con una risposta completa per una durata inferiore a 2 anni è stata invece eseguita una TC addome con cadenza trimestrale. L'HCC è stato diagnosticato, stadiato e gestito in accordo con le raccomandazioni internazionali [151].

Analisi genetica

L'estrazione del DNA da sangue fresco o congelato, anticoagulato con EDTA, è stata eseguita con il kit QIAamp DNA Blood (Qiagen, Mainz, Germany) a partire da 200 µl di campione. Per la genotipizzazione dei polimorfismi dei geni è stata utilizzata la metodica TaqMan Genotyping (ABI prism StepOne Plus Real-Time PCR system, Applied Biosystems, Foster City, CA). Questa tecnica si basa sui principi della Real-Time PCR, con l'aggiunta di sequenze specifiche complementari al frammento di DNA in cui è contenuto lo SNP oggetto di studio, abbinata a relative sonde. Lo SNP Genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) contiene i due primers (Forward e Reverse) e le due sonde specifiche per ogni allele, una marcata al 5' con il fluoroforo FAM e l'altra marcata con il fluoroforo VIC.

Lo score GRS è stato calcolato a partire dai singoli genotipi, come precedentemente descritto [265].

Analisi statistica

Le variabili categoriche sono state riportate come percentuali e le variabili continue con mediana (range). Le variabili categoriche sono state analizzate con

il test χ^2 o Fisher; le variabili continue sono state analizzate usando il test t di Student, il Mann-Whitney o il test Kruskal-Wallis, ove appropriato. Tutti i test sono stati condotti a due code e con livello di significatività statistica 0.05. Per analizzare l'associazione fra *outcomes* e variabili multiple è stata utilizzata la regressione logistica.

Il cut-off ottimale dello score GRS per la diagnosi di HCC è stato calcolato mediante l'analisi della curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). L'area sotto la curva (AUROC) e gli intervalli di confidenza (CI) sono stati calcolati secondo assunzione non-parametrica. L'analisi statistica è stata eseguita con il pacchetto StataView (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RISULTATI

Pazienti

Fra Dicembre 2014 e Dicembre 2016 sono stati consecutivamente arruolati 565 pazienti con cirrosi HCV sottoposti a trattamento con DAA; 56 non hanno prestato il consenso per l'analisi genetica, pertanto l'analisi finale ha riguardato 509 pazienti. Le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione dello studio sono riportate nella **Tabella 1**. I pazienti erano in prevalenza maschi (58%), l'età media era di 64 (28-87) anni, il body mass index (BMI) mediano era di 25 (16-40) Kg/m², 99 (20%) pazienti avevano un diabete di tipo 2. Il genotipo HCV era 1b in 254 (50%), il livello mediano di transaminasi ALT al basale (inizio terapia antivirale) era di 71 (8-770) U/L, il valore di *stiffness* epatica mediano (Liver Stiffness Measurement, LSM) era di 19.4 kPa (12.0-75.0); lo score di Child-Pugh-Turcotte (CPT) era A in 442 (87%) pazienti, 57 (11%) pazienti avevano una precedente storia di HCC.

L'allele sfavorevole G per PNPLA3 e T per MBOAT7, TM6SF2 e GCKR erano presenti in 275 (54%), 363 (71%), 46 (9%) e 380 (75%) pazienti, rispettivamente (Hardy Weinberg equilibrium $p>0.05$). Le caratteristiche cliniche e biochimiche dei pazienti non differivano in modo significativo a seconda dei genotipi dei quattro SNPs analizzati, salvo un livello più elevato di alfa-fetoproteina (AFP) e INR (International Standardized Ratio) nei pazienti PNPLA3 CC rispetto ai CT/TT e una maggiore prevalenza di genotipo 1b nei pazienti con genotipo GCKR CC rispetto ai CT/TT. D'altra parte, i pazienti con genotipo GCKR CT/TT presentavano un BMI e un livello di creatinina sierica più elevato rispetto ai

pazienti genotipo CC (**Tabella Supplementare 1**). Lo score GRS mediano della popolazione risultava 0.3 (0-1.1).

Efficacia del trattamento antivirale

Dopo il trattamento antivirale, 491 (96%) pazienti hanno raggiunto la SVR, 10 (2%) hanno presentato un *relapse* virologico e 8 (1.6%) sono stati persi al follow-up prima di raggiungere l'accertamento della SVR. L'efficacia del trattamento antivirale risultata indipendente dai genotipi dei quattro SNPs: infatti, l'SVR è stata raggiunta da 228/234 (97%) pazienti genotipo CC per PNPLA3 CC vs. 263/275 (96%) pazienti con genotipo CG/GG ($p=0.33$). Per quanto concerne gli altri genotipi, l'SVR è stata ottenuta rispettivamente da 139/146 (95%) pazienti genotipo CC per MBOAT7 vs. 352/363 (97%) CT/TT ($p=0.42$); 447/463 (96%) TM6SF2 CC vs. 44/46 (96%) CT/TT ($p=0.67$); 122/129 (95%) GCKR CC vs. 369/380 (97%) CT/TT ($p=0.18$).

Incidenza di HCC e caratteristiche del tumore nella popolazione generale

Durante un follow-up mediano di 43 (3-57) mesi dopo l'inizio della terapia antivirale, 64 (13%) su 509 pazienti hanno sviluppato un HCC, con un'incidenza cumulativa a 4 anni del 13% (95% CI 11-17%); 36 pazienti non avevano una storia precedente di HCC (HCC de novo), mentre 28 pazienti hanno avuto una recidiva di un HCC precedentemente trattato con risposta completa (HCC ricorrente). I tassi cumulativi di incidenza di HCC a 4 anni erano rispettivamente del 9% (95% CI 7-12%) per l'HCC de novo e del 49% (95% CI 27-63%) per la ricorrenza di HCC (**Figura 1**).

Alla diagnosi, il diametro mediano dell'HCC era di 17 (10-100) mm, il tumore si presentava come singolo nodulo in 42 (66%), pazienti, lo score di CPT era A in 56 (88%) e il valore mediano di AFP era 6 (1-41,013) ng/mL. I pazienti sono stati sottoposti a trattamenti curativi (trapianto di fegato, resezione o termoablazione) nel 72% dei casi (**Tabella 2**). I tassi di SVR risultavano simili nei pazienti con o senza sviluppo di HCC post-terapia antivirale (95% vs. 96%, $p=0.49$).

Analizzando la distribuzione dei genotipi dei quattro SNPs sulla base dello sviluppo di HCC, i pazienti non presentavano significative differenze in termini di frequenze alleliche di MBOAT7, TM6SF2 e GCKR, mentre il genotipo PNPLA3 CC era più rappresentato nei pazienti con sviluppo di HCC (**Tabella 3**), a causa di una differenza nei pochi pazienti con HCC ricorrente. Al contrario, le principali caratteristiche del tumore (numero di noduli, livelli di AFP, stadio) non differivano sulla base dei quattro SNPs analizzati (**Tabella Supplementare 2**), salvo una lieve prevalenza di tumori con localizzazione extraepatica nei pazienti di genotipo MBOAT7 CC vs. CT/TT. Globalmente, tuttavia, i tassi di incidenza di HCC erano indipendenti dal genotipo dei 4 SNPs; infatti, i tassi di incidenza a 4 anni di HCC risultavano 18% nei pazienti genotipo CC per PNPLA3 vs. 11% nei pazienti di genotipo CG/GG ($p=0.05$); 17% nei pazienti MBOAT7 CC vs. 13% nei CT/TT ($p=0.41$); 13% nei pazienti TM6SF2 CC vs. 17% nei CT/TT ($p=0.97$); 13% nei pazienti GCKR CC vs. 14% nei CT/TT ($p=0.89$) (**Figura Supplementare 1A-D**).

All'analisi della curva ROC, i *cut-off* di score GRS che dimostravano la migliore performance diagnostica per HCC risultavano $GRS > 0.6$ per i pazienti con HCC de novo [Sensibilità (Sn) 25%, Specificità (Sp) 88%, Likelihood Ratio positivo

(LR+) 2.2, Likelihood Ratio negativo (LR-) 0.8, AUROC 0.52 (95% CI 0.47-0.56)] e GRS<0.191 per la ricorrenza di HCC [Sn 64%, Sp 72%, LR+ 2.3, LR- 0.5, AUROC 0.67 (95% CI 0.53-0.78)].

HCC de novo: predittori clinici e genetici

All'analisi univariata, l'insorgenza di HCC de novo era associata con il sesso maschile, la presenza di diabete, i valori di GGT al basale (inizio terapia antivirale), i valori di albumina, lo score CPT, i valori basali di LSM e con un GRS >0.6.

All'analisi multivariata, solo il sesso maschile (HR 2.54, 95% CI 1.15-5.63; p=0.02), il diabete (HR 2.39, 95% CI 1.20-4.74; p=0.01), i valori di albumina (HR 0.35, 95% CI 0.19-0.64; p=0.001) e un GRS >0.6 (HR 2.30, 95% CI 1.03-5.11; p=0.04) risultavano fattori indipendenti per lo sviluppo di HCC de novo (**Tabella 4**). Infatti, i tassi di incidenza cumulativi di HCC a 4 anni risultavano rispettivamente del 6% (95% CI 1-10%) vs. 12% (95% CI 8-16%) nei pazienti di sesso maschile rispetto al sesso femminile (p=0.01); 17% (95% CI 9-24%) vs. 7% (95% CI 5-10%) nei pazienti diabetici rispetto ai non diabetici (p=0.001); 21% (95% CI 10-34%) vs. 7% (95% CI 4-11%) nei pazienti con albumina rispettivamente \leq o >3.5 g/dl (p<0.001). Per quanto riguarda lo score GRS, i tassi di incidenza cumulativa di HCC risultavano del 16% (95% CI 8-28%) nei pazienti con score GRS >0.6 rispetto a 7% (95% CI 5-11%) nei pazienti con score GRS \leq 0.6 (p=0.01) (**Figure 2A-D**). Combinando i fattori di rischio indipendenti di HCC, l'incidenza cumulativa di HCC a 4 anni risultava del 20% (95% CI 12-28%) nei pazienti con almeno due fattori di rischio associati rispetto al 5% (95% CI 3-7%)

nei pazienti con meno di due fattori di rischio ($p < 0.0001$). Valutando invece la presenza di tre fattori di rischio contemporanei, le figure corrispondenti erano 80% (95% CI 43-100%) vs. 8% (95% CI 6-11%) ($p < 0.0001$), mentre l'esiguità del numero di pazienti con quattro fattori di rischio contemporanei ($n=2$) non rendeva possibile un'ulteriore sottoanalisi (**Figure 3A-B**).

HCC ricorrente: predittori clinici e genetici

Analizzando i pazienti con HCC ricorrente, il BMI, la presenza di diabete e il genotipo di PNPLA3 risultavano significativamente associati alla ricorrenza di HCC, mentre alla analisi multivariata il diabete rimaneva l'unico predittore indipendente (HR 2.77, 95% CI 1.15-6.67; $p=0.02$) (**Tabella 5**). L'incidenza cumulativa di HCC a 4 anni risultava infatti 88% (95% CI 64-100%) nei pazienti diabetici vs. 40% (95% CI 25-55%) nei pazienti non diabetici ($p=0.002$). (**Figura 4**).

DISCUSSIONE

Questo studio monocentrico, retrospettivo, longitudinale ha valutato il ruolo di fattori genetici nel determinare il rischio di insorgenza di HCC in un'ampia coorte di 509 pazienti con cirrosi HCV, arruolati consecutivamente e sottoposti a terapia antivirale con DAA con un lungo follow-up post trattamento. La combinazione di quattro polimorfismi (SNPs) in uno score genetico risultava un fattore indipendente associato all'insorgenza di HCC de novo, insieme a predittori clinici (diabete, sesso maschile, valori di albumina pre-trattamento). Per quanto riguarda invece il rischio di ricorrenza di HCC in pazienti con una pregressa storia tumorale pre-trattamento antivirale, l'unico fattore indipendente associato alla recidiva di HCC post-terapia era il diabete, mentre i fattori genetici non risultavano significativi.

A nostra conoscenza, si tratta del primo studio che abbia cercato di valutare il ruolo di fattori genetici come predittori di HCC post guarigione virologica, sia singolarmente che combinati in uno score, al fine di migliorare la stratificazione del rischio di insorgenza di tumore nella popolazione dei pazienti cirrotici HCV con eradicazione virale. L'analisi è stata eseguita separatamente per i pazienti con HCC de novo o ricorrente, in quanto rappresentano due sottopopolazioni diverse per storia di tumore e rischio di insorgenza di HCC.

Per quanto riguarda i pazienti con HCC de novo, i predittori clinici emersi all'analisi multivariata come fattori indipendentemente associati all'insorgenza di tumore (diabete, sesso maschile e valori di albumina pre-terapia) sono in linea con le principali variabili associate all'HCC post-SVR emerse in letteratura. In particolare, il sesso maschile è da sempre stato associato allo sviluppo di

epatopatia più avanzata e alle sue complicanze, a partire dagli studi condotti nell'ambito della storia naturale dell'infezione HCV [61]. I livelli di albumina, invece, sono stati associati all'insorgenza di HCC de novo in un recente studio multicentrico italiano, che ha arruolato 2.249 pazienti con cirrosi HCV trattati con DAA. I bassi valori di albumina, insieme alla ridotta conta piastrinica, che emergeva come altro predittore indipendente di HCC nello stesso studio, sono un indicatore di epatopatia più evoluta, a significare che il rischio di HCC de novo è aumentato nei pazienti che guariscono dall'infezione HCV avendo sviluppato gradi più severi di epatopatia [215]. L'epatopatia più avanzata al basale, indicata sia da una ridotta conta piastrinica, da un più elevato valore di *stiffness* epatica o dalla presenza di ipertensione portale, emerge in tutti gli studi con DAA come fattore chiave condizionante il rischio di HCC post guarigione virologica [204, 214, 266]. Infine, il diabete era già emerso come determinante di HCC post guarigione virologica negli studi condotti in epoca di terapie antivirali basate su IFN [171,203], riconfermandosi anche nelle casistiche di pazienti trattati con DAA [213]. Considerando non esclusivamente il diabete, ma i co-fattori metabolici in senso lato, non è un caso che uno studio francese, condotto su 1.270 pazienti con cirrosi HCV sottoposti a terapia antivirale, abbia identificato la variabile GGT come predittore indipendente di HCC; è noto infatti come la GGT rappresenti un indicatore indiretto di sindrome metabolica, sovrappeso, sebbene un potenziale contributo del consumo alcolico non sia escludibile [214]. Il BMI come espressione dei co-fattori metabolici è stato inoltre incluso in un recente modello sviluppato nella popolazione dei Veterani Americani per determinare il rischio di HCC post-SVR [219]. Nell'ambito dei co-fattori metabolici si iscrive

il contributo degli SNPs componenti lo score genetico risultato nel nostro studio un predittore indipendente di HCC de novo: infatti, gli SNPs maggiormente rappresentati nello score (PNPLA3, MBOAT7 e TM6SF2) sono noti in letteratura come determinanti genetici di steatosi epatica, soprattutto PNPLA3, di cui è stato ampiamente caratterizzato il meccanismo alla base dell'accumulo di trigliceridi [220-230;244-252;256-257]. Gli stessi SNPs sono inoltre emersi come fattori di rischio per HCC sia nel modello dell'epatopatia metabolica-alcolica, sia nei pazienti con infezione cronica da HCV [231;233;241-243;258], mentre ad oggi non mai stati valutati nel modello del paziente con guarigione virologica. Nel nostro studio, i pazienti portatori dell'allele mutato per i diversi SNPs non differivano in termini delle principali caratteristiche cliniche connesse ai fattori metabolici, come prevalenza di diabete, valori di GGT e BMI, tranne unicamente per quanto riguarda un incremento del BMI nei pazienti CT/TT per GCKR rispetto ai pazienti con genotipo *wild-type*. A seguito del fatto che la maggior parte delle diagnosi di cirrosi nella nostra popolazione è stata ottenuta mediante metodiche non invasive, non è stato possibile procedere ad un'analisi dettagliata della severità della steatosi nei pazienti portatori di mutazioni degli SNPs valutati. Combinando lo score genetico di rischio insieme alle variabili cliniche, la contemporanea presenza di soli due fattori di rischio per HCC risultava in un'incidenza cumulativa di HCC de novo 4 volte superiore rispetto ai pazienti con <2 fattori di rischio (20% vs. 5% a 4 anni). Questo si traduce un'incidenza di HCC approssimativamente del 5% per anno nei pazienti ad alto rischio, più del doppio del 2-3% riportato in letteratura per il paziente cirrotico SVR [211-215]. Di conseguenza, la combinazione dei fattori genetici e clinici potrebbe permettere

di identificare una popolazione di cirrotici ad alto rischio, potenzialmente candidabili ad un programma di sorveglianza per HCC individualizzato.

Per quanto riguarda la sottopopolazione dei pazienti con HCC ricorrente, lo studio non ha permesso di rilevare alcuna associazione con fattori genetici, mentre il diabete rimaneva l'unica variabile significativamente associata con HCC. Questi risultati potrebbero comunque essere condizionati dallo scarso numero di HCC ricorrenti all'interno della popolazione studiata, pertanto un eventuale ruolo dei fattori genetici nei pazienti con pregressa storia di HCC andrà valutato su più ampi numeri.

I punti di forza del presente studio sono costituiti dall'ampia popolazione studiata, arruolata consecutivamente in un singolo centro epatologico e con un lungo follow-up disponibile (mediana 37 mesi). Inoltre, l'arruolamento in un singolo centro ha permesso di avere a disposizione un'ampia caratterizzazione delle variabili cliniche e demografiche della popolazione studiata, così come di valutare in un ampio follow-up l'insorgenza di eventi clinici.

Per quanto riguarda i limiti dello studio, l'arruolamento di una popolazione di pazienti cirrotici, prevalentemente con malattia compensata (CPT score A), potrebbe aver determinato il ridotto numero di eventi HCC osservati nel follow-up, in quanto i pazienti con epatopatia scompensata (CPT B-C) costituiscono una sottopopolazione a più elevato rischio di HCC. Tuttavia, per le norme di rimborsabilità dei farmaci antivirali in Italia, i pazienti con cirrosi scompensata CPT score C non erano trattabili con DAA a meno di essere inclusi in lista per trapianto di fegato. I limitati numeri dei pazienti con pregressa storia di HCC potrebbero inoltre giustificare l'assenza di associazioni rilevate con le variabili

genetiche. Inoltre, i *cut-off* determinati per l'associazione con HCC nel presente studio derivano dall'analisi della curva ROC all'interno della nostra popolazione, pertanto richiedono ulteriori validazioni esterne in altre coorti.

In conclusione, in un'ampia popolazione di pazienti con cirrosi HCV sottoposti a trattamento con DAA, il nostro studio ha identificato uno score genetico basato su quattro SNPs (PNPLA3, MBOAT7, TM6SF2 e GCKR) come un predittore indipendente di sviluppo di HCC de novo post terapia, in aggiunta a variabili cliniche come il diabete, il sesso maschile e i ridotti livelli di albumina pre-trattamento. La combinazione di predittori clinici e genetici può permettere una migliore stratificazione del rischio di HCC nel paziente cirrotico guarito con DAA, al fine di elaborare programmi di sorveglianza individualizzata.

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei 509 pazienti inclusi nello studio

	Totale (n=509)	Non-HCC (n=452)	HCC Progresso (n=57)
Età, anni	64 (28-87)	63 (28-87)	72 (51-86)
Maschi	297 (58%)	261 (58%)	36 (63%)
BMI, Kg/m ²	25 (16-40)	25 (16-40)	25 (18-36)
Diabete	99 (20%)	90 (20%)	9 (16%)
HCV-1b	254 (50%)	214 (47%)	40 (70%)
HCV-RNA, IU/mL	589.557 (138-13.333.872)	610.666 (138-13.333.872)	407.821 (2.337-5.416.303)
ALT, U/L	71 (8-770)	74 (8-770)	59 (15-209)
GGT, U/L	70 (11-890)	71 (11-890)	67 (12-643)
Bilirubina, mg/dL	0.9 (0.2-6.3)	0.9 (0.2-6.3)	0.9 (0.3-2.7)
INR	1.1 (0.8-2.9)	1.1 (0.8-2.9)	1.1 (0.9-2.2)
Albumina, g/dL	4.1 (2.4-5.5)	4.1 (2.4-5.5)	4.1 (2.7-5.0)
Creatinina, mg/dL	0.8 (0.4-10.1)	0.8 (0.4-10.1)	0.8 (0.5-1.5)
Piastrine, x10 ³ /mL	115 (26-753)	115 (26-753)	115 (32-471)
AFP, ng/mL	10 (1-537)	9 (1-537)	10 (2-192)
CPT score A	442 (87%)	393 (87%)	49 (86%)
Varici esofagee	182 (36%)	133 (29%)	25 (44%)
LSM, kPa	19.4 (12.0-75.0)	17.4 (12.0-75.0)	21.0 (12.0-36.3)
PNPLA3 CG/GG	275 (54%)	250 (55%)	25 (44%)
MBOAT7 CT/TT	363 (71%)	325 (72%)	38 (67%)

TM6SF2 CT/TT	46 (9%)	43 (10%)	3 (5%)
GCKR CT/TT	380 (75%)	341 (75%)	39 (68%)
GRS score	0.3 (0-1.1)	0.3 (0-1.1)	0.2 (0-0.8)

BMI: body mass index; ALT: alanina aminotransferasi; GGT: gamma-glutamil transpeptidasi; INR: international standardized ratio; AFP: alfa-fetoproteina; CPT: Child-Pugh-Turcotte score; LSM: liver stiffness measurement

Tabella 2. Caratteristiche degli HCC alla diagnosi

	Totale (n=64)	HCC De Novo (n=36)	HCC Ricorrente (n=28)
Dimensioni, mm	17 (10-100)	20 (10-100)	15 (10-30)
Numero di noduli:			
1	42 (66%)	26 (72%)	16 (57%)
2	10 (16%)	5 (14%)	5 (18%)
≥3	12 (18%)	5 (14%)	7 (25%)
Localizzazione extraepatica	7 (11%)	3 (8%)	4 (14%)
CPT score A	56 (88%)	31 (86%)	25 (89%)
AFP, ng/mL	6 (1-41.013)	6 (1-9.240)	7 (2-41.013)
Trattamento			
Trapianto di Fegato	13 (20%)	8 (22%)	5 (18%)
Resezione	11 (18%)	9 (25%)	2 (7%)
Termoablazione	22 (34%)	12 (33%)	10 (35%)
Chemioembolizzazione	13 (20%)	4 (11%)	9 (32%)
Sorafenib	2 (3%)	1 (3%)	1 (4%)
Terapia di supporto	3 (5%)	2 (6%)	1 (4%)
Distribuzione Genotipi			
PNPLA3 CG/GG	27 (42%)	19 (53%)	8 (29%)
MBOAT7 CT/TT	43 (67%)	25 (69%)	18 (64%)
TM6SF2 CT/TT	6 (9%)	6 (17%)	-
GCKR CT/TT	48 (75%)	28 (78%)	20 (71%)
GCKR score	0.2 (0-1.0)	0.3 (0-1.0)	0.1 (0-0.7)

Tabella 3. Distribuzione genotipica degli SNPs rispetto allo sviluppo di HCC

	HCC no (n=445)		HCC sì (n=64)		p value
	CC	CT/TT o CG/GG	CC	CT/TT o CG/GG	
PNPLA3	197 (44%)	248 (56%)	37 (58%)	27 (42%)	0.04
MBOAT7	125 (28%)	320 (72%)	21 (33%)	43 (67%)	0.46
TM6SF2	405 (91%)	40 (9%)	58 (91%)	6 (9%)	0.82
GCKR	113 (25%)	332 (75%)	16 (25%)	48 (75%)	1.0
Score GRS, mediana	0.329 (0-0.92)		0.193 (0-1.0)		0.008

Tabella 4. Aanalisi uni e multivariata dei predittori basali di HCC de novo

Totale (n=452)	Analisi Univariata		Analisi Multivariata	
	HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
Sesso maschile	2.44 (1.16-5.12)	0.01	2.54 (1.15-5.63)	0.02
Diabete	2.92 (1.55-5.51)	0.001	2.39 (1.20-4.74)	0.01
GGT	1.00 (1.00-1.01)	0.04	-	-
Albumina	0.41 (0.23-0.71)	0.002	0.35 (0.19-0.64)	0.001
CPT score	1.50 (1.18-1.90)	0.001	-	-
LSM, kPa	1.04 (1.02-1.06)	<0.001	-	-
GRS Score >0.6	2.44 (1.14-5.20)	0.02	2.30 (1.03-5.11)	0.04

Variabili non significative all'analisi univariata: età, BMI, Genotipo HCV, ALT, bilirubina, HCV-RNA, conta piastrinica, creatinina, varici esofagee, AFP, PNPLA3 CG/GG, MBOAT CT/TT, TM6SF2 CT/TT, GCKR CT/TT

GGT: gamma-glutamyl transpeptidasi; CPT: Child-Pugh-Turcotte score; AFP: alfa-fetoproteina; LSM: liver stiffness measurement; ALT: alanina aminotransferasi

Tabella 5. Analisi univariata e multivariate dei predittori basali di HCC ricorrente

Totale (n=57)	Analisi Univariata		Analisi Multivariata	
	HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
BMI	1.10 (1.00-1.23)	0.04	-	-
Diabete	2.77 (1.15-6.67)	0.02	2.77 (1.15-6.67)	0.02
PNPLA CG/GG	0.44 (0.19-1.01)	0.05	-	-

Variabili non significative all'analisi univariata: età, sesso maschile, LSM, varici esofagee, CPT score, Genotipo HCV, HCV-RNA, ALT, GGT, bilirubina, albumina, conta piastrinica, creatinina, AFP, PNPLA3 CG/GG, MBOAT CT/TT, TM6SF2 CT/TT, GRS score

BMI: body mass index; LSM: Liver stiffness measurement; CPT: Child-Pugh-Turcotte score; ALT: alanina aminotransferasi; GGT: gamma-glutamil transpeptidasi; AFP: alfa-fetoproteina

Figura 1. Incidenza cumulativa di HCC de novo e ricorrente

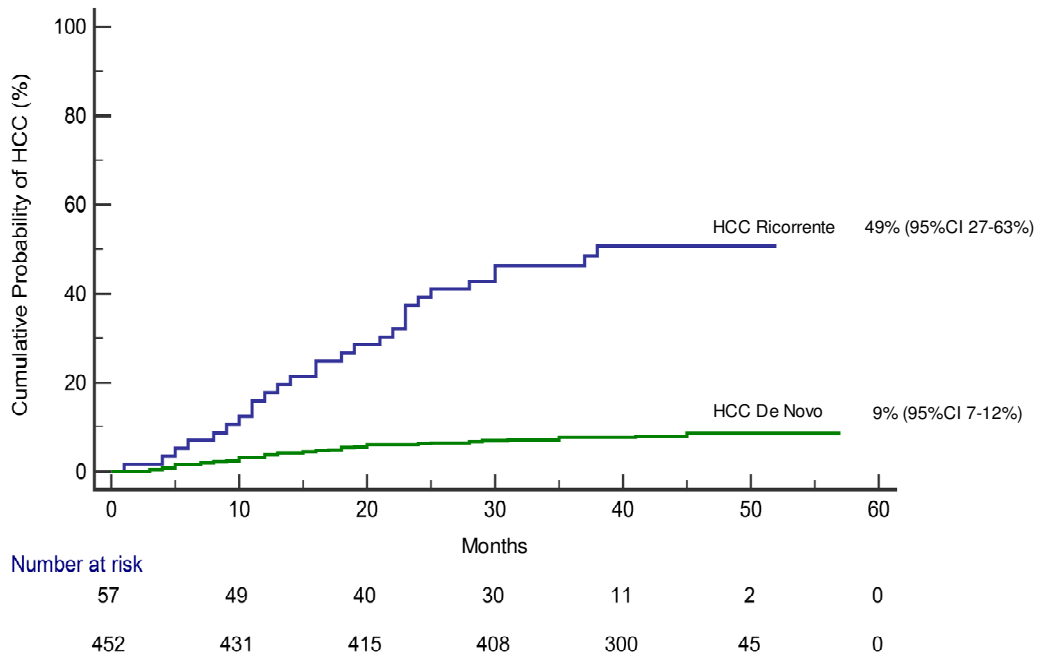
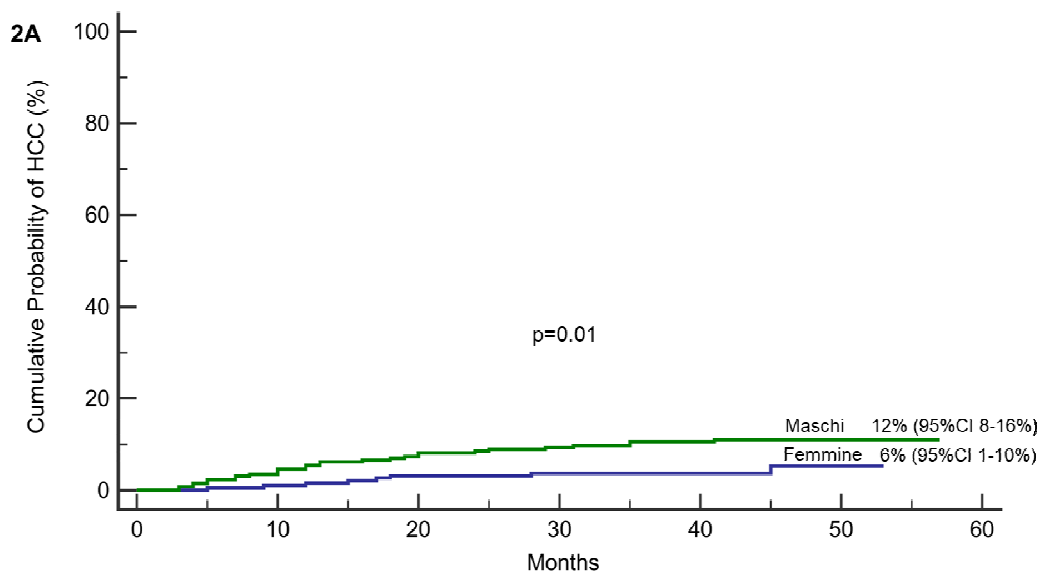


Figure 2A-D. Incidenza cumulativa di HCC de novo sulla base dei predittori indipendenti: Sesso (2A), Diabete (2B), Albumina (2C), GRS (2D)



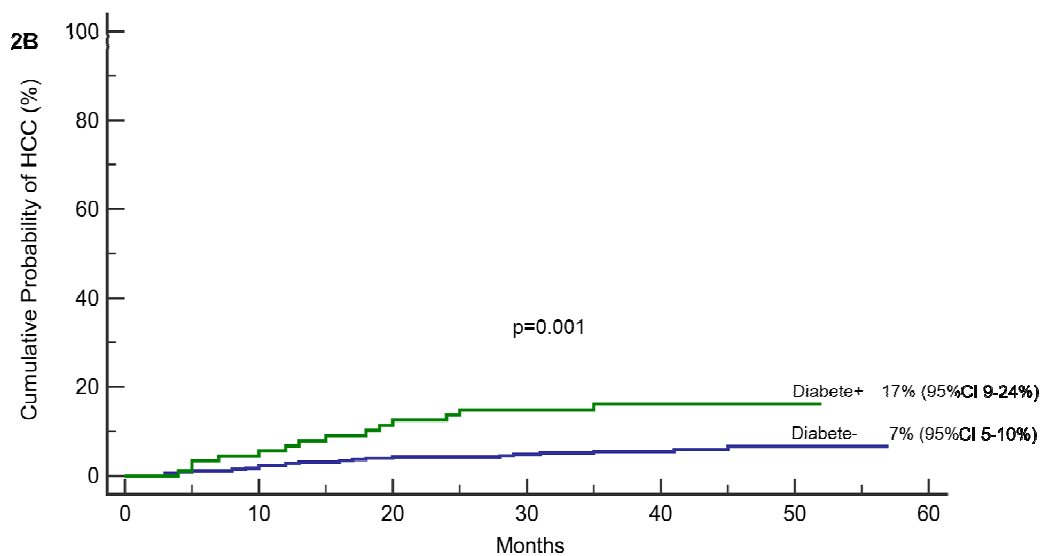
Number at risk

Female

191	185	180	178	127	13	0
-----	-----	-----	-----	-----	----	---

Male

261	246	235	230	173	32	0
-----	-----	-----	-----	-----	----	---



Number at risk

Diabetes No

356	345	337	332	242	39	0
-----	-----	-----	-----	-----	----	---

Diabetes Yes

90	83	75	73	55	6	0
----	----	----	----	----	---	---

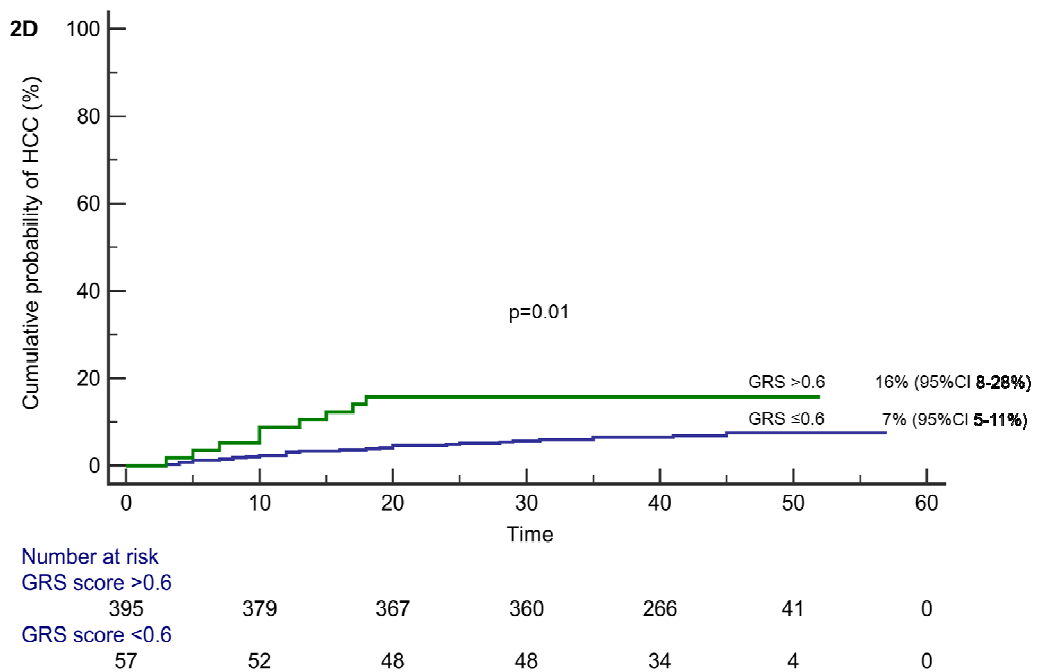
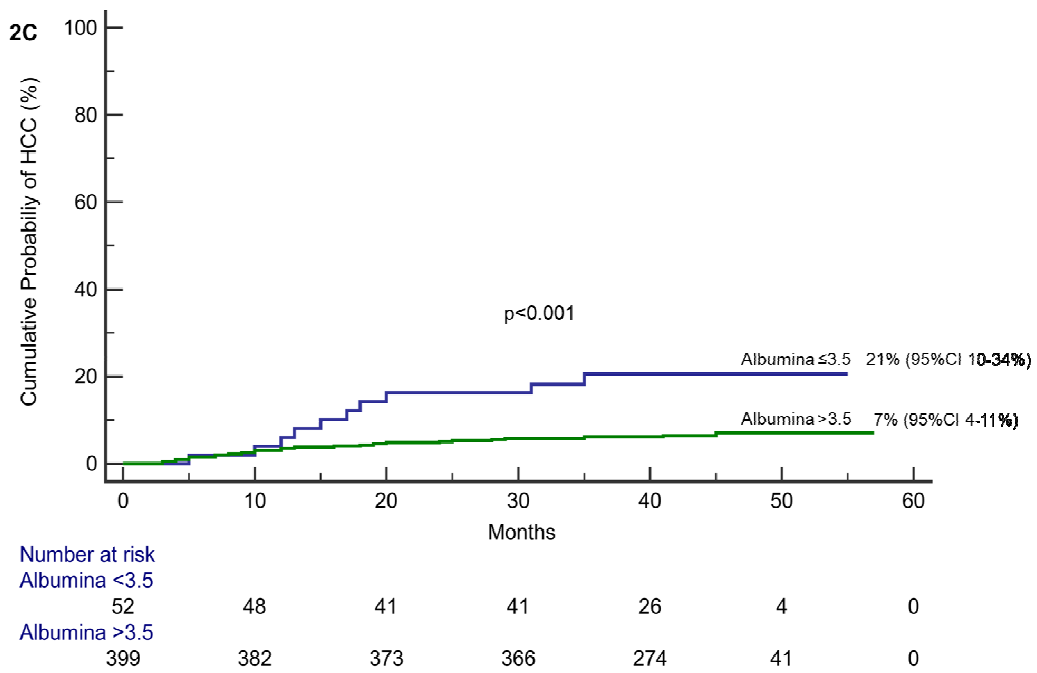
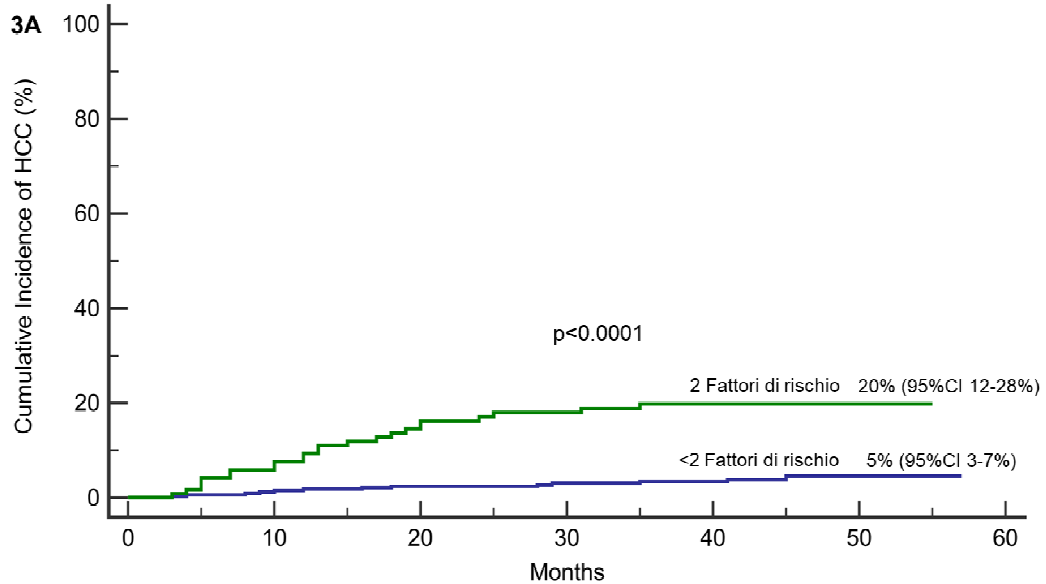


Figura 3. Incidenza cumulativa di HCC de novo sulla base della presenza di 2 (3A) o più (3B) fattori di rischio



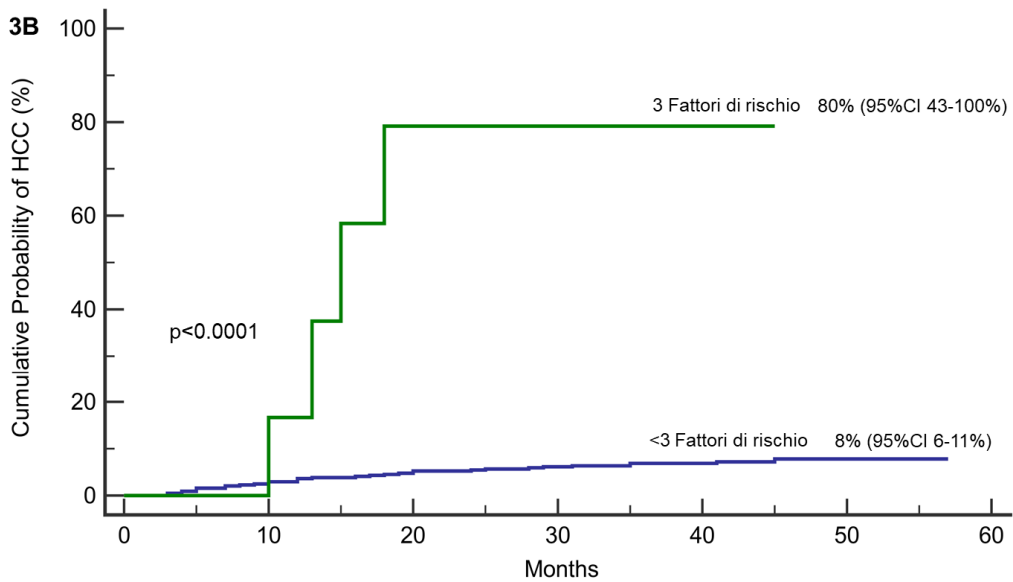
Number at risk

2 Risk Factors No

332 323 318 313 234 34 0

2 Risk Factors Yes

120 108 97 95 66 11 0



Number at risk

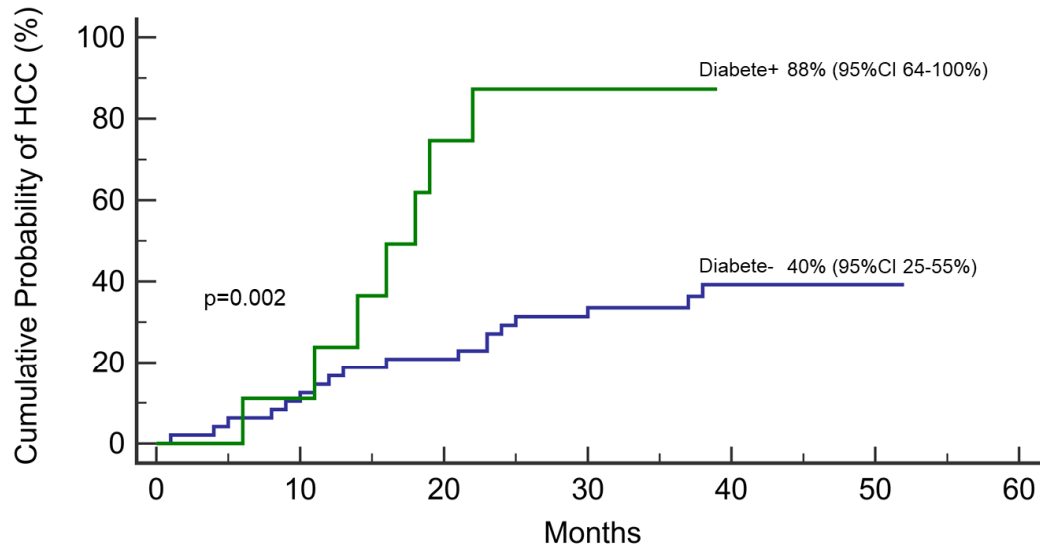
3 Risk Factors No

446 426 414 407 299 45 0

3 Risk Factors Yes

6 5 1 1 1 0 0

Figura 4. Incidenza cumulativa di HCC ricorrente in pazienti con e senza diabete



Number at risk

Diabetes No

48 42 38 29 11 2 0

Diabetes Yes

9 7 2 1 0 0 0

Tabella Supplementare 1. Caratteristiche della popolazione sulla base dei genotipi dei 4 SNPs analizzati

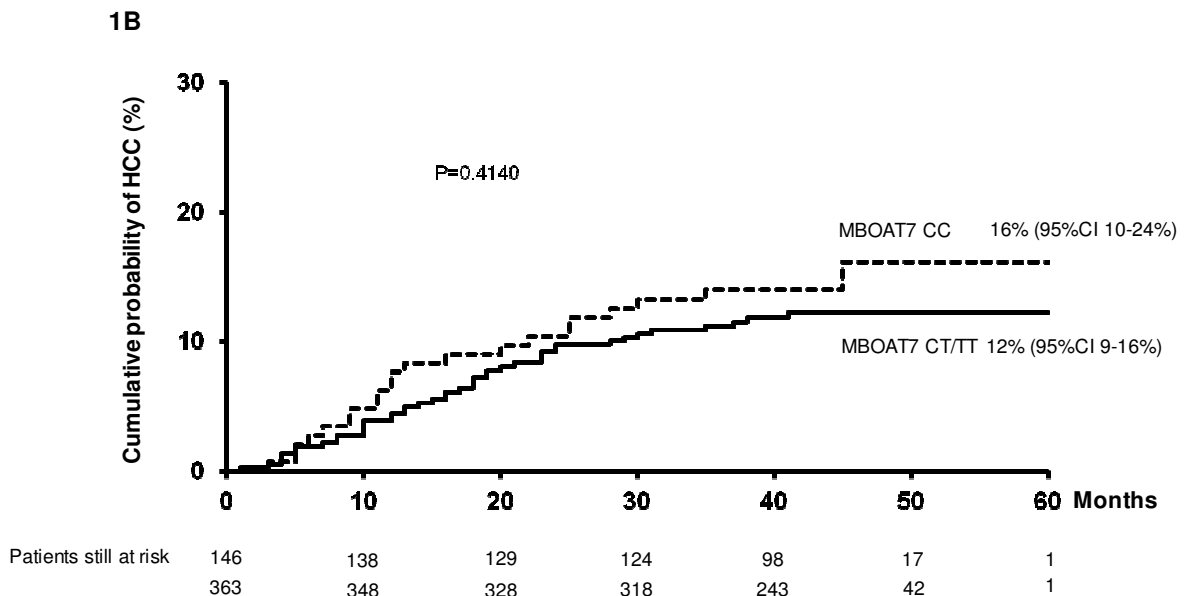
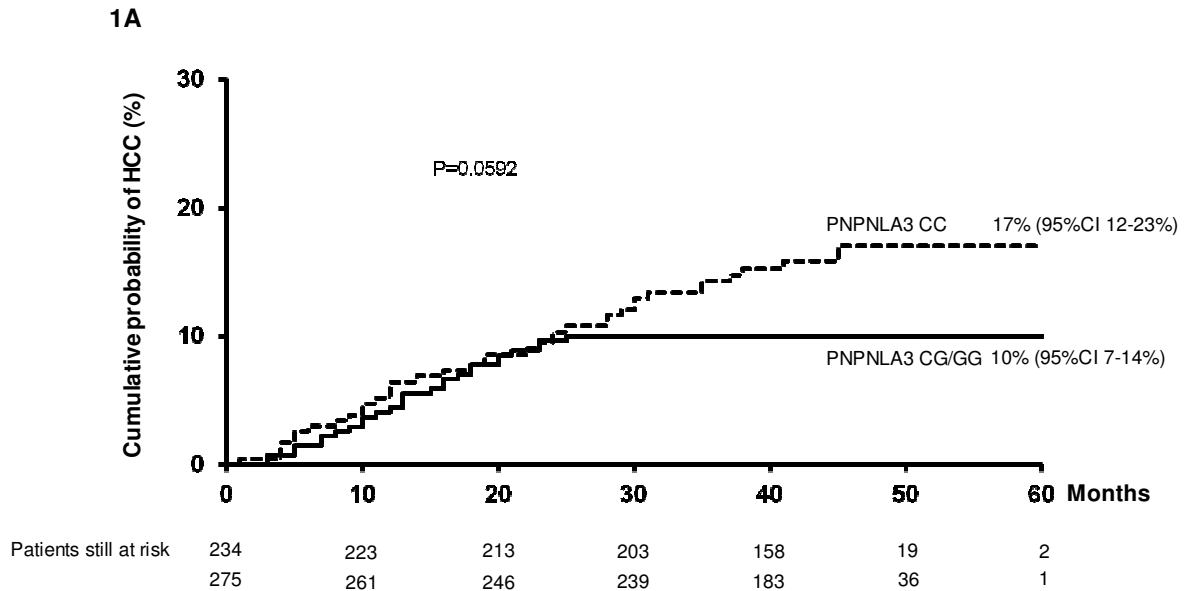
	Totale (n=509)	PNPLA3			MBOAT			TM6SF2			GCKR		
		CC (n=234)	CG/GG (n=275)	P	CC (n=146)	CT/TT (n=363)	P	CC (n=463)	CT/TT (n=46)	P	CC (n=129)	CT/TT (n=380)	P
Età, anni	64 (28-87)	64 (38-87)	66 (28-87)	0.68	66 (43-85)	63 (28-87)	0.71	65 (28-87)	60 (47-82)	0.06	63 (28-84)	65 (34-87)	0.57
Maschi	297 (58%)	137 (59%)	160 (58%)	0.93	86 (59%)	211 (58%)	0.87	272 (59%)	25 (54%)	0.56	74 (57%)	223 (59%)	0.79
BMI, Kg/m ²	25 (16-40)	25 (16-39)	25 (16-39)	0.50	25 (16-38)	25 (16-40)	0.78	25 (16-40)	25 (16-37)	0.84	24 (16-39)	25 (16-40)	0.02
Diabete	99 (20%)	42 (18%)	57 (21%)	0.72	32 (22%)	67 (19%)	0.21	94 (21%)	5 (11%)	0.21	25 (20%)	74 (20%)	0.88
HCV lb	254 (50%)	123 (53%)	131 (48%)	0.28	70 (48%)	184 (51%)	0.62	234 (51%)	20 (43%)	0.44	77 (60%)	177 (47%)	0.02
HCV-RNA, IU/mL	589.557 (138- 13.333.872)	639.319 (1334- 13.333.872)	561.037 (138- 6.522.536)	0.61	513.633 (138- 5.416.303)	623.956 (764- 13.333.872)	0.14	589.558 (138- 13.333.872)	544.441 (764- 8.961.955)	0.37	566.849 (764- 5.045.635)	603.949 (138- 13.333.872)	0.95
ALT, U/L	71 (8-770)	73 (14-770)	69 (8-337)	0.48	79 (11-770)	69 (8-328)	0.76	72 (10-770)	61 (8-210)	0.19	61 (8-272)	75 (10-770)	0.08
GGT, U/L	70 (11-890)	75 (11-890)	68 (12-696)	0.06	69 (12-890)	70 (11-696)	0.94	68 (11-890)	93 (12-303)	0.38	65 (12-643)	73 (11-890)	0.40
Bilirubina, mg/dL	0.9 (0.2-6.3)	0.9 (0.3-6.3)	0.9 (0.2-6.0)	0.97	0.9 (0.2-6.0)	0.9 (0.3-6.3)	0.84	0.9 (0.2-6.3)	0.8 (0.3-3.1)	0.19	0.8 (0.3-2.8)	0.9 (0.2-6.3)	0.23
INR	1.1 (0.8-2.9)	1.1 (0.8-2.9)	1.1 (0.9-2.7)	0.02	1.1 (0.9-2.9)	1.1 (0.8-2.9)	0.78	1.1 (0.8-2.9)	1.1 (0.9-2.9)	0.50	1.1 (0.9-2.9)	1.1 (0.8-2.9)	0.62
Albumina, g/dL	4.1 (2.4-5.5)	4.1 (2.5-5.0)	4.1 (2.4-5.5)	0.71	4.1 (2.5-5.1)	4.1 (2.4-5.5)	0.58	4.1 (2.4-5.5)	4.2 (2.7-4.9)	0.17	4.1 (2.5-5.3)	4.1 (2.4-5.5)	0.31
Creatinina, mg/dL	0.8 (0.4-10.1)	0.8 (0.4-1.5)	0.8 (0.5-10.1)	0.78	0.8 (0.4-10.1)	0.8 (0.5-1.6)	0.88	0.8 (0.4-10.1)	0.73 (0.5-1.6)	0.67	0.7 (0.5-1.6)	0.8 (0.4-10.1)	0.04
Piastri, x10 ³ /mL	115 (26-753)	120 (26-471)	111 (27-753)	0.06	118 (26-471)	113 (27-753)	0.17	115 (26-753)	116 (33-282)	0.94	118 (33-312)	115 (26-753)	0.44
AFP, ng/mL	10 (1-537)	10 (1-537)	9 (1-192)	0.04	9 (1-468)	10 (1-537)	0.18	10 (1-537)	9 (1-104)	0.56	10 (1-227)	9 (1-537)	0.91
CPT score A	442 (87%)	203 (87%)	239 (87%)	0.96	122 (84%)	320 (88%)	0.17	404 (87%)	38 (83%)	0.37	113 (88%)	329 (87%)	0.77
Varici	182 (36%)	66 (28%)	92 (33%)	0.29	44 (30%)	114 (31%)	0.39	143 (30%)	15 (32%)	0.05	41 (36%)	141 (43%)	0.31
LSM, kPa	19.4 (12.0-75.0)	18.7 (12.2-69.0)	20.9 (12.0-75.0)	0.42	19.6 (12.0-75.0)	19.4 (12.1-75.0)	0.71	19.1 (12.1-75.0)	22.5 (12.0-75.0)	0.98	20.9 (12.2-75.0)	19.1 (12.0-75.0)	0.78

Tabella Supplementare 2. Caratteristiche dei tumori sulla base dei genotipi dei 4

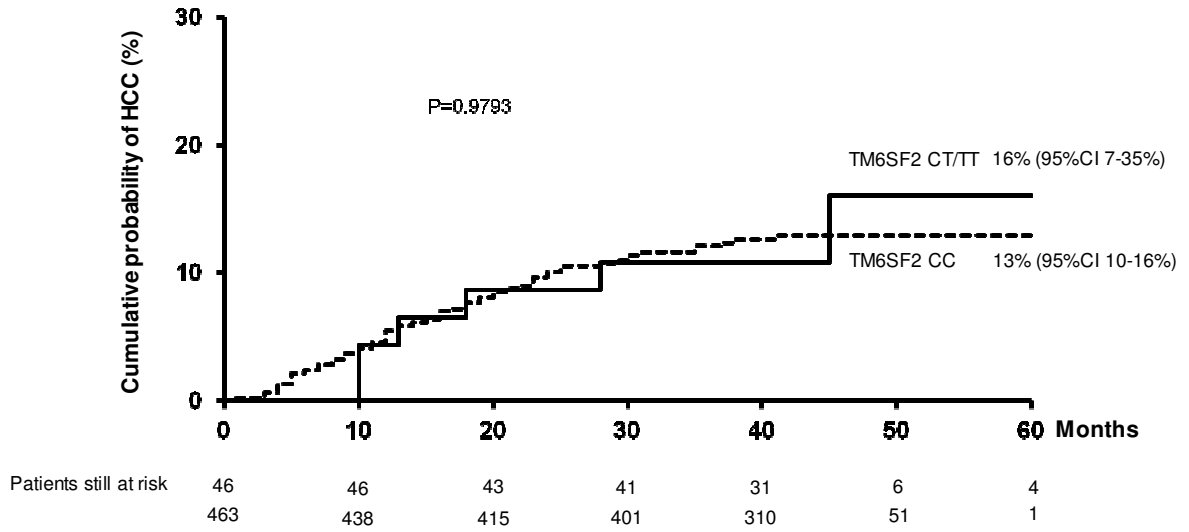
SNPs analizzati

	Totale (n=64)	PNPLA3		MBOAT		TM6SF2		GCKR		P
		CC (n=37)	CG/GG (n=27)	CC (n=21)	CT/TT (n=43)	CC (n=58)	CT/TT (n=6)	CC (n=16)	CT/TT (n=48)	
Dimensioni, mm	10 (10-100)	18 (10-33)	16 (10-100)	18 (10-45)	16 (10-100)	17 (10-100)	18 (10-33)	15 (10-43)	19 (10-100)	0.28
Numero di noduli:										0.17
1	42 (66%)	23 (62%)	19 (70%)	13 (62%)	30 (70%)	39 (67%)	4 (66%)	12 (75%)	30 (63%)	
2	10 (16%)	7 (19%)	3 (11%)	5 (24%)	5 (12%)	9 (16%)	1 (17%)	3 (19%)	8 (17%)	
≥3	12 (18%)	7 (19%)	5 (19%)	3 (14%)	8 (18%)	10 (17%)	1 (17%)	1 (6%)	10 (20%)	
Localizzazione Extraepatica	7 (11%)	5 (14%)	1 (4%)	5 (24%)	2 (5%)	6 (10%)	1 (17%)	1 (6%)	6 (13%)	0.49
CPT score A	56 (88%)	34 (92%)	22 (81%)	17 (81%)	39 (91%)	52 (89%)	4 (66%)	15 (94%)	41 (85%)	0.39
AFP, ng/mL	6 (1-41.013)	7 (2-41.013)	6 (1-3.064)	6 (2-41.013)	6 (1-9.240)	6 (1-41.013)	5 (2-151)	8 (1-1.23)	6 (2-41.013)	0.52
Trattamento										0.55
Curativo*	45 (70%)	23 (62%)	21 (78%)	12 (58%)	32 (74%)	40 (69%)	4 (66%)	11 (69%)	33 (69%)	
Chemoembolizzazione	13 (20%)	10 (27%)	4 (14%)	5 (24%)	9 (21%)	13 (22%)	1 (17%)	4 (25%)	10 (21%)	
Sorafenib	2 (3%)	1 (3%)	1 (4%)	2 (9%)	-	2 (3%)	-	1 (6%)	1 (2%)	
Terapia di Supporto	4 (7%)	3 (8%)	1 (4%)	2 (9%)	2 (5%)	3 (5%)	1 (17%)	-	4 (8%)	

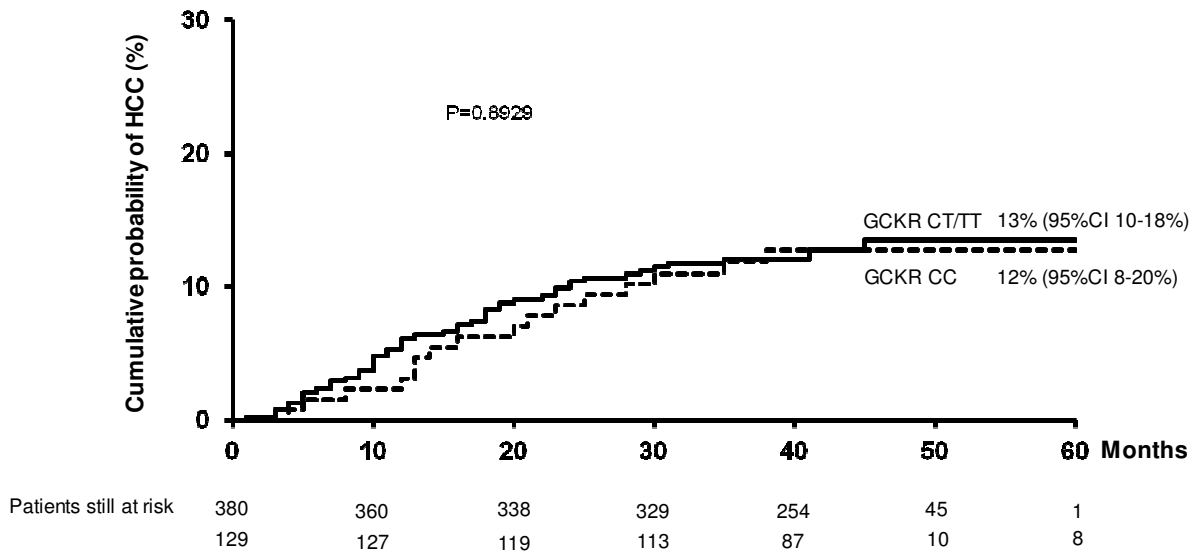
Figura Supplementare 1. Tassi di incidenza cumulativa di HCC sulla base degli SNPs di PNPLA3 (1A), MBOAT7 (1B), TM6SF2 (1C), GCKR (1D)



1C



1D



BIBLIOGRAFIA

- 1) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62
- 2) Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2057-61
- 3) Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4
- 4) Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S35-46
- 5) Gibb DM, Goodall RL, Dunn DT, et al. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet* 2000;356:904-7
- 6) Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, et al. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996;23:205-9
- 7) Thomssen R, Bonk S, Propfe C, et al. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 1992;181:293-300

- 8) Hijikata M, Shimizu YK, Kato H, et al. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* 1993;67:1953-8
- 9) Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, et al. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* 1983;41:816-21
- 10) Takamizawa A, Mori C, Fuke I, et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991;65:1105-13
- 11) Grakoui A, Wychowski C, Lin C, et al. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993;67:1385-95
- 12) Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, et al. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol* 1995;76:1749-61
- 13) Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007;132:1979–1998.
- 14) Dreux M, Pietschmann T, Granier C, et al. High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 2006;281:18285–95

- 15) Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:453–463
- 16) Bartenschlager R, Cosset F, Lohmann V. Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol* 2010;53:583-5
- 17) Ogata N, Alter HJ, Miller RH, et al. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3392-6
- 18) Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-4
- 19) Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391-9
- 20) Martell M, Esteban JI, Quer J, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992;66:3225-9
- 21) Razavi H, Waked I, Sarrazin C, et al. The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *J Viral Hepat* 2014;21:S34-59
- 22) Gower E, Estes C, Blach S, et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014;61:S45-57
- 23) Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013;57:1333-42

- 24) Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 2008;48:148-62
- 25) Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, et al. The Burden of liver disease in Europe. A review of available epidemiological data. European Association for the study of the liver (EASL)
- 26) Cozzolongo R, Osella AR, Elba S, et al. Epidemiology of HCV infection in the general population: a survey in a southern Italian town. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2740-6
- 27) Fabris P, Baldo V, Baldovin T, et al. Changing epidemiology of HCV and HBV infections in Northern Italy: a survey in the general population. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:527-32
- 28) Hajarizadeh B1, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10:553-62
- 29) ELTR. European Liver Transplantation Registry
- 30) OPTN/SRTR. Organ Procurement and Transplantation Network / U.S. Scientific Registry of Transplant Recipients
- 31) Tanaka Y, Kurbanov F, Mano S, et al. Molecular tracing of the global hepatitis C virus epidemic predicts regional patterns of hepatocellular carcinoma mortality. *Gastroenterology* 2006;130:703-14
- 32) Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26:15S-20S

- 33) Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology* 2001;33:321-7
- 34) Mosley JW, Operskalski EA, Tobler LH, et al. Viral and host factors in early hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2005;42:86-92
- 35) Cox AL, Netski DM, Mosbrugger T, et al. Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2005;40:951-8
- 36) Loomba R, Rivera MM, McBurney R, et al. The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:559-65
- 37) Deterding K, Wiegand J, Grüner N, et al. The German Hep-Net acute hepatitis C cohort: impact of viral and host factors on the initial presentation of acute hepatitis C virus infection. *Z Gastroenterol.* 2009;47:531-40
- 38) Page K, Hahn JA, Evans J, et al. Acute hepatitis C virus infection in young adult injection drug users: a prospective study of incident infection, resolution, and reinfection. *J Infect Dis.* 2009;200:1216-26
- 39) Rao HY, Sun DG, Jiang D, et al. IL28B genetic variants and gender are associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2012;19:173-81
- 40) Bakr I, Rekacewicz C, El Hosseiny M, et al. Higher clearance of hepatitis C virus infection in females compared with males. *Gut.* 2006;55:1183-7

- 41) Micallef JM1, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat.* 2006;13:34-41
- 42) Wang CC, Krantz E, Klarquist J, et al. Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: modes of acquisition and factors influencing viral clearance. *J Infect Dis* 2007;196:1474-82
- 43) Ulsenheimer A1, Lucas M, Seth NP, et al. Transient immunological control during acute hepatitis C virus infection: ex vivo analysis of helper T-cell responses. *J Viral Hepat* 2006;13:708-14
- 44) Kaplan DE, Sugimoto K, Newton K, et al. Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 2007;132:654-66
- 45) Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999;117:933-41
- 46) Li K, Foy E, Ferreon JC, et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2992-7
- 47) Cabrera R, Tu Z, Xu Y, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004;40:1062-71
- 48) Bowen DG1, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature.* 2005;436:946-52

- 49) Alter G, Jost S, Rihn S, et al. Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatol* 2011;55:278-88
- 50) Varchetta S, Mele D, Mantovani S, et al. Impaired intrahepatic natural killer cell cytotoxic function in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2012;56:841-9
- 51) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;461:399-401
- 52) Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461:798-801
- 53) Tillmann HL, Thompson AJ, Patel K, et al. A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. *Gastroenterology* 2010;139:1586-92
- 54) Grebely J, Dore GJ, Kim AY, et al. Genetics of spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a complex topic with much to learn. *Hepatology* 2014;60:2127-8
- 55) Rousselet MC, Michalak S, Dupré F, et al. Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology* 2005;41:257-264
- 56) Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-5

- 57) Ishak KG. Chronic hepatitis: morphology and nomenclature. *Mod Pathol* 1994;7:690-713
- 58) Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-93
- 59) Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:97-104
- 60) Ryder SD, Irving WL, Jones DA, et al. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut* 2004;53:451-5
- 61) Poynard T, Bedossa P, Opolon P. *Lancet*. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825-32
- 62) Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, et al. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995;332:1463-6
- 63) Yano M, Kumada H, Kage M, et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;23:1334-40
- 64) Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ. Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors. *Gastroenterology* 2008;134:1699-714
- 65) Wiese M, Grüngreiff K, Güthoff W, et al. Outcome in a hepatitis C (genotype 1b) single source outbreak in Germany--a 25-year multicenter study. *J Hepatol* 2005;43:590-8

- 66) Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med* 1999;340:1228-33
- 67) Wiese M, Berr F, Lafrenz M, et al. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology* 2000;32:91-6
- 68) Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA* 2000;284:450-6
- 69) Thein HH, Yi Q, Dore GJ, et al. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology* 2008;48:418-31
- 70) Vogt M, Lang T, Frösner G, et al. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* 1999;341:866-70
- 71) Zarski JP, Mc Hutchison J, Bronowicki JP, et al. Rate of natural disease progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003;38:307-14
- 72) Svrtlih N, Jevtovic D, Simonovic J, et al. Older age at the time of liver biopsy is the important risk factor for advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2007;54:2324-7
- 73) Wiese M, Fischer J, Löbermann M, et al. Evaluation of liver disease progression in the German hepatitis C virus (1b)-contaminated anti-D cohort at 35 years after infection. *Hepatology* 2014;59:49-57

- 74) Shimizu I, Mizobuchi Y, Yasuda M, et al. Inhibitory effect of oestradiol on activation of rat hepatic stellate cells in vivo and in vitro. *Gut* 1999;44:127-36
- 75) Yasuda M, Shimizu I, Shiba M, et al. Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. *Hepatology* 1999;29:719-27
- 76) Villa E, Vukotic R, Cammà C, et al. Reproductive status is associated with the severity of fibrosis in women with hepatitis C. *PLoS One* 2012;7:e44624
- 77) Di Martino V, Lebray P, Myers RP, et al. Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: long-term benefit of estrogen exposure. *Hepatology* 2004;40:1426-33
- 78) Sterling RK, Stravitz RT, Luketic VA, et al. A comparison of the spectrum of chronic hepatitis C virus between Caucasians and African Americans. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:469-73
- 79) Wiley TE, Brown J, Chan J. Hepatitis C infection in African Americans: its natural history and histological progression. *Am J Gastroenterol* 2002;97:700-6
- 80) Nguyen GC, Segev DL, Thuluvath PJ. Racial disparities in the management of hospitalized patients with cirrhosis and complications of portal hypertension: a national study. *Hepatology* 2007;45:1282-9

- 81) Kallwitz ER, Layden-Almer J, Dhamija M, et al. Ethnicity and body mass index are associated with hepatitis C presentation and progression. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:72-8
- 82) Tillmann HL, Chen DF, Trautwein C, et al. Low frequency of HLA-DRB1*11 in hepatitis C virus induced end stage liver disease. *Gut* 2001;48:714-8
- 83) Thursz M, Yallop R, Goldin R, et al. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet* 1999;354:2119-24
- 84) Asselah T, Bièche I, Laurendeau I, et al. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;129:2064-75
- 85) Patin E, Kutalik Z, Guergnon J, et al. Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from HCV infection. *Gastroenterology* 2012;143:1244-52
- 86) Rüeger S, Bochud PY, Dufour JF, et al. Impact of common risk factors of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 2015;64:1605-15
- 87) Fabris C, Falletti E, Cussigh A, et al. IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. *J Hepatol* 2011;54:716-22
- 88) Marabita F, Aghemo A, De Nicola S, et al. Genetic variation in the interleukin-28B gene is not associated with fibrosis progression in patients

- with chronic hepatitis C and known date of infection. *Hepatology* 2011;54:1127-34
- 89) Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011;53:791-9
- 90) Trépo E, Pradat P, Potthoff A, et al. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011;54:60-9
- 91) Hatzakis A, Katsoulidou A, Kaklamani E, et al. Hepatitis C virus 1b is the dominant genotype in HCV-related carcinogenesis: a case-control study. *Int J Cancer*. 1996;68:51-3
- 92) Martinot-Peignoux M, Roudot-Thoraval F, Mendel I, et al. Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. *The GEMHEP. J Viral Hepat* 1999;6:435-43
- 93) Silini E, Bottelli R, Asti M, et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a case-control study. *Gastroenterology* 1996;111:199-205
- 94) Fattovich G, Ribero ML, Pantalena M, et al. Hepatitis C virus genotypes: distribution and clinical significance in patients with cirrhosis type C seen at tertiary referral centres in Europe. *J Viral Hepat* 2001;8:206-16
- 95) Bruno S, Crosignani A, Maisonneuve P, et al. Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in

- patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study. *Hepatology* 2007;46:1350-6
- 96) Benvegnù L, Pontisso P, Cavalletto D, et al. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1997;25:211-5
- 97) Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, et al. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:730-9
- 98) Mihm S, Fayyazi A, Hartmann H, et al. Analysis of histopathological manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype. *Hepatology* 1997;25:735-9
- 99) Rumi MG, De Filippi F, Donato MF, et al. Progressive hepatic fibrosis in healthy carriers of hepatitis C virus with a transaminase breakthrough. *J Viral Hepat* 2002;9:71-4
- 100) Rumi MG, De Filippi F, La Vecchia C, et al. Hepatitis C reactivation in patients with chronic infection with genotypes 1b and 2c: a retrospective cohort study of 206 untreated patients. *Gut* 2005;54:402-6
- 101) Rubbia-Brandt L, Fabris P, Paganin S, et al. Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut*. 2004;53:406-12
- 102) Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, et al. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 1997;78:1527-31

- 103) Bochud PY, Cai T, Overbeck K, et al. Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009;51:655-66
- 104) Probst A, Dang T, Bochud M, et al. Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis. *J Viral Hepat* 2011;18:745-59
- 105) Hui CK, Belaye T, Montegrando K, et al. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-7
- 106) Mathurin P, Moussalli J, Cadranel JF, et al. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology* 1998;27:868-72
- 107) Puoti C, Castellacci R, Montagnese F, et al. Histological and virological features and follow-up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels: the Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). *J Hepatol* 2002;37:117-23
- 108) Shiffman ML, Diago M, Tran A, et al. Chronic hepatitis C in patients with persistently normal alanine transaminase levels. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:645-52
- 109) European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2017;67:370-398

- 110) Aghemo A, Colombo M. Treatment of patients with dual hepatitis B and C: a step in the right direction. *Gut*. 2014;63:380-1
- 111) Fattovich G, Tagger A, Brollo L, et al. Hepatitis C virus infection in chronic hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1991;163:400-2
- 112) Crespo J, Lozano JL, de la Cruz F, et al. Prevalence and significance of hepatitis C viremia in chronic active hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1147-51
- 113) Zarski JP, Bohn B, Bastie A, et al. Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J Hepatol* 1998;28:27-33
- 114) Viganò M, Aghemo A, Iavarone M, et al. The course of inactive hepatitis B in hepatitis-C-coinfected patients treated with interferon and ribavirin. *Antivir Ther* 2009;14:789-96
- 115) Caccamo G, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection. *World J Gastroenterol* 2014;20:14559-67
- 116) Cho LY, Yang JJ, Ko KP, et al. Coinfection of hepatitis B and C viruses and risk of hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2011;128:176-84
- 117) Thein HH, Yi Q, Dore GJ, et al. Natural history of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals and the impact of HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. *AIDS* 2008;22:1979-91

- 118) Martin-Carbonero L, de Ledinghen V, Moreno A, et al. Liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C and persistently normal liver enzymes: influence of HIV infection. *J Viral Hepat* 2009;16:790-58
- 119) Graham CS, Baden LR, Yu E, et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2001;33:562-9
- 120) Turner C. How much alcohol is in a 'standard drink'? An analysis of 125 studies. *Br J Addict* 1990;85:1171-5
- 121) O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Hepatology* 2010;51:307-28
- 122) Hézode C, Lonjon I, Roudot-Thoraval F, et al. Impact of moderate alcohol consumption on histological activity and fibrosis in patients with chronic hepatitis C, and specific influence of steatosis: a prospective study. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1031-7
- 123) Innes HA, Hutchinson SJ, Barclay S, et al. Quantifying the fraction of cirrhosis attributable to alcohol among chronic hepatitis C virus patients: implications for treatment cost-effectiveness. *Hepatology* 2013;57:451-601
- 124) Aloman C, Gehring S, Wintermeyer P, et al. Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against HCV NS5 protein due to dendritic cell dysfunction. *Gastroenterology* 2007;132:698-708
- 125) Zhang T, Li Y, Lai JP, et al. Alcohol potentiates hepatitis C virus replicon expression. *Hepatology* 2003;38:57-65

- 126) Dawson DA, Li TK, Grant BF. A prospective study of risk drinking: at risk for what? *Drug Alcohol Depend* 2008;95:62-72
- 127) Stokkeland K, Hilm G, Spak F, et al. Different drinking patterns for women and men with alcohol dependence with and without alcoholic cirrhosis. *Alcohol Alcohol* 2008;43:39-45
- 128) Hatton J, Burton A, Nash H, et al. Drinking patterns, dependency and lifetime drinking history in alcohol-related liver disease. *Addiction* 2009;104:587-92
- 129) Askgaard G, Grønbæk 2, Kjær MS, et al. Alcohol drinking pattern and risk of alcoholic liver cirrhosis: a prospective cohort study. *J Hepatol* 2015;62:1061-7
- 130) Parrish KM, Dufour MC, Stinson FS, et al. Average daily alcohol consumption during adult life among decedents with and without cirrhosis: the 1986 National Mortality Followback Survey. *J Stud Alcohol* 1993;54:450-6
- 131) Castéra L, Hézode C, Roudot-Thoraval F, et al. Worsening of steatosis is an independent factor of fibrosis progression in untreated patients with chronic hepatitis C and paired liver biopsies. *Gut* 2003;52:288-92
- 132) Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, et al. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 2001;33:1358-64

- 133) Everhart JE, Lok AS, Kim HY, et al. Weight-related effects on disease progression in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Gastroenterology* 2009;137:549-57
- 134) Leandro G, Mangia A, Hui J, et al. Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology* 2006;130:1636-42
- 135) White DL, Ratziu V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2008;49:831-44
- 136) Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, et al. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;134:416-23
- 137) Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, et al. Sustained virological response reduces incidence of onset of type 2 diabetes in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009;49:739-44
- 138) Romero-Gómez M, Fernández-Rodríguez CM, Andrade RJ, et al. Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008;48:721-7
- 139) Thompson AJ, Patel K, Chuang WL, et al. Viral clearance is associated with improved insulin resistance in genotype 1 chronic hepatitis C but not genotype 2/3. *Gut* 2012;61:128-34
- 140) Aghemo A, Prati GM, Rumi MG, et al. Sustained virological response prevents the development of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2012;56:1681-7

- 141) Fartoux L, Poujol-Robert A, Guéchet J, et al. Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 2005;54:1003-8
- 142) Hui JM, Sud A, Farrell GC, et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression *Gastroenterology* 2003;125:1695-704
- 143) Huang YW, Yang SS, Fu SC, et al. Increased risk of cirrhosis and its decompensation in chronic hepatitis C patients with new-onset diabetes: a nationwide cohort study. *Hepatology* 2014;60:807-14
- 144) European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2018;69:406-460
- 145) Bernardi M, Moreau R, Angeli P, et al. Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: From peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. *J Hepatol* 2015;63:1272–1284.
- 146) D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217-31
- 147) Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646–649
- 148) Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology* 2006;43:1303-10

- 149) Benvegnù L, Gios M, Boccatto S, et al. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut* 2004;53:744-9
- 150) Bruno S, Zuin M, Crosignani A, et al. Predicting mortality risk in patients with compensated HCV-induced cirrhosis: a long-term prospective study. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1147-58
- 151) European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018;69:182–236
- 152) Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology* 2009;136:138-48
- 153) Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, et al. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut* 2000;47:131-6
- 154) McCombs J, Matsuda T, Tonnu-Mihara I, et al. The risk of long-term morbidity and mortality in patients with chronic hepatitis C: results from an analysis of data from a Department of Veterans Affairs Clinical Registry. *JAMA Intern Med* 2014;174:204-12
- 155) Hatzakis A, Chulanov V, Gadano AC, et al. The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infections with today's treatment paradigm. *J Viral Hepat* 2015;22:S26-45

- 156) Petrick JL, Kelly SP, Altekruse SF, et al. Future of Hepatocellular Carcinoma Incidence in the United States Forecast Through 2030. *J Clin Oncol* 2016;34:1787-94
- 157) Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, et al. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013;57:964-73
- 158) Veldt BJ, Chen W, Heathcote EJ, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2008;47:1856-62
- 159) Vandembulcke H, Moreno C, Colle I, et al. Alcohol intake increases the risk of HCC in hepatitis C virus-related compensated cirrhosis: A prospective study. *J Hepatol* 2016;65:543-51
- 160) El-Serag HB, Kanwal F, Davila JA, et al. A new laboratory-based algorithm to predict development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C and cirrhosis. *Gastroenterology* 2014;146:1249-55
- 161) Zignego AL, Ramos-Casals M, Ferri C, et al. International therapeutic guidelines for patients with HCV-related extrahepatic disorders. A multidisciplinary expert statement. *Autoimmun Rev* 2017;16:523-541
- 162) Younossi Z, Park H, Henry L, et al. Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. *Gastroenterology*. 2016;150:1599-608

- 163) Kawamura Y, Ikeda K, Arase Y, et al. Viral elimination reduces incidence of malignant lymphoma in patients with hepatitis C. *Am J Med.* 2007;120:1034-41
- 164) Hsu YC, Ho HJ, Huang YT, et al. Association between antiviral treatment and extrahepatic outcomes in patients with hepatitis C virus infection. *Gut.* 2015;64:495-503
- 165) Hsu YC, Lin JT, Ho HJ, et al. Antiviral treatment for hepatitis C virus infection is associated with improved renal and cardiovascular outcomes in diabetic patients. *Hepatology.* 2014;59:1293-302
- 166) van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, et al. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA.* 2012;308:2584-93
- 167) Tada T, Kumada T, Toyoda H, et al. Viral eradication reduces all-cause mortality in patients with chronic hepatitis C virus infection: a propensity score analysis. *Liver Int.* 2016;36:817-26
- 168) European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J Hepatol* 2018;69:182-236
- 169) Degasperi E, Viganò M, Aghemo A, et al. PegIFN- α 2a for the treatment of chronic hepatitis B and C: a 10-year history. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11:459-74
- 170) Degasperi E, Aghemo A. Clinical drivers in naïve patient eligibility for treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2012;19 Suppl 1:3-6

- 171) van der Meer AJ, Feld JJ, Hofer H, et al. Risk of cirrhosis-related complications in patients with advanced fibrosis following hepatitis C virus eradication. *J Hepatol* 2017;66:485-493
- 172) Petta S, Di Marco V, Bruno S, et al. Impact of virus eradication in patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis: competing risks and multistate model. *Liver Int* 2016;36:1765-1773
- 173) Bruno S, Di Marco V, Iavarone M, et al. Survival of patients with HCV cirrhosis and sustained virologic response is similar to the general population. *J Hepatol* 2016;64:1217-23
- 174) Innes HA, McDonald SA, Dillon JF, et al. Toward a more complete understanding of the association between a hepatitis C sustained viral response and cause-specific outcomes. *Hepatology* 2015;62:355-64
- 175) Reichard O, Glaumann H, Frydén A, et al. Long-term follow-up of chronic hepatitis C patients with sustained virological response to alpha-interferon. *J Hepatol* 1999;30:783-7
- 176) Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, et al. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 2000;132:517-24
- 177) Poynard T, McHutchison J, Manns M, et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1303-13

- 178) Arif A, Levine RA, Sanderson SO, et al. Regression of fibrosis in chronic hepatitis C after therapy with interferon and ribavirin. *Dig Dis Sci* 2003;48:1425-30
- 179) Pol S, Carnot F, Nalpas B, et al. Reversibility of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hum Pathol* 2004;35:107-12
- 180) Mallet V, Gilgenkrantz H, Serpaggi J, et al. Brief communication: the relationship of regression of cirrhosis to outcome in chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 2008;149:399-403
- 181) Everson GT, Balart L, Lee SS, et al. Histological benefits of virological response to peginterferon alfa-2a monotherapy in patients with hepatitis C and advanced fibrosis or compensated cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:542-51
- 182) George SL, Bacon BR, Brunt EM, et al. Clinical, virologic, histologic, and biochemical outcomes after successful HCV therapy: a 5-year follow-up of 150 patients. *Hepatology* 2009;49:729-38
- 183) D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, et al. A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. *Hepatology* 2012;56:532-43
- 184) D'Ambrosio R, Degasperis E, Aghemo A, et al. Serological Tests Do Not Predict Residual Fibrosis in Hepatitis C Cirrhotics with a Sustained Virological Response to Interferon. *PLoS One* 2016;11:e0155967

- 185) D'Ambrosio R, Aghemo A, Fraquelli M, et al. The diagnostic accuracy of Fibroscan for cirrhosis is influenced by liver morphometry in HCV patients with a sustained virological response. *J Hepatol* 2013;59:251-6
- 186) Fontana RJ, Bonkovsky HL, Naishadham D, et al. Serum fibrosis marker levels decrease after successful antiviral treatment in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:219-26
- 187) Poynard T, Moussalli J, Munteanu M, et al. Slow regression of liver fibrosis presumed by repeated biomarkers after virological cure in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2013;59:675-83
- 188) Roberts S, Gordon A, McLean C, et al. Effect of sustained viral response on hepatic venous pressure gradient in hepatitis C-related cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:932-7
- 189) Rincon D, Ripoll C, Lo Iacono O, et al. Antiviral therapy decreases hepatic venous pressure gradient in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2269-74
- 190) Bruno S, Crosignani A, Facciotto C, et al. Sustained virologic response prevents the development of esophageal varices in compensated, Child-Pugh class A hepatitis C virus-induced cirrhosis. A 12-year prospective follow-up study. *Hepatology* 2010;51:2069-76
- 191) D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, et al. The course of esophageal varices in patients with hepatitis C cirrhosis responding to interferon/ribavirin therapy. *Antivir Ther* 2011;16:677-84

- 192) Afdhal N, Everson GT, Calleja JL, et al. Effect of viral suppression on hepatic venous pressure gradient in hepatitis C with cirrhosis and portal hypertension. *J Viral Hepat* 2017;24:823-831
- 193) Mandorfer M, Kozbial K, Schwabl P, et al. Sustained virologic response to interferon-free therapies ameliorates HCV-induced portal hypertension. *J Hepatol* 2016;65:692-9
- 194) Lens S, Alvarado-Tapias E, Mariño Z, et al. Effects of All-Oral Anti-Viral Therapy on HVPG and Systemic Hemodynamics in Patients With Hepatitis C Virus-Associated Cirrhosis. *Gastroenterology* 2017;153:1273-1283
- 195) de Franchis R; Baveno VI Faculty. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol* 2015;63:743-5
- 196) Charlton M, Everson GT, Flamm SL, et al. Ledipasvir and Sofosbuvir Plus Ribavirin for Treatment of HCV Infection in Patients With Advanced Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149:649-59
- 197) Manns M, Samuel D, Gane EJ, et al. Ledipasvir and sofosbuvir plus ribavirin in patients with genotype 1 or 4 hepatitis C virus infection and advanced liver disease: a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:685-697

- 198) Foster GR, Irving WL, Cheung MC, et al. Impact of direct acting antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C and decompensated cirrhosis. *J Hepatol.* 2016;64:1224-31
- 199) Fernández Carrillo C, Lens S, Llop E, et al. Treatment of hepatitis C virus infection in patients with cirrhosis and predictive value of model for end-stage liver disease: Analysis of data from the Hepa-C registry. *Hepatology.* 2017;65:1810-1822
- 200) Perricone G, Duvoux C, Berenguer M, et al. Delisting HCV-infected liver transplant candidates who improved after viral eradication: Outcome 2 years after delisting. *Liver Int.* 2018;38:2170-2177
- 201) Belli LS, Perricone G, Adam R, et al. Impact of DAAs on liver transplantation: Major effects on the evolution of indications and results. An ELITA study based on the ELTR registry. *J Hepatol.* 2018;69:810-817.
- 202) Morgan RL, Baack B, Smith BD, et al. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Ann Intern Med* 2013;158:329-37
- 203) El-Serag HB, Kanwal F, Richardson P, et al. Risk of hepatocellular carcinoma after sustained virological response in Veterans with hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2016;64:130-7
- 204) Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *J Hepatol* 2016;65:727-33

- 205) Kozbial K, Moser S, Schwarzer R, et al. Unexpected high incidence of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with sustained virologic response following interferon-free direct-acting antiviral treatment. *J Hepatol* 2016;65:856-8
- 206) Cardoso H, Vale AM, Rodrigues S, et al. High incidence of hepatocellular carcinoma following successful interferon-free antiviral therapy for hepatitis C associated cirrhosis. *J Hepatol* 2016;65:1070-1071
- 207) Reig M, Mariño Z, Perelló C, et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J Hepatol* 2016;65:719-26
- 208) Cammà C, Cabibbo G, Craxì A. Direct antiviral agents and risk for HCC early recurrence: Much ado about nothing. *J Hepatol* 2016;65:861-2
- 209) ANRS collaborative study group on hepatocellular carcinoma (ANRS CO22 HEPATHER, CO12 CirVir and CO23 CUPILT cohorts). Lack of evidence of an effect of direct-acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma: Data from three ANRS cohorts. *J Hepatol* 2016;65:734-40
- 210) Cheung MC, Walker AJ, Hudson BE, et al. Outcomes after successful direct-acting antiviral therapy for patients with chronic hepatitis C and decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2016;65:741-7
- 211) Romano A, Angeli P, Piovesan S, et al. Newly diagnosed hepatocellular carcinoma in patients with advanced hepatitis C treated with DAAs: A prospective population study. *J Hepatol*. 2018;69:345-352

- 212) Kanwal F, Kramer J, Asch SM, et al. Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology*. 2017;153:996-1005
- 213) Degasperi E, D'Ambrosio R, Iavarone M, et al. Factors Associated With Increased Risk of De Novo or Recurrent Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis Treated With Direct-Acting Antivirals for HCV Infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17:1183-1191
- 214) Nahon P, Layese R, Bourcier V, et al. Incidence of Hepatocellular Carcinoma After Direct Antiviral Therapy for HCV in Patients With Cirrhosis Included in Surveillance Programs. *Gastroenterology*. 2018;155:1436-1450
- 215) Calvaruso V, Cabibbo G, Cacciola I, et al. Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Patients With HCV-Associated Cirrhosis Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology*. 2018;155:411-421
- 216) Ioannou GN, Green PK, Berry K. HCV eradication induced by direct-acting antiviral agents reduces the risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2018;68:25–32
- 217) Cucchetti A, Cescon M, Erroi V, et al. Cost-effectiveness of liver cancer screening. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013;27:961-72
- 218) Chang KC, Hung CH, Lu SN, et al. A novel predictive score for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C after sustained response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2766-72

- 219) Ioannou GN, Green PK, Beste LA, et al. Development of models estimating the risk of hepatocellular carcinoma after antiviral treatment for hepatitis C. *J Hepatol.* 2018;69:1088-1098
- 220) He S, McPhaul C, Li JZ, et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 2010;285:6706-15
- 221) BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, et al. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology* 2017;66:1111-1124.
- 222) Valenti L, Dongiovanni P, Ginanni Corradini S, et al. PNPLA3 I148M variant and hepatocellular carcinoma: a common genetic variant for a rare disease. *Dig Liver Dis.* 2013;45:619-24
- 223) Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40:1461-1465
- 224) Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:1209-17
- 225) Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011;53:791-9

- 226) Trépo E, Gustot T, Degré D, et al. Common polymorphism in the PNPLA3/adiponutrin gene confers higher risk of cirrhosis and liver damage in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2011;55:906-12
- 227) Grimaudo S, Pipitone RM, Pennisi G, et al. Association Between PNPLA3 rs738409 C>G Variant and Liver-Related Outcomes in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019 Aug 13. pii: S1542-3565(19)30886-9. doi: 10.1016/j.cgh.2019.08.011.
- 228) Buch S, Stickel F, Trepo E, et al. A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat Gen* 2015; 47: 1443-8
- 229) Stickel F, Buch S, Lau K, et al. Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology* 2011;53:86-95
- 230) Trépo E, Pradat P, Potthoff A, et al. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011;54:60-9
- 231) Yang J, Trépo E, Nahon P, et al. PNPLA3 and TM6SF2 variants as risk factors of hepatocellular carcinoma across various etiologies and severity of underlying liver diseases. *Int J Cancer*. 2019;144:533-544
- 232) Falletti E, Cussigh A, Cmet S, et al. PNPLA3 rs738409 and TM6SF2 rs58542926 variants increase the risk of hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *Dig Liver Dis*. 2016;48:69-75

- 233) Trépo E, Nahon P, Bontempi G, et al. Association between the PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma: Evidence from a meta-analysis of individual participant data. *Hepatology* 2014;59:2170-7
- 234) Guyot E, Sutton A, Rufat P, et al. PNPLA3 rs738409, hepatocellular carcinoma occurrence and risk model prediction in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 2013;58:312-8
- 235) Liu YL, Patman GL, Leathart JB, et al. Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2014;61:75-81
- 236) Raksayot M, Chuaypen N, Khlaiphuengsin A, et al. Independent and additive effects of PNPLA3 and TM6SF2 polymorphisms on the development of non-B, non-C hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2019;54:427-436
- 237) Falletti E, Fabris C, Cmet S, et al. PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence. *Liver Int.* 2011;31:1137-43
- 238) Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, et al. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2014;109:325-34
- 239) Zhang S, Wu H, Wu X, et al. Association between PNPLA3 rs738409 polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma and its development in patients with cirrhosis: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:6638-49

- 240) Li JF, Zheng EQ, Xie M. Association between rs738409 polymorphism in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) gene and hepatocellular carcinoma susceptibility: Evidence from case-control studies. *Gene*. 2019;685:143-148
- 241) Sato M, Kato N, Tateishi R, et al. Impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Res*. 2014;44:E137-44
- 242) Nakaoka K, Hashimoto S, Kawabe N, et al. PNPLA3 I148M associations with liver carcinogenesis in Japanese chronic hepatitis C patients. *Springerplus*. 2015;4:83
- 243) Valenti L, Motta BM, Soardo G, et al. PNPLA3 I148M polymorphism, clinical presentation, and survival in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2013;8:e75982
- 244) Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genetics* 2011;7:e1001324
- 245) Gordon A, Yang R, Yerges-Armstrong LM, et al. Genetic variation at NCAN locus is associated with inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease in morbid obesity. *Human Heredity* 2013;75:34-43
- 246) Kozlitina J, Smagris E, Stender S, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics* 2014;46:352-6

- 247) Mahdessian H, taxiarchis A, Popov S, et al. TM6SF2 is a regulator of liver fat methabolsim influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:8913-8
- 248) Liu YL, Reeves HL, Buurt AD, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun* 2014;5:4309
- 249) Sookoian S, Castaño GO, Scian R, et al. Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity. *Hepatology* 2015;61:515-25
- 250) Holmen OL, Zhang H, Fan Y, et al. Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk. *Nat Genet* 2014;46:345-51
- 251) Dongiovanni P1, Petta S, Maglio C, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology* 2015;61:506-14
- 252) Pirola CJ, Sookoian S. The dual and opposite role of the TM6SF2-rs58542926 variant in protecting against cardiovascular disease and conferring risk for nonalcoholic fatty liver: A meta-analysis. *Hepatology* 2015;62:1742-56
- 253) Milano M, Aghemo A, Mancina RM, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene E167K variant impacts on steatosis and liver damage in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2015;62:111-7

- 254) Coppola N, Rosa Z, Cirillo G, et al. TM6SF2 E167K variant is associated with severe steatosis in chronic hepatitis C, regardless of PNPLA3 polymorphism. *Liver Int* 2015;35:1959-63
- 255) Eslam M, Mangia A, Berg T, et al. Diverse impacts of the rs58542926 E167K variant in TM6SF2 on viral and metabolic liver disease phenotypes. *Hepatology* 2016;64:34-46
- 256) Gijón MA, Riekhof WR, Zarini S, et al. Lysophospholipid acyltransferases and arachidonate recycling in human neutrophils. *J Biol Chem* 2008;283:30235-45
- 257) Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, et al. The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology* 2016;150:1219-1230
- 258) Donati B, Dongiovanni P, Romeo S, et al. MBOAT7 rs641738 variant and hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic individuals. *Sci Rep*. 2017;7:4492
- 259) Abu Dayyeh BK, Yang M, Fuchs BC, et al. A functional polymorphism in the epidermal growth factor gene is associated with risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011;141:141-9
- 260) Jiang G, Yu K, Shao L, et al. Association between epidermal growth factor gene +61A/G polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis based on 16 studies. *BMC Cancer*. 2015;15:314
- 261) Marabita F, Aghemo A, De Nicola S, et al. Genetic variation in the interleukin-28B gene is not associated with fibrosis progression in patients

with chronic hepatitis C and known date of infection. *Hepatology* 2011;54:1127-34

- 262) Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, et al. Genetic variation near interleukin 28B and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2014;49:1152-62
- 263) Matsuura K, Sawai H, Ikeo K, et al. Genome-Wide Association Study Identifies TLL1 Variant Associated With Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* 2017;152:1383-1394
- 264) Degasperi E, Galmozzi E, Facchetti F, et al. TLL1 variants do not predict hepatocellular carcinoma development in HCV cirrhotic patients treated with direct-acting antivirals. *J Viral Hepat.* 2019;26:1233-1236
- 265) Dongiovanni P, Stender S, Pietrelli A, et al. Causal relationship of hepatic fat with liver damage and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver. *J Intern Med.* 2018;283:356-370
- 266) Piñero F, Mendizabal M1, Ridruejo E, et al. Treatment with direct-acting antivirals for HCV decreases but does not eliminate the risk of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2019;39:1033-1043