



Università degli Studi di Firenze

DOTTORATO DI RICERCA IN
"MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE"

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. GIACOMO LAFFI

VALIDAZIONE E SVILUPPO DI METODICHE NON-INVASIVE PER
LA DIAGNOSI ED IL MONITORAGGIO DELLA FIBROSI DEL
FEGATO

Settore Scientifico Disciplinare MED/12

Dottorando

Dott.ssa Stasi Cristina

Tutore

Prof. Laffi Giacomo

Anni 2010/2012

INDICE

INDICE.....	1
SOMMARIO.....	4
PARTE INTRODUTTIVA.....	9
EPATOPATIE CRONICHE.....	10
METODI DI MISURAZIONE DELLA FIBROSI.....	13
METODI INVASIVI.....	13
METODI NON-INVASIVI: MARCATORI INDIRETTI E DIRETTI DI FIBROSI.....	14
DALL'IMAGING ECOGRAFICO ALLA CARATTERIZZAZIONE MECCANICA DEI TESSUTI MEDIANTE ELASTOGRAFIA.....	18
L'ELASTOGRAFIA IN EPATOLOGIA.....	21
SCOPO DELLA RICERCA.....	32
PARTE SPERIMENTALE.....	34
TITOLO DEL PROGETTO 1:.....	35
I VALORI DI STIFFNESS SONO INFLUENZATI DA UN PASTO STANDARDIZZATO IN PAZIENTI CON EPATITE CRONICA HCV CORRELATA A DIFFERENTI STADI DI EVOLUZIONE FIBROTICA.....	35
1.1. INTRODUZIONE.....	35
1.2. PAZIENTI E METODI.....	36
1.2.1. Pazienti.....	36
1.2.2. Elastografia transiente.....	38
1.2.3. Biopsia epatica.....	39
1.2.4. Analisi Statistica.....	40

1.3.	RISULTATI.....	41
1.3.1.	Caratteristiche dei pazienti.....	41
1.3.2.	Cambiamenti dello stiffness dopo un pasto standard.....	42
1.4.	DISCUSSIONE.....	46
	TITOLO DEL PROGETTO 2:.....	52
	VALUTAZIONE LONGITUDINALE DELLO STIFFNESS EPATICO IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TERAPIA ANTIVIRALE.....	52
2.1.	INTRODUZIONE.....	52
2.2.	PAZIENTI E METODI.....	53
2.2.1.	Pazienti.....	53
2.2.2.	Elastografia transiente.....	55
2.2.3.	Biopsia epatica.....	55
2.2.4.	Analisi statistica.....	56
2.3.	RISULTATI.....	56
2.3.1.	Stiffness prima, durante e dopo trattamento con interferone.....	56
2.3.2.	Valori di stiffness come possibile indicatore di risposta al trattamento antivirale.....	60
2.3.3.	Biopsia epatica.....	60
2.4.	DISCUSSIONE.....	62
	TITOLO DEL PROGETTO 3:.....	64
	ELASTOGRAFIA TRANSIENTE PER IL MONITORAGGIO DELLA FIBROSI EPATICA IN PAZIENTI CON ARTRITE REUMATOIDE IN TRATTAMENTO CON METOTREXATE.....	64
3.1	INTRODUZIONE.....	64

3.2 PAZIENTI E METODI.....	66
3.2.1 Elastografia transiente.....	67
3.2.2. Biopsia epatica.....	68
3.2.3. Analisi statistica.....	69
3.3. RISULTATI.....	69
3.4. DISCUSSIONE.....	76
DISCUSSIONE, CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	81
BIBLIOGRAFIA.....	85
ABBREVIAZIONI.....	102
PUBBLICAZIONI.....	104
RINGRAZIAMENTI.....	106

SOMMARIO

L'evoluzione in senso fibrogenico delle epatopatie croniche di fegato rappresenta un problema molto importante in epatologia clinica, il cui controllo si basa ancora sulla biopsia epatica e sul conseguente esame istologico. Negli ultimi dieci anni varie metodiche non invasive sono state proposte per predire la presenza di fibrosi nella malattia epatica cronica. La maggior parte di queste metodiche è basata su algoritmi, inclusi i parametri biochimici, che hanno dimostrato una precisione diagnostica accettabile alle due estremità del processo fibrogenico. L'introduzione dei marcatori diretti e indiretti di fibrosi epatica e dell'elastografia transiente ha rappresentato un ulteriore progresso in epatologia clinica e la combinazione di differenti metodologie non invasive fornirà in futuro un miglioramento della gestione clinica dei pazienti con progressione della patologia epatica. Studi condotti soprattutto nelle epatopatie virali suggeriscono che l'elastografia transiente è una tecnica utile per diagnosticare la fibrosi severa e la cirrosi e per escludere la fibrosi significativa ($> 0 = F2$).

Pertanto scopo di questi studi è stato quello di determinare, con metodiche non invasive, una migliore differenziazione dello stadio di malattia, attraverso uno studio dinamico dello stiffness mediante elastografia; l'associazione tra terapia antivirale e regressione/progressione della fibrosi; e infine, l'associazione tra farmaci potenzialmente in grado di indurre danno epatico e fibrosi, al fine di validare l'elastografia anche nelle epatopatie croniche non virali.

Progetto1

L'elastografia transiente è sempre più utilizzata nella pratica clinica per la diagnosi non invasiva della fibrosi tissutale in pazienti con malattia epatica cronica (CLD), in particolare l'epatite cronica HCV correlata. Il presente studio è stato progettato per definire meglio l'aumento "confondente" dello stiffness epatico a seguito di un pasto standardizzato in una popolazione consecutiva di 125 pazienti con infezione cronica da HCV in diverse fasi di evoluzione fibrotica. I valori di stiffness sono stati rilevati a 15, 30, 45, 60, 120 minuti dopo l'inizio di un pasto liquido standardizzato (400 ml, 600 kcal, 16.7% proteine, 53.8% carboidrati, 29.5% grassi). Un picco nell'incremento dei valori di stiffness è stato osservato tra 15-45 minuti dopo l'inizio del pasto con ritorno ai valori basali pre-pasto entro 120 minuti in tutti i pazienti. Il picco delta post-pasto nei valori di stiffness era progressivamente più marcato per stadi crescenti di fibrosi ($p < 0.001$), diventando massimo nei pazienti con cirrosi. Tuttavia, la probabilità di identificare la fase METAVIR di fibrosi, la classe Child-Pugh o la presenza/assenza di varici esofagee con l'aumento delta dei valori di stiffness post-pasto era inferiore a quella ottenuta con i valori basali di stiffness. In conclusione, i risultati di questo studio dimostrano un effetto confondente del pasto sull'attendibilità delle misurazioni dello stiffness nel diagnosticare lo stadio di fibrosi in pazienti con epatite cronica HCV

correlata, suggerendo che dovrebbe essere osservato un periodo di digiuno di 120 min prima di eseguire tali misurazioni.

Progetto 2

L'elastografia transiente è stata suggerita come possibile strumento per la valutazione non invasiva della progressione o regressione della fibrosi nei pazienti con epatopatia cronica HCV correlata. Lo scopo di questo progetto è stato quello di valutare lo stiffness epatico prima, alla fine e dopo trattamento antivirale. Lo stiffness epatico è stato valutato prima e prospetticamente alla fine del trattamento in 74 pazienti (55 con risposta virologica sostenuta-SVR, 12 null responders e 7 relapsers; la popolazione dello studio era costituita da 43 uomini e 31 donne, di età media pari a 51.09 ± 12.84 anni) e dopo 3 anni di follow-up in 54 pazienti (30 SVR, 12 null responders e 7 relapsers). Nei pazienti null responders e relapsers, lo stiffness prima della terapia non differiva da quello osservato alla fine della terapia e dopo i tre anni di follow-up. I 55 pazienti SVR esaminati presentavano uno stiffness prima della terapia (9.50 ± 6.88 kPa), che differiva significativamente da quello di fine terapia (6.8 ± 4.86 kPa, $p = 0.04$). In 30 di questi pazienti (10.80 ± 8.50 kPa) è stata osservata una diminuzione significativa dopo tre anni di follow-up (6.76 ± 4.58 kPa, $p = 0.0141$ vs basale). Sedici SVR e 5 non responders venivano sottoposti a biopsia epatica. In 2 di questi pazienti, che presentavano uno stiffness di 9.7 e 11.3 kPa, veniva riscontrata moderata necroinfiammazione in

assenza di fibrosi. Valori di stiffness pre-trattamento di 12 kPa erano significativamente associati ad assenza di SVR ($p < 0.025$), con un rischio relativo di 2.44 (I.C. 95% 1.17 – 5.07) e rischio attribuibile del 31%. In conclusione lo stiffness epatico può essere utile per valutare la risposta a lungo termine del trattamento.

Progetto 3

I valori di stiffness epatico sono stati recentemente proposti come utilizzabili nella pratica clinica per identificare i pazienti con fibrosi epatica metotrexate-indotta. Lo scopo di questo progetto è stato quello di identificare i determinanti clinici e di laboratorio dell'associazione fra fibrosi epatica, misurata con l'elastografia epatica, e il trattamento con metotrexate in pazienti con artrite reumatoide in assenza di altri fattori che potessero contribuire al danno epatico e alla fibrosi. Questo è stato valutato retrospettivamente in 100 pazienti con artrite reumatoide, che assumevano una dose cumulativa compresa fra 1530 e 13000 mg per un periodo medio di 7.07 ± 3.89 anni. Nella popolazione dello studio sono stati riscontrati valori di stiffness pari a 4.93 ± 1.8 kPa, che escludevano la presenza di fibrosi significativa. All'analisi univariata, una correlazione significativa era stata riscontrata fra stiffness epatico e dose cumulativa di metotrexate, durata del trattamento, livelli di alanina aminotransferasi, indice di massa corporea, gamma glutamiltranspeptidasi e presenza di steatosi. All'analisi multivariata, è stata riscontrata un'associazione

significativa solo fra stiffness e dose cumulativa di metotrexate. Di 11 pazienti con stiffness > 7 kPa, 5 sono stati sottoposti a biopsia epatica e in 2 di questi pazienti è stata riscontrata fibrosi perisinusoidale lieve o moderata con una dose cumulativa > 4000 mg e stiffness > 9 kPa. Si può pertanto concludere che il trattamento cronico con metotrexate induce un progressivo incremento dei valori di stiffness corrispondente a fibrosi perisinusoidale lieve o moderata per valori di stiffness > 9 kPa.

Nel complesso di questi studi, condotti durante il Dottorato, è stato confermato sia il ruolo dell'elastografia come "discriminatore diagnostico" per stabilire priorità cliniche e ridurre il numero delle biopsie epatiche nelle epatopatie virali e nella fibrosi indotta da farmaci, che come mezzo per monitorare la progressione/regressione della fibrosi epatica. Tuttavia, in alcuni casi è comunque necessaria l'integrazione con altri approcci diagnostici, inclusi la biopsia epatica, per una migliore definizione dello stadio di malattia.

È possibile che ulteriori progressi deriveranno dal confronto fra metodi non invasivi e misure quantitative di fibrosi epatica ottenute mediante l'analisi morfometrica, quali il recente *collagene proportionate area*, che ha dimostrato un'eccellente correlazione con la pressione portale nel paziente cirrotico.

PARTE INTRODUTTIVA

EPATOPATIE CRONICHE

Le epatopatie croniche (EC) rappresentano un importante problema di sanità pubblica a livello mondiale, compresi i paesi industrializzati, a causa della loro morbilità, mortalità e costo economico associato [1].

Da quando, nel 1989, in laboratorio fu clonato il genoma dell'HCV e furono messi a punto i primi test diagnostici [2], è emersa la sua notevole diffusione su scala mondiale. Sebbene l'istituzione di efficaci misure di screening a partire dai primi anni '90 abbia grandemente ridotto il rischio di trasmissione dell'HCV attraverso le emotrasfusioni [3], nuovi casi continuano a essere rilevati per pratiche di tossicodipendenza endovenosa, ma anche per altri mezzi di esposizione percutanea o mucosa, a cominciare dalla trasmissione nosocomiale in seguito a procedure invasive chirurgiche od endoscopiche. In circa il 75-85% dei pazienti si determina una cronicizzazione dell'infezione che nel 10-15% dei casi evolve in cirrosi [4], nel 25% evolve ulteriormente in epatocarcinoma [5] e rappresenta la principale indicazione al trapianto di fegato sia negli Stati Uniti che in Europa [6]. Al fine di evitare queste gravi complicanze, sono disponibili da alcuni anni specifiche terapie antivirali che, in una percentuale di casi variabile dal 45 all'80% in base al genotipo virale, possono indurre una risposta virologica sostenuta (ossia assenza dell'RNA virale dal sangue per almeno sei mesi dopo la fine della terapia) [7].

La decisione se e quando iniziare il trattamento dell'epatite cronica C dipende essenzialmente dal polimorfismo dell'interleuchina 28, dal

genotipo virale e dai risultati della biopsia epatica, generalmente non effettuata nei pazienti con genotipo 2 e 3, data l'alta probabilità di una favorevole risposta terapeutica [8].

Il 25-30% dei pazienti HCV-infetti presenta transaminasi normali e un ulteriore 40% livelli aumentati di non oltre due volte il limite superiore di normalità [9]. Sebbene sia generalmente accettato che la storia naturale di tali soggetti è contraddistinta da una più lenta progressione in virtù di una viremia meno elevata e di un'istopatologia, in termini di necrosi e fibrosi, migliore [10], anch'essi sono a rischio di sviluppare fibrosi severa e cirrosi [11].

Per quanto concerne l'infezione da HBV, da una parte essa rappresenta tuttora un importante problema sanitario in aree depresse (Amazzonia, Africa subsahariana) ed in particolare in alcuni paesi dell'Estremo Oriente come la Cina, dove la prevalenza dei portatori di HbsAg è assai elevata [12], dall'altra, grazie all'introduzione da oltre 15 anni di un efficace vaccino, frutto di tecniche di ingegneria genetica, l'impatto igienico-sanitario in termini di prevalenza e di ricadute economiche nei paesi industrializzati come il nostro si è ridotto notevolmente [13]. Il WHO ha stimato che ci sono più di 2 miliardi di persone con infezione da HBV e circa 378 milioni di portatori cronici in tutto il mondo. Nei paesi a bassa endemia come l'Italia la prevalenza è attualmente inferiore al 2% [14].

Per quanto concerne alcune epatopatie tossiche, i farmaci, analogamente ad altri agenti che causano tossicità diretta del fegato (e.g. etanolo), possono causare danni acuti o cronici ed un possibile sviluppo di fibrosi

epatica, subordinati ad un'alta variabilità inter-individuale eventualmente collegata a polimorfismi genetici coinvolti nell'assorbimento, nel metabolismo, nell'escrezione, nel trasporto cellulare [15,16], così come nella fibrosi [17,18]. La fibrosi epatica significativa è stata originariamente segnalata in pazienti con artrite reumatoide e psoriasi cronica trattata con metotrexate (MTX) con un'incidenza più alta del 23% [19-23].

Date tali premesse epidemiologiche, risulta chiaro come il punto nodale delle EC in generale, e di quelle di origine virale in particolare, sia rappresentato dalla loro capacità di progressione fibrotica, in un contesto dinamico in cui l'accumulo di matrice extracellulare fibrillare si associa ad una costante degradazione e rimodellamento della matrice stessa: tale processo "bilanciato" può da una parte, come già detto, evolvere in cirrosi, ma dall'altra ripercorrere il tragitto inverso in modo da ritornare verso una normalizzazione della struttura e funzionalità epatica [24]. Tale reversibilità, seppur teoricamente possibile in seguito alla rimozione dell'agente causale, è invece tuttora materia di discussione per quanto concerne la storia naturale della cirrosi [25]. La distinzione precisa fra fibrosi avanzata e cirrosi è di fondamentale importanza in termini sia di approcci diagnostici che terapeutici [26]. Pertanto, sarebbe necessario convalidare metodi che possano valutare la regressione della fibrosi in seguito a terapia antivirale e monitorare la progressione della fibrosi e la cirrosi avanzata, in caso di fallimento del trattamento. Nei prossimi anni sarà osservato un aumento dei pazienti con fibrosi avanzata o cirrosi. In particolare, secondo i dati

epidemiologici relativi all'epatite C, il numero di pazienti con cirrosi aumenterà in modo esponenziale nei prossimi 10-15 anni [27].

METODI DI MISURAZIONE DELLA FIBROSI

METODI INVASIVI

La biopsia epatica per poter valutare con appropriati sistemi di scoring [28] non solo il grado di fibrosi epatica, ma anche l'attività necro-infiammatoria deve prevedere il prelievo di un frustolo epatico di almeno 2 cm di lunghezza, 1,4 mm di spessore e contenere un minimo di 11 spazi portali completi, indipendentemente dalla via attraverso cui viene effettuata (percutanea, laparoscopica, chirurgica, transgiugulare) [29]. Va però considerato che la biopsia epatica fornisce un'informazione statica del processo di fibrogenesi epatica e pertanto non permette di ottenere dati sull'evoluzione del fenomeno di riparazione tissutale né sulla rapidità di progressione verso la cirrosi. Occorre inoltre ricordare come la biopsia epatica sia gravata da alcuni fattori limitanti quali: a) invasività e, quindi, basso grado di accettazione ("compliance") da parte del paziente; b) possibilità di complicanze potenzialmente letali, seppur rare; c) possibili errori di campionamento; d) variabilità diagnostica osservatore-dipendente [30-32].

Emerge quindi la necessità di poter disporre di metodi idonei, sicuri, semplici e rapidi allo scopo di monitorare nel tempo la progressione in senso fibrogenetico delle EC.

METODI NON-INVASIVI: MARCATORI INDIRETTI E DIRETTI DI FIBROSI

Negli ultimi anni sono state proposte alcune metodologie non invasive, facilmente riproducibili ed accettabili dai pazienti, basate su vari parametri sieroematici. I markers sierici per la predizione dello stadio di fibrosi sono suddivisi in due gruppi: 1) “marcatori indiretti”, una combinazione di parametri clinici e di alterazioni biochimiche riscontrate nelle epatopatia croniche e 2) “marcatori diretti” che riflettono la diffusione nella circolazione sistemica di peptidi coinvolti nell’accumulo di matrice extracellulare fibrillare (fibrogenesi); o coinvolti nella degradazione (fibrolisi); o coinvolti più in generale nell’infiammazione dei tessuti. La capacità predittiva delle possibili combinazioni di questi marcatori è data dalla loro inclusione in un algoritmo matematico [33].

I seguenti marcatori indiretti: APRI (conta piastrinica ed aspartato-aminotransferasi - AST) [34], Forns (colesterolemia totale, gamma-glutamiltanspeptidasi - GGT- e conta piastrinica) [35] e FibroTest (alfa-2 macroglobulina, aptoglobina, gamma-globulina, apolipoproteina A1, gamma-glutamiltanspeptidasi e bilirubina totale) (tabella 1) [36, 37] a differenza della biopsia, danno indicazioni dinamiche e non statiche sui processi fibrogenetici del fegato, anche se non riflettono direttamente il metabolismo della matrice extracellulare fibrillare; inoltre essi, in particolare il FibroTest, hanno dimostrato un’elevata accuratezza diagnostica alle due estremità del processo fibrogenetico (lieve e severo), mentre non si dimostrano particolarmente attendibili nell’identificare gradi

intermedi di fibrosi [38]. Risultati promettenti derivano dagli studi che valutano la performance del FibroTest nel predire gli outcome clinici nell'epatite cronica C, nell'epatite cronica B e nell'epatopatia alcolica [39-41]. Il test di Lok [42] è stato sviluppato come modello predittivo di cirrosi in pazienti con epatopatia cronica e viene calcolato utilizzando valori biochimici standard (international normalized ratio - INR -, AST, ALT, piastrine). Il FibroIndex, calcolato impiegando conta piastrinica, livelli di gamma-Globuline e AST, ha mostrato una buona accuratezza diagnostica nel monitoraggio della progressione della fibrosi epatica e della sua regressione dopo trattamento antivirale in pazienti con epatite cronica C [43]. Il FIB-4 viene invece calcolato utilizzando alcuni parametri biochimici, quali conta piastrinica, ALT, AST in un algoritmo contenente anche l'età. Negli studi condotti per validarne l'impiego ha dimostrato una buona accuratezza diagnostica nella diagnosi di fibrosi severa e di cirrosi in pazienti con epatite cronica C [44,45]. In particolare ha mostrato una specificità pari al 98.2% nella diagnosi di cirrosi. I migliori valori di cut-off per la diagnosi di fibrosi significativa e cirrosi dei marcatori indiretti più utilizzati sono riportati in tabella 1.

Markers	Algoritmo	Eziologia	Valori di cut off dei marcatori indiretti	
			≥F2	≥F4
APRI Wai 2003 et al. [34]	AST (UI/L) /conta piastrinica (10 ⁹ /L) x 100	HCV	>1.5	≥2
FORNS INDEX Forns 2002 [35]	7.811-3.131 x ln (conta piastrinica)+ 0.78 x ln (GGT) + 3.467 x ln (età [anni]) – 0.014 x ln (Colesterolo)	HCV	>6.9	n.a.
FIBROTEST Imbert-Bismut 2001 [36, 37]	4.467 x log[α ₂ macroglobulina (g/L)] – 1.357 x log [aptoglobina (g/L)] + 1.017 x log[GGT (UI/L)] + 0.0281 x [Età (anni) + 1.737] x log [bilirubina(μmol/L)] – 1.184 x [Apo1 (g/L)] + 0.301 x sesso (femmine = 0, maschi =1) – 5.54	HCV	≥0.48	≥0.75
LOK Lok 2005 [42]	Log odds = -5.56-0.0089 x piastrine (x10 ³ /mm ³) + 1.26 x AST/ALT ratio + 5.27 x INR	HCV	n.a.	≥0.5
FIBROINDEX Koda 2007 [43]	1.738-0.064 (piastrine [10 ⁴ /L])+ 0.005 x AST [UI/L] + 0.463 (gamma-globuline [g/dl])	CLD	≥2.25	n.a.
FIB-4 Vallet-Pichard 2007 [45]	età (anni) x AST (UI/L)/(piastrine [10 ⁹ /L]) x ALT (UI/L) ^{1/2}	CLD	n.a.	>3.25

Tabella 1. Valori di cut-off dei marcatori indiretti di fibrosi nella diagnosi di fibrosi significativa (F≥2) e cirrosi (F≥4, secondo lo score METAVIR). Abbreviazioni: CLD, malattia cronica di fegato i.e. HCV, HBV, epatopatia alcolica e steatoepatite non alcolica; n.a., non applicabili.

I marcatori diretti di fibrosi come l'acido ialuronico, il collagene di tipo IV, le metalloproteinasi 1 (MMP), l'inibitore tissutale delle metalloproteinasi 1 (TIMP-1), la laminina e il TGF- β presentano un'accuratezza diagnostica limitata per la diagnosi di fibrosi significativa (METAVIR \geq F2 o Ishak $>$ 3) [24].

Il Gruppo di studio Europeo sulla fibrosi epatica ha condotto uno studio multicentrico [46] per valutare le prestazioni nella stadiazione della fibrosi epatica di un pannello di marcatori sierici legati alla deposizione e al rimodellamento della matrice extracellulare. In questo studio, i livelli sierici di 9 indicatori surrogati di fibrosi epatica sono stati confrontati con lo stadio di fibrosi di 1021 soggetti con malattia epatica cronica. Gli algoritmi che combinavano i marcatori sierici sono stati valutati per la loro capacità di discriminare tra vari stadi di fibrosi rispetto alla biopsia epatica.

Un algoritmo che combinava età, acido ialuronico, propeptide del collagene di tipo III e TIMP-1 è stato scelto come il più appropriato ed è stato validato. L'accuratezza diagnostica di questo pannello di marcatori sierici, noto come pannello ELF (European Liver Fibrosis), è stato valutato utilizzando un sistema di punteggio semi-quantitativo (Ishak) che ha una bassa ripetibilità intra- ed inter-osservatore. Infatti, l'Ishak così come altri sistemi di valutazione non rappresentano una misura quantitativa della fibrosi, ma piuttosto una descrizione categoriale. Recentemente alcuni studi hanno valutato la correlazione tra gradiente di pressione venosa epatica (HVPG) e contenuto di collagene nel fegato, calcolata con l'analisi di immagini digitali computer-assistita, che utilizza sezioni istologiche per

quantificare la fibrosi. In particolare Calvaruso et al. [47] hanno determinato le relazioni tra analisi digitale computer-assistita, score Ishak e HVPG. Il collagene presente nel fegato è stato espresso come percentuale nell'area della biopsia epatica. Duecentoventicinque biopsie epatiche transgiugulari combinate con HVPG di 115 pazienti sono state valutate e confrontate con HVPG. Gli Autori hanno trovato una correlazione significativa tra collagene proportionate area (CPA) e HVPG, sottolineando che l'analisi di immagine CPA computer-assistita ha rilevanza clinica, in quanto potrebbe essere di ausilio per stratificare gruppi prognostici.

DALL'IMAGING ECOGRAFICO ALLA CARATTERIZZAZIONE MECCANICA DEI TESSUTI MEDIANTE ELASTOGRAFIA

Nell'ultimo decennio le tecniche elastografiche sono emerse come importante campo di ricerca complementare all'ecografia. L'elastografia fa riferimento ad una varietà di tecniche in grado di caratterizzare la risposta e le proprietà meccaniche dei tessuti mediante metodiche non invasive. La stima di vari parametri tissutali (caratteristiche deformative, di rigidità, propagazione e conduzione di fenomeni vibratorii/meccanici) si è dimostrata efficace nell'identificazione accurata di lesioni tissutali (tumori, aree fibrotiche, placche aterosclerotiche) caratterizzate da alterate proprietà elasto-meccaniche [48].

Sin dall'inizio degli anni '80 sono stati proposti metodi per stimare lo stato di deformazione dei tessuti mediante ultrasuoni [49,50]. L'elastografia venne introdotta per la prima volta nel 1991 [51] come una tecnica per la

misura diretta delle proprietà meccaniche dei tessuti, la cui importanza è emersa in virtù dell'associazione esistente tra l'alterazione delle proprietà meccaniche dei tessuti e lo sviluppo di processi patologici.

Le principali metodiche elastografiche differiscono per il tipo di sollecitazione meccanica adottata e nei metodi di analisi delle immagini, utilizzati per stimare le proprietà elastiche locali.

La caratterizzazione delle proprietà meccaniche dei tessuti avviene mediante l'analisi di immagini ecografiche acquisite in istanti temporalmente successivi ed in stati deformativi diversi indotti o 1) dal movimento estrinseco, in cui lo stato di tensione è indotto da una sollecitazione meccanica applicata dall'esterno (nelle maggior parte dei casi mediante l'applicazione di un trasduttore di pressione esterno) [51]; o 2) da quello intrinseco del tessuto, che può essere diretto, come nel caso del muscolo cardiaco in vivo dotato di contrattilità propria, o indiretto, come nel caso delle pareti arteriose dei vasi, deformate sotto l'azione della pulsazione intraluminale del sangue, le quali possono essere quindi analizzate mediante imaging ecografico intravascolare [52].

Attualmente, gli algoritmi più diffusi, che consentono di ottenere una stima accurata dello stato deformativo del tessuto in esame, sono senz'altro quelli del "metodo di autocorrelazione", che calcola la rigidità relativa al tessuto cui consegue una distorsione del tessuto stesso e viene visualizzata "in tempo reale" con immagini a colori [53], e del "metodo del gradiente di velocità", basato sulla misura della velocità dell'onda elastica che è direttamente correlata alla rigidità del parenchima in esame e

corrispondente alla crescente gravità della fibrosi [54]. Le caratteristiche deformative di un tessuto sottoposto ad uno stato di tensione quasi-statico o dinamico, consentono di inferire proprietà circa lo stato costitutivo del tessuto, ed eventualmente di individuare alterazioni meccaniche, quali ad esempio irrigidimento di pareti di organi cavi e presenza di masse tumorali o zone fibrotiche in organi pieni.

La metodica elastografica viene attualmente utilizzata e sperimentata in ambiti clinici diversi con criteri che possono differire caso per caso.

Originariamente questa metodica è stata utilizzata per organi pieni, quali fegato, mammella, rene o prostata, come metodo di quantificazione analitica della palpazione medica, che normalmente individua le aree a minore compressibilità, sottoponendo il tessuto ad uno stato di deformazione mediante l'applicazione di una forza esterna. Infatti, dal momento che i tessuti più rigidi si deformano meno dei tessuti più elastici sotto l'azione di un'identica forza, la stima dello stato di deformazione in queste condizioni può essere direttamente correlato alle proprietà costitutive del materiale. Per questa ragione la tecnica ha assunto il nome di "elastografia". Lo stato deformativo di un tessuto può essere caratterizzato mediante un parametro di deformazione (*strain*), che normalmente per un corpo unidimensionale si assume come l'aumento di lunghezza percentuale subito L , a partire da una lunghezza iniziale L_0 :

$$\varepsilon = \frac{L - L_0}{L_0}.$$

Le ricadute in ambito medico e le applicazioni in ambito clinico dell'elastografia sono molteplici, dalla diagnosi tumorale o di patologia d'organo con lesioni nodulari/fibrotiche, quali i tumori del seno [55], della tiroide [56] o della prostata [57] o di epatopatie croniche [58-60], al monitoraggio del rischio cardiovascolare o della funzione cardiaca [61].

L'ELASTOGRAFIA IN EPATOLOGIA

Nel campo epatologico, l'introduzione di questa nuova metodica è stata caratterizzata da scetticismo iniziale. Tuttavia numerosi studi per lo più condotti in pazienti con epatite cronica HCV correlata, hanno suggerito che questo metodo rappresentava lo strumento non invasivo "mancante" in epatologia. L'elastografia più diffusa (Fibroscan®, Echosense, Parigi, Francia) consiste in una sonda di 3.5 MHz con un trasduttore montato sull'asse di un vibratore (Figura 1).



Figura 1. Apparecchio per la misurazione dello stiffness epatico (Fibroscan®, Echosense, Parigi, Francia).

Sono state recentemente introdotte una sonda pediatrica (5MHz) e una sonda per obesi. Il trasduttore può funzionare in due modalità relative alla circonferenza del torace, che sono S1 per una circonferenza del torace di 45 cm ed S2 per una circonferenza toracica compresa tra 45 e 75 cm. La tecnica è semplice, rapida, non-invasiva, e quindi molto ben accettata dai pazienti. L'esame viene eseguito sul lobo destro del fegato, attraverso gli spazi intercostali con il paziente in decubito dorsale ed il braccio destro in massima abduzione [58,59]. L'operatore, coadiuvato da immagini ecografiche A-Mode (Figura 2), seleziona una porzione di fegato nel lobo epatico destro di almeno 6 cm di spessore, privo di grandi strutture vascolari e biliari [62].

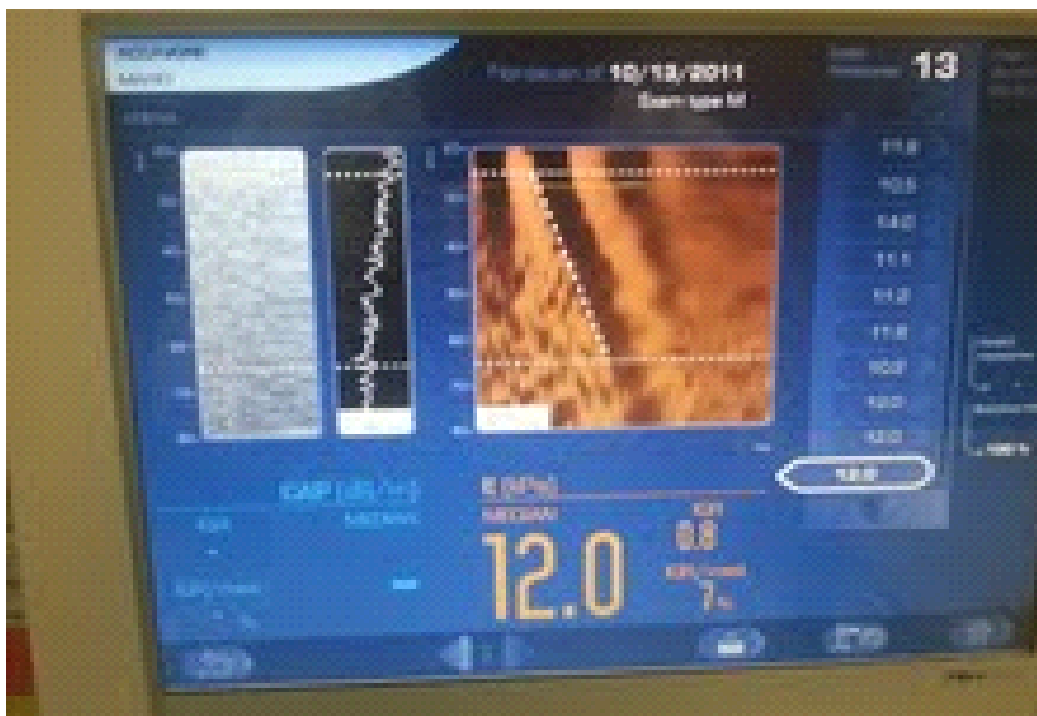


Figura 2. Immagine ecografica A-Mode e relativo elastogramma rappresentativo della velocità di propagazione dell'onda elastica nel tessuto epatico a seconda dello stadio di fibrosi.

Sono considerate rappresentative della misura di rigidità del fegato almeno il 60% delle misurazioni [59,60], che vengono eseguite su un cilindro di tessuto epatico di 1 cm di diametro e 4 cm di lunghezza, un volume che è almeno 100 volte più grande di un campione bioptico [62] (Figura 3).

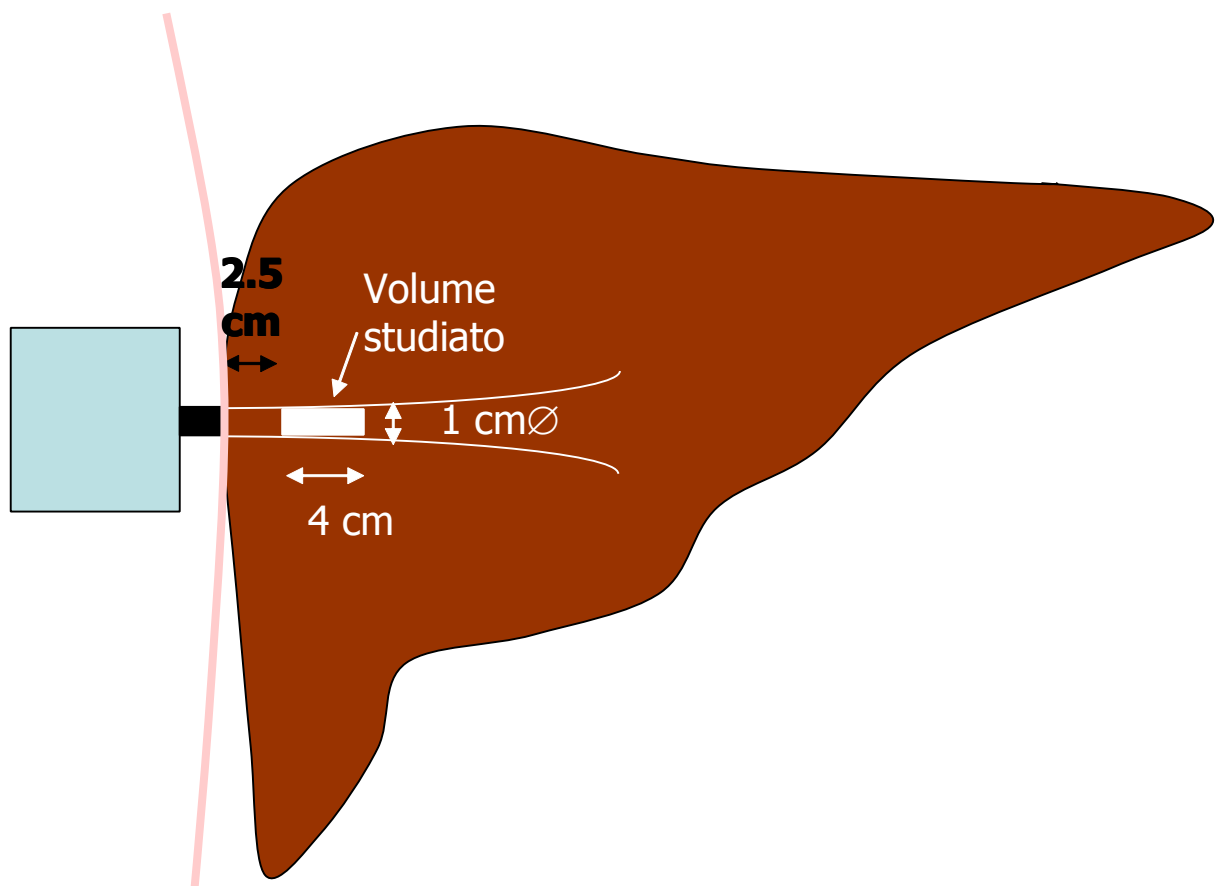


Figura 3. L'indagine viene eseguita in corrispondenza del lobo epatico destro, insonato per via intercostale. La rigidità del parenchima epatico viene misurata su un cilindro di 1 cm di diametro e 2-4 cm di spessore.

Il risultato finale dell'esame è espresso come mediana delle misurazioni valide e, per una buona qualità delle misurazioni, dal range interquartile (IQR), che deve essere inferiore al 30% del valore della mediana.

La misurazione dello stiffness non può essere eseguita in pazienti con ascite, poiché l'onda elastica non si propaga attraverso i liquidi, e in pazienti obesi poiché il grasso attenua sia le onde elastiche che gli ultrasuoni [62,63].

È importante notare che l'elastografia è caratterizzata da un'elevata ripetibilità intra- e inter-osservatore [64, 65].

Tuttavia la ripetibilità inter- e soprattutto intra-osservatore è influenzata da variabili come l'indice di massa corporea (BMI) (in particolare quando ≥ 28) [64], e quindi il valore di stiffness deve essere usato con cautela in coorti di pazienti sovrappeso o francamente obesi. La colestasi è stata recentemente segnalata come un fattore di confondimento che può influenzare lo stiffness [66].

Numerosi studi [58-60,63,67] suggeriscono che l'elastografia è una tecnica efficace per la diagnosi di fibrosi severa, cirrosi (F3 o F4 secondo il sistema di punteggio METAVIR, rispettivamente) e per l'esclusione della fibrosi significativa, cioè $\geq F2$, pertanto potrebbe essere utilizzato come "discriminatore diagnostico" per stabilire le priorità cliniche e ridurre il numero di biopsie epatiche. Questa possibilità è suggerita da uno studio prospettico condotto dal nostro gruppo su pazienti con epatopatia cronica HCV correlata [68].

Nei pazienti che presentavano valori di stiffness ≤ 6 kPa, che suggeriscono l'assenza di fibrosi significativa, o valori di stiffness ≥ 12 kPa, che indicano fibrosi avanzata, la biopsia epatica non è prioritaria. Al contrario, i pazienti che presentano valori intermedi di stiffness, cosiddetta zona "grigia", richiedono la biopsia epatica per una corretta definizione dello stadio di malattia, che è rilevante per la gestione clinica del paziente. In tabella 2 sono riportati i valori di cut-off dello stiffness, suddivisi per patologia ed in relazione allo score METAVIR.

Autori	Eziologia	Valori di cut off dello stiffness			PPV/NPV (%)
		≥F2	≥F3	≥F4	
Castera et al. [59]	HCV	7.1	9.5	12.5	95/48 87/81 77/95
Ziol et al. [58]	HCV	8.8	9.6	14.6	88/56 71/93 78/97
Carrion et al. [72]	HCV post OLT	8.5		12.5	79/92 50/100
Foucher et al. [63]	CLD	7.2	12.5	17.6	90/52 90/80 91/92
Gomez-Dominguez et al. [73]	CLD	4	11	16	88/50 78/76 80/98
Corpechot et al. [74]	PBC/PSC	7.3	9.8	17.3	91/79 84/95 78/99
Kim et al. [75]	CLD	7.3	8.8	15	96/50 78/95 33/97
Arena et al. [68]	HCV	7.8	10.8	14.8	83/79 89/95 73/98

Tabella 2. Valori di cut-off dello stiffness in relazione allo score METAVIR sulla base della prevalenza della patologia. Abbreviazioni: CLD, malattia cronica di fegato i.e. HCV, HBV, epatopatia alcolica e steatoepatite non alcolica; post OLT, dopo trapianto di fegato; PBC, cirrosi biliare primitiva; PSC, colangite sclerosante primitiva; PPV e NPV, valori predittivi positivi e negativi in percentuale.

Sulla base di ciò, Vizzuti et al. [69] hanno proposto un algoritmo per la valutazione non invasiva di evoluzione della fibrosi in pazienti con epatite cronica C. In questo contesto clinico, l'accuratezza diagnostica dell'elastografia potrebbe essere integrata dalla valutazione concomitante di algoritmi biochimici della fibrosi epatica.

In uno studio prospettico, in cui erano stati arruolati 183 pazienti consecutivi con epatite cronica C, la performance diagnostica dell'elastografia è stata confrontata con quella dei marcatori biochimici (FibroTest e APRI) e con la biopsia epatica [59]. La performance diagnostica dell'elastografia si è dimostrata simile a quella di FibroTest e APRI. Inoltre, l'uso combinato dell'elastografia e del FibroTest offriva la migliore prestazione diagnostica sia per la fibrosi significativa ($F \geq 2$), che per la fibrosi severa e la cirrosi (F3-F4). Secondo gli Autori, l'applicazione di due metodi non invasivi potrebbe evitare la biopsia epatica nella maggior parte dei pazienti con epatite cronica C. Marcellin et al. [70] hanno studiato invece una popolazione di 173 pazienti, con epatite cronica B, in cui la performance diagnostica dell'elastografia si è mostrata simile a quella ottenuta in soggetti con infezione da HCV. L'uso dell'elastografia è stato anche inserito tra le raccomandazioni pubblicate da un gruppo di esperti italiani [71] per la sorveglianza della progressione della fibrosi nei pazienti con attiva replicazione dell'HBV (HBV-DNA > 2000 UI/mL) e livelli di ALT normali.

Studi sulle infezioni da HIV-HCV suggeriscono l'utilità dell'elastografia per la valutazione della progressione della fibrosi epatica e della cirrosi [76-78]. Ganne-Carrie et al. [79] hanno suggerito che le prestazioni dell'elastografia nella diagnosi di cirrosi nei pazienti con infezione da HBV rispetto ai pazienti HCV è leggermente inferiore. Pertanto differenti valori di cut-off possono essere impiegati relativamente alle differenti eziologie della cirrosi.

Inoltre, differenti osservazioni in pazienti con epatite cronica B o C suggeriscono che i valori di stiffness possono essere influenzati dal grado di necroinfiammazione, in particolare in assenza di estesa fibrosi (cioè METAVIR F1-F2) con una sopravvalutazione del grado di fibrosi [64,67,80-82]. E' necessario pertanto prendere in considerazione con cautela i risultati dell'elastografia in presenza di elevati livelli di aminotransferasi. Al contrario, la presenza di steatosi lieve nel contesto di un'epatopatia cronica C non sembra influenzare significativamente i valori di stiffness [64]. L'utilità dell'elastografia è stata dimostrata anche in uno scenario opposto, cioè nei pazienti con epatite cronica C con livelli persistentemente normali [83]. E' ben noto che questi pazienti possono presentare una malattia epatica progressiva e sviluppare estesa fibrosi o cirrosi. Pertanto, sarebbero necessarie biopsie epatiche periodiche per valutare la progressione della fibrosi e selezionare i pazienti per il trattamento antivirale. Colletta et al. [84] hanno confrontato le prestazioni dell'elastografia e del FibroTest con la biopsia epatica per rilevare la fibrosi epatica severa in pazienti affetti da HCV con livelli di ALT normali.

In questo studio l'elastografia ha mostrato una correlazione migliore con la biopsia epatica rispetto al FibroTest.

L'utilità dell'elastografia per la valutazione trasversale e longitudinale della fibrosi è stata proposta da alcuni studi [72,85,86].

E' stato ipotizzato che nel prossimo futuro si assisterà ad un aumento dei pazienti con fibrosi avanzata e cirrosi. In particolare, secondo dati epidemiologici relativi all'infezione da HCV il numero dei pazienti con cirrosi istologica aumenterà esponenzialmente nei prossimi 10-15 anni [27]. In termini generali la distinzione precisa fra fibrosi avanzata e cirrosi e la possibilità di stadiazione della cirrosi sarà di fondamentale importanza in termini di diagnosi, terapia e approcci prognostici [28]. Pertanto sarebbe obbligatorio sviluppare e convalidare metodi che potrebbero valutare la regressione della fibrosi dopo terapia antivirale e monitorare la progressione verso la fibrosi e la cirrosi avanzata, in caso di fallimento del trattamento. Inoltre, sarebbe importante sviluppare sistemi non invasivi per la diagnosi di cirrosi "compensata" in termini di progressione di malattia.

L'attuale valutazione istologica dello sviluppo in senso fibrogenico della malattia epatica cronica tende a definire METAVIR F4 come una sorta di stadio finale del processo fibrogenico (cioè la trasformazione del tessuto epatico cirrotico). Tuttavia il passaggio da questa fase iniziale della cirrosi allo scompenso clinico, può richiedere diversi anni o addirittura decenni [88]. In questa fase iniziale della cirrosi, non ci sono efficaci strumenti diagnostici disponibili che possono essere utilizzati al posto di, o in combinazione con la misurazione di HVPG. Alcuni studi [72,89,90] hanno

dimostrato che lo stiffness correla con il grado di pressione portale determinato come HVPG nei pazienti con epatite cronica C e fibrosi avanzata. Questa correlazione sembra eccellente per valori di HVPG al di sotto di un livello di significato clinico (ossia ≤ 10 mmHg), suggerendo una relazione tra progressione della fibrosi e pressione portale nelle fasi precedenti l'ipertensione portale clinicamente significativa. La scarsa correlazione statistica tra stiffness e HVPG per valori > 12 mmHg indica che, al di là di questo limite, il mantenimento ed il peggioramento dell'ipertensione portale dipende da altri fattori quali la circolazione iperdinamica, l'istituzione di shunt extraepatici porto-sistemici e la contrazione attiva di tessuto cicatriziale. Questa osservazione suggerisce che lo stiffness non può essere un metodo efficace per la valutazione delle complicanze correlate all'ipertensione portale. In base a ciò alcuni Autori hanno valutato la possibilità di predire la presenza di varici esofagee con l'elastografia. Kazemi et al. [90] hanno rilevato che lo stiffness è correlato allo stadio delle varici esofagee nei pazienti con cirrosi. In particolare, un valore di stiffness < 19 kPa era altamente predittivo dell'assenza di varici esofagee di grado II. Pertanto gli Autori suggeriscono che lo stiffness potrebbe essere utile nella selezione dei pazienti per lo screening endoscopico. In disaccordo con questa conclusione, Vizzutti et al. [89] non dimostra una relazione fra stiffness e presenza delle varici esofagee e non dimostra una relazione tra stiffness e grandezza delle varici. Indipendentemente da ciò, i metodi non invasivi non sarebbero in grado di fornire segni indicativi di aumento del rischio di sanguinamento (ossia

presenza di segni rossi sovrapposti), che limita l'utilità di questi metodi in tale contesto [91]. Infine, lo studio retrospettivo di Foucher et al. [7] ha suggerito che l'elastografia può anche fornire importanti indicazioni prognostiche nei pazienti cirrotici. In particolare, questi Autori hanno stabilito dei valori soglia per predire la presenza di complicanze dell'ipertensione portale correlate con la cirrosi e con il carcinoma epatocellulare.

SCOPO DELLA RICERCA

Lo sviluppo di metodiche non invasive, in particolar modo dei marcatori sierici e dell'elastografia transiente per la valutazione dello stadio della fibrosi epatica e la loro validazione per l'uso clinico, rappresentano un rilevante avanzamento in epatologia. L'applicazione di queste metodiche da sole o in combinazione, riduce di circa il 50% il numero delle biopsie. Questa peculiarità ne giustifica un ampio utilizzo nella ricerca clinica al fine di individuare lo stadio di fibrosi di molte malattie croniche di fegato, in particolare quelle ad eziologia virale, e di dirigere la pratica clinica verso una diagnosi meno invasiva ma con interventi terapeutici ugualmente mirati ed efficaci. Inoltre, pochi dati sono disponibili sulle prestazioni dei metodi non invasivi per la valutazione della progressione/regressione della fibrosi in studi longitudinali. Ad esempio nel contesto delle epatopatie virali questi metodi possono essere utili per valutare la regressione della fibrosi nei pazienti che ottengono una risposta virologica sostenuta o per monitorare la progressione della fibrosi nei pazienti non trattati.

Alla luce di quanto evidenziato, scopo di questo studio è stato quello di determinare una migliore differenziazione dello stadio di malattia, mediante elastografia, attraverso uno studio dinamico dello stiffness; l'associazione tra terapia antivirale e regressione/progressione della fibrosi; e infine, l'associazione tra farmaci potenzialmente in grado di indurre

danno epatico e fibrosi, al fine di validare questa metodica nelle
epatopatia croniche non virali.

PARTE SPERIMENTALE

TITOLO DEL PROGETTO 1:

**I VALORI DI STIFFNESS SONO INFLUENZATI DA UN PASTO
STANDARDIZZATO IN PAZIENTI CON EPATITE CRONICA
HCV CORRELATA A DIFFERENTI STADI DI EVOLUZIONE
FIBROTICA**

1.1. INTRODUZIONE

L'elastografia transiente (ET) è attualmente impiegata nella pratica clinica per la rilevazione non invasiva della fibrosi epatica, in particolare nei pazienti con epatopatia cronica C [92]. Con tale metodica è stato possibile distinguere tra almeno tre fasi di evoluzione fibrotica: assenza di fibrosi significativa, presenza di fibrosi avanzata/cirrosi ed una fase intermedia spesso definita "zona grigia". Questa distinzione è utile nella pratica clinica per ridurre la necessità di effettuare biopsie epatiche [69] ed in generale l'uso della ET, da sola o in associazione con altre metodiche non invasive, riduce notevolmente il numero delle biopsie epatiche necessarie per una corretta gestione del paziente.

E' sempre più chiaro che fattori come la necroinfiammazione e la colestasi [68,69,93] possano influenzare la valutazione dello stiffness epatico dando luogo ad una sovrastima dello stadio della fibrosi epatica. L'individuazione di altri "fattori confondenti" è rilevante per un uso più accurato della ET nei pazienti con malattia epatica cronica.

In un recente studio di Mederache et al. [94] è stato evidenziato un significativo aumento nei valori di stiffness epatico immediatamente dopo l'ingestione del pasto, e fino a 60 minuti, seguito da una normalizzazione dopo 180 min in un gruppo di pazienti con epatopatia cronica HCV correlata o risolta infezione da HCV senza valutazione istopatologica dello stadio di malattia. Come suggerito dagli Autori, questo incremento potenzialmente confondente nei valori di stiffness è probabilmente dovuto ad una maggiore rigidità del tessuto epatico conseguente ad una risposta fisiologica definita "iperemia post-prandiale" [95,96]. Ciò è dovuto alla possibilità di eseguire l'esame durante l'intero arco della giornata lavorativa e quindi in pazienti con un periodo potenzialmente insufficiente di digiuno.

Pertanto lo scopo di questo studio è stato quello di valutare in modo prospettico i cambiamenti dinamici dello stiffness epatico dopo un pasto standard in una popolazione di 125 pazienti con infezione cronica da HCV, in differenti stadi di evoluzione fibrotica.

1.2. PAZIENTI E METODI

1.2.1. Pazienti

Sono stati inclusi nello studio centoventicique pazienti consecutivi con epatopatia cronica (57 uomini e 68 donne di età compresa tra 20-78 anni).

I criteri di inclusione nello studio sono stati: anormali livelli degli enzimi epatici e presenza di HCV-RNA. I criteri di esclusione sono stati: presenza di ascite all'esame clinico o ecografico, presenza di carcinoma

epatocellulare, malattia epatica acuta o infezione da HBV o HIV, malattia metabolica del fegato, epatite autoimmune, malattia vascolare del fegato, disturbi delle vie biliari, trattamento con farmaci antivirali.

La presenza di abuso alcolico o l'uso di farmaci epatotossici entro i sei mesi precedenti lo studio è stato escluso in tutti i pazienti. Inoltre, sono state escluse le condizioni cliniche potenzialmente interferenti con la ET, ad esempio l'insufficienza cardiaca, o in cui questa tecnica è controindicata, ad esempio la gravidanza. Trentuno pazienti su un totale di 125 sono stati classificati come francamente "cirrotici" e sono stati inclusi nel protocollo di studio senza biopsia epatica, ma su base clinica (storia, reperti fisici), esami di laboratorio (ipoalbuminemia, iperbilirubinemia, INR) e criteri ecografici (margini irregolari, ecostruttura diffusamente disomogenea, rapporto lobo caudato/lobo destro > 0.60, aumento del diametro della vena porta, splenomegalia).

Almeno due criteri di ciascun gruppo sono necessari per la diagnosi di cirrosi. La biopsia epatica è stata eseguita nei restanti 94 pazienti. Lo stesso giorno dello studio, i pazienti sono stati sottoposti ad un'ecografia dell'addome superiore, a misurazione della rigidità epatica tramite ET, a biopsia epatica ecoguidata.

I seguenti parametri clinici e biochimici sono stati determinati nella stessa giornata dello studio: indice di massa corporea, aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT), γ -glutamyl-transpeptidasi (GGT), bilirubina totale, conta piastrinica, INR, albumina, glucosio e creatinina.

Oltre ai primi 31 pazienti classificati come “cirrotici”, sulla base degli esami ematochimici e strumentali, la diagnosi di cirrosi (METAVIR) è stata basata sui risultati della biopsia epatica eseguita al momento dello studio in ulteriori 9 pazienti con METAVIR F4, per un totale di 40 pazienti.

Questi pazienti sono stati sottoposti a esofagogastroduodenoscopia (EGDS) entro una settimana dal giorno dello studio, al fine di valutare la presenza di varici esofagee, gastropatia congestizia e altre anomalie relative all'ipertensione portale. La natura dello studio è stata spiegata a tutti i pazienti, ciascuno dei quali firmava un consenso informato scritto prima dell'inizio dello studio, in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki (revisione di Edimburgo, 2000).

1.2.2. Elastografia transiente

Dopo un'ecografia completa dell'addome superiore, l'elastografia transiente è stata effettuata usando l'apparecchio Fibroscan (Echosens, Parigi, Francia). Le misurazioni sono state effettuate dopo una notte di digiuno (valori basali) e dopo 15, 30, 45, 60, 90 e 180 minuti dopo l'inizio di un pasto liquido (Ensure Plus Drink[®], Abbot Laboratories BV, Zwolle, Olanda): 400 ml, 600 Kcal, 16.7% proteine, 53.8% carboidrati, 29.5% grassi. Tutti i pazienti hanno avuto un tempo massimo di 5 minuti per ingerire il pasto e la fine dell'ingestione è stata presa come tempo zero. Poiché la postura eretta tende a diminuire l'iperemia post-prandiale nei pazienti con cirrosi epatica [97], le misurazioni sono state eseguite nei pazienti in posizione supina dopo la fine del pasto. Prima dell'inizio dello

studio, 400 ml di acqua sono state somministrate a 20 pazienti con epatopatia cronica HCV-correlata (F0: n = 3, F1: n = 5, F2: n = 5, F3: n = 3, F4: n = 4) e le misurazioni sono state effettuate negli stessi tempi (basale, 15, 30, 45, 60, 120 min) per valutare eventuali artefatti dovuti alla somministrazione di un identico volume di liquido. In tutti i pazienti di questa coorte non sono state osservate variazioni apprezzabili dei valori di stiffness dopo l'assunzione del volume di liquido.

Come descritto in precedenza [68], e come suggerito dal fornitore della strumentazione, abbiamo considerato come misure rappresentative il valore mediano di dieci acquisizioni valide, espresso in kiloPascal (kPa), con un tasso di successo di almeno il 60% e con un range interquartile (IQR) sul rapporto tra medie inferiore al 30%.

1.2.3. Biopsia epatica

L'indicazione clinica alla biopsia epatica era quella di valutare l'evoluzione della malattia epatica nei pazienti con epatopatia cronica virale. La biopsia epatica è stata eseguita con metodica eco-guidata sul lobo epatico destro con un ago calibro 16 Gauge (BIOMOL; HOSPITAL Service, Aprilia, Italia) in anestesia locale. Prima dell'avvio della procedura e dopo una notte di digiuno, i pazienti hanno ricevuto 5 mg di diazepam e 5 mg di atropina. I campioni di fegato sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina per la valutazione istologica. Sezioni di tessuto epatico di 5 micrometri di spessore sono state colorate con ematossilina/eosina e tricromia di Masson e sono state esaminate da patologi esperti, in cieco rispetto ai risultati di stiffness e ai dati clinici. Solo campioni di fegato, con una

lunghezza > 25 mm e con almeno 11 spazi portali completi sono stati considerati adeguati per lo studio [29]. La diagnosi istologica è stata stabilita in base a criteri accettati a livello internazionale [98,99]. Fibrosi (F) e attività necroinfiammatoria (A) sono stati valutati semi-quantitativamente secondo il sistema di punteggio METAVIR [99]: la fibrosi è stata valutata su una scala da 0 a 4: F0, fibrosi assente; F1, fibrosi portale senza setti; F2, fibrosi portale con pochi setti; F3, numerosi setti senza cirrosi; F4, cirrosi. L'attività è stata classificata come: A0, assente; A1, lieve; A2, moderata; A3, grave.

1.2.4. Analisi Statistica

Per la valutazione statistica i pazienti inclusi nello studio erano raggruppati come segue: F0-F1 (fibrosi assente o lieve), F2-F3 (fibrosi significativa-avanzata), F4 (cirrosi). Le variabili continue sono state espresse come mediana e range interquartile (IQR) per la loro distribuzione asimmetrica. L'IQR è stato calcolato come differenza fra il 75° ed il 25° percentile. Il confronto tra gruppi di variabili continue è stato eseguito usando la versione asintotica o esatta del Wilcoxon-Mann-Whitney test secondo la dimensione del campione disponibile. Il test di Jonckheere-Terpstra è stato utilizzato per verificare l'esistenza di una tendenza tra lo stadio della fibrosi epatica e lo stiffness [100]. Un modello ordinale generalizzato di regressione logistica (OGLM) è stato usato per valutare l'associazione di S_0 (kPa) e S_{delta} (kPa) con lo stadio di fibrosi. L'OGLM permette di controllare per omoschedasticità il "proportional odds logistic regression model" quando l'assunzione delle linee parallele è soddisfatta [101].

L'odds-ratio ottenuto da tali modelli ordinali è una misura di odds di fibrosi più severa vs. fibrosi meno severa. Le probabilità stimate dall'OGLM sono state tracciate per l'interpretazione clinica dei risultati. Oltre a valutare le curve di probabilità, noi abbiamo confrontato la predittività della fibrosi epatica ottenuta con S_0 e S_{delta} utilizzando il criterio di informazione bayesiano (BIC) [102]. La significatività statistica è stata settata su valori di $p < 0.05$ e tutti i test statistici erano a due code. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando Stata 12.1 (Stata Corp, College Station, TX, USA) insieme al pacchetto OGLM [101].

1.3. RISULTATI

1.3.1. Caratteristiche dei pazienti

I principali parametri clinici e biochimici dei pazienti inclusi nello studio sono elencati nella tabella 1.

	F0-1 (n=50)		F2-3 (n=35)		F4 (n=40)		JT-test
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	P-value
Sesso (M/F)	(17/33)		(19/16)		(20/20)		
Età (anni)	43	19	57	20	58	17	<0.001
ALT (U/L)	45	40	67	45.5	71	52	<0.001
AST (U/L)	35	20	55	31	65	56	<0.001
Bilirubina (mg/dl)	0.6	0.2	0.7	0.4	1.1	0.5	<0.001
GGT (U/L)	33	22	68	67	64	60	<0.001
INR (sec)	1.0	0.1	1.0	0.2	1.1	0.4	<0.001
Piastrine (x 10 ³ /mm ³)	222	64	165	99	115	57	<0.001
BMI (Kg/m ²)	24.8	2.8	26.4	4.8	24.5	5.1	0.740
Creatinina (mg/dl)	0.9	0.1	1.0	0.2	0.9	0.2	0.933
Glucosio (mg/dl)	91	15	92	14	90	24	0.247
Albumina (g/L)	4.2	0.5	4.0	0.6	3.6	0.9	<0.001

Tabella 1. Parametri clinici dei 125 pazienti inclusi nello studio, stratificati per stadio di fibrosi

Abbreviazioni: F0-F4 = stadio METAVIR di fibrosi; IQR = range interquartile; BMI = body mass index; JT = Jonckheere Terpstra test.

Come già accennato, l'inclusione nel gruppo F4 (40 pazienti) derivava dallo stadio istopatologico o dalle caratteristiche cliniche, di laboratorio e dai parametri ecografici. In questo gruppo, 27 pazienti su 40 sono stati classificati come Child-Pugh A, mentre 13 sono stati classificati come Child-Pugh B. La presenza di varici esofagee (VE) è stata rilevata in 20 su 40 pazienti, 8 nel gruppo Child-Pugh A (4 VE grado 1, 4 VE grado 2) e 12 nel gruppo Child-Pugh B (4 VE grado 1, 8 VE grado 2).

1.3.2. Cambiamenti dello stiffness dopo un pasto standard

In assenza di dati precedenti che indicano precisamente il momento in cui si ha il picco dei valori di stiffness post-prandiali, le misurazioni sono state eseguite a 15, 30, 45, 60 e 120 minuti dopo l'inizio del pasto. Sebbene la maggior parte dei pazienti, indipendentemente dallo stadio di fibrosi,

presenta un incremento del picco dopo 30 min, è stata osservata una certa variabilità in alcuni pazienti con un picco a 15 o 45 min. I valori sono ritornati ai livelli basali entro i 120 min in tutti i pazienti, indipendentemente dallo stadio di fibrosi.

Le variazioni dello stiffness epatico sono state valutate mediante i seguenti indici: S_0 = valore basale di stiffness; S_{15-60} = valore a 15, 30, 45, 60 minuti durante il pasto; S_{min} = minimo valore di stiffness; S_{max} = massimo valore di stiffness; S_{Δ} (kPa) = (massimo stiffness – stiffness basale)/stiffness basale, S_{Δ} (%) = (massimo stiffness – stiffness basale)/stiffness basale x 100 (Tabella 2).

Questi indici hanno mostrato un trend crescente con lo stadio di fibrosi, con l'eccezione di S_{Δ} (%) che mostrava una diminuzione del trend ($p < 0.001$, Jonckheere-Terpstra test) come mostrato in figura 1.

	F0-1 (n=50)		F2-3 (n=35)		F4 (n=40)		JT-test P-value
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
S ₀ (KPa)	5.0	1.4	10.7	3.4	21.2	25.7	<0.001
S ₀₁₅ (KPa)	5.9	1.7	12.2	4.3	24.5	27.3	<0.001
S ₀₃₀ (KPa)	6.2	1.8	14.2	5.1	24.9	27.3	<0.001
S ₄₅ (KPa)	5.7	1.4	12.1	5	24.9	28.4	<0.001
S ₆₀ (KPa)	5.5	1.3	11	4.2	22.7	27.7	<0.001
S _{min} (KPa)	5.0	1.4	10.7	3.4	21.2	25.9	<0.001
S _{max} (KPa)	6.7	1.9	13.2	5	25.4	28.7	<0.001
S _{delta} (KPa)	1.9	0.9	2.7	0.8	4.7	2.8	<0.001

Tabella 2. Valori di stiffness basali e dopo pasto in 125 pazienti inclusi nello studio stratificati per stadio di fibrosi

Abbreviazioni: F0-F4 = stadio METAVIR di fibrosi; IQR = range interquartile; JT = Jonckheere Terpstra test; S₀-S₆₀ = valori di stiffness in tempi differenti durante il test del pasto; S_{min} = valori minimi di stiffness durante il test del pasto; S_{max} = valori massimi di stiffness durante il test del pasto; S_{delta} = differenza fra valori minimi e massimi di stiffness durante il test del pasto.

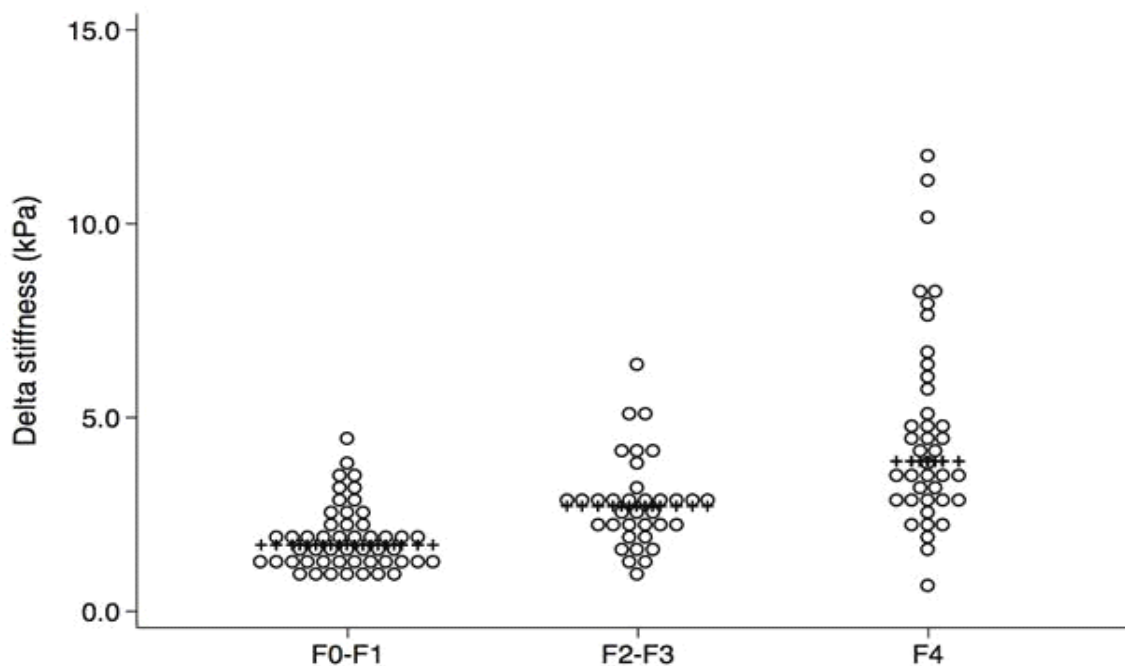


Figura 1. Relazione fra delta stiffness e stadio di fibrosi.

Valori di $S_0 \geq 18$ kPa sono stati associati con una probabilità di fibrosi F4 $\geq 92\%$, analogamente a quanto avevamo precedentemente osservato in una popolazione differente di pazienti con epatopatia cronica HCV-correlata [68]. Anche se la probabilità di diagnosticare la fibrosi è stata anche associata ad S_{delta} (kPa), quest'ultimo non è stato chiaramente superiore a S_0 nel rilevare la probabilità di fibrosi epatica.

La performance peggiore sulla possibilità di diagnosticare la fibrosi, basata su S_{delta} era anche evidente dal confronto del suo valore BIC (332) con quello del modello S_0 (179).

Come mostrato in figura 2, pannello A, anche se la differenza fra gruppi in S_{delta} (kPa) era significativa (exact-p = 0.037), ciò non era utile per discriminare tra Child-Pugh A e B a causa della sostanziale sovrapposizione.

La stessa conclusione vale per la capacità di S_{delta} (kPa) di discriminare tra la presenza o l'assenza di varici esofagee (exact-p = 0.0009) (Figura 2, pannello B). In entrambi i casi, l'uso di S_{delta} (kPa) non mostra nessuno svantaggio quando comparato a S_0 (kPa).

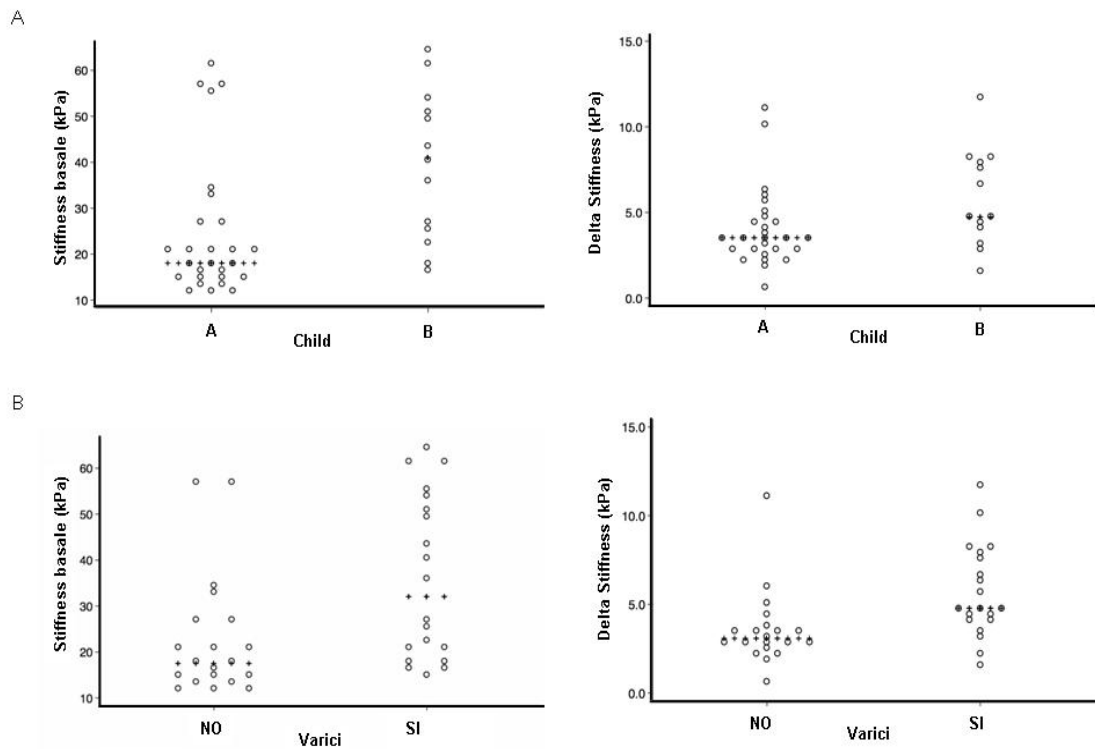


Figura 2. Probabilità dello stadio di Child-Pugh e presenza di varici esofagee sulla base della rigidità basale e della rigidità delta post-pasto nei 40 pazienti cirrotici (METAVIR F4) inclusi nello studio.

1.4. DISCUSSIONE

Negli ultimi dieci anni la ET ha dimostrato di rappresentare uno strumento importante per la valutazione dell'evoluzione fibrotica delle epatopatie croniche, in particolare l'epatite cronica HCV correlata. In questo contesto, l'integrazione della ET e di altri metodi non invasivi come la biopsia epatica ha portato indubbi vantaggi nell'allocazione dei pazienti in diverse classi di progressione di malattia [92,103]. In ragione dell'incrementato

uso della ET nella gestione quotidiana dei pazienti con epatite cronica da HCV, grandi sforzi sono dedicati alla standardizzazione ottimale di questa metodologia in vista del suo inserimento nelle linee guida di pratica clinica. Pertanto, l'identificazione di fattori che inficiano negativamente l'accuratezza diagnostica della ET, i.e. "fattori confondenti", è assolutamente cruciale. Il lavoro di Mederacke et al. [94] ha evidenziato la possibilità che i valori di stiffness possano inficiare la ET, se la ET è condotta immediatamente dopo il pasto.

Considerando che nella maggior parte dei centri l'esecuzione di questo esame è previsto durante l'intera giornata lavorativa e che non ci sono precise raccomandazioni riguardanti il digiuno prima della sua esecuzione, una sovrastima dei valori di stiffness è probabilmente un evento frequente. Anche una sovrastima minore di 3-4 kPa può avere un significativo impatto nell'interpretazione di questo metodo non invasivo, specialmente per gli stadi più bassi di fibrosi (i.e. F0-F2), portando così a errori nella gestione clinica rispetto a quanto proposto dalla flow-chart [69]. Inoltre l'osservazione di un cambiamento "dinamico" dei valori di stiffness dopo un pasto offre un'ulteriore opportunità nell'uso della ET, cioè la possibilità di controllare, in un breve lasso di tempo, cambiamenti dinamici dei valori di stiffness che possono differire nella loro intensità in differenti stadi dell'evoluzione fibrotica della malattia. Di conseguenza, il presente studio è stato progettato al fine di superare i limiti principali dello studio di Mederacke et al. [94]: la categorizzazione dei pazienti non supportata da stadiazione istopatologica, ma piuttosto su valori di stiffness basali, la

manca di standardizzazione del pasto (colazione di circa 600 kcal consumate in un periodo massimo di 30 min), misurazione dei valori di stiffness in momenti non chiaramente correlati con l'iperemia post-prandiale (immediatamente e 60 min dopo l'inizio del pasto). Diversamente dallo studio di Mederacke et al. [94], dove gli Autori non hanno osservato alcun aumento dei valori di stiffness in pazienti con valori basali superiori ai 10 kPa, un valore di cut-off che consente di diagnosticare fibrosi severa o avanzata ma non di cirrosi [68], i risultati del presente studio indicano chiaramente che i valori di stiffness aumentano dopo un pasto standardizzato in pazienti con infezione da HCV a qualsiasi stadio di evoluzione fibrotica e in pazienti con cirrosi compensata. L'incremento dei valori di stiffness, con ritorno ai valori basali entro 120 min, non è solo legato all'assunzione rapida del volume di liquido ma associato all'apporto calorico complessivo del pasto. Il test del pasto con misurazione del flusso sanguigno post-pasto (PBF) è stato suggerito come un test riproducibile e non invasivo per valutare la gravità dell'ipertensione portale nei pazienti cirrotici. L'effetto dell'iperemia post-prandiale sull'ipertensione portale è stato segnalato 30 minuti dopo l'inizio del pasto, sia mediante misurazioni dirette [104] che doppler [105] in pazienti cirrotici. I dati nei soggetti normali e nei pazienti non cirrotici con epatopatia cronica sono scarsi e ottenuti solo col doppler [106-108], ma indicano che un aumento del PBF è rilevabile con doppler anche 30 minuti dopo l'inizio del pasto.

I cambiamenti nei valori di stiffness, conseguenti probabilmente

all'adattamento della microcircolazione epatica con un aumento del PBF [95,96], sono in accordo generale con l'osservazione che l'iperemia post-prandiale è associata ad un maggiore aumento della pressione portale nei pazienti cirrotici. In questo contesto, il progressivo incremento dei valori delta di stiffness con l'evoluzione fibrotica della malattia epatica HCV correlata potrebbe rappresentare un indice indiretto della progressiva compromissione dei meccanismi responsabili della microcircolazione epatica, in particolar modo l'auto-regolazione della circolazione sinusoidale, come conseguenza della fibrosi tissutale, dell'infiltrato infiammatorio e della neo-angiogenesi [109-111].

Nel complesso, questi risultati evidenziano un interessante potenziale della ET nel rilevare i cambiamenti dinamici dello stiffness relativi sia alle modificazioni anatomiche che emodinamiche che si verificano nella progressione dell'epatite cronica HCV correlata. Di conseguenza, abbiamo testato l'aumento del delta di stiffness al fine di valutare la probabilità di fibrosi del fegato in accordo al sistema di stadiazione METAVIR. Mentre i valori basali di stiffness pre-pasto erano piuttosto accurati nel definire la probabilità dello stadio di fibrosi e in accordo con precedenti osservazioni da parte del nostro gruppo in una coorte completamente differente di pazienti con epatopatia cronica HCV-correlata [68], l'analisi della performance dell'incremento del delta stiffness ha rivelato che i cambiamenti nei valori di stiffness che si verificano dopo la prova del pasto non offrono alcun vantaggio per il rilevamento dei differenti stadi di fibrosi, la cui definizione diventa effettivamente meno accurata.

Sebbene questa diminuzione dell'accuratezza sia comune a tutti gli stadi, essa è più marcata per i gruppi F2-F3, cioè da fibrosi significativa ad avanzata.

Tuttavia, sebbene i cambiamenti nei valori di stiffness causati dal pasto non offrano alcun vantaggio nella predizione degli stadi di fibrosi quando comparati con i valori basali, un picco delta di incremento di stiffness ≥ 8 kPa potrebbe ulteriormente confermare la presenza di cirrosi.

Questi risultati evidenziano una generale variabilità nei fattori che regolano l'adattamento della microcircolazione epatica all'iperemia post-prandiale e a loro volta, i cambiamenti dello stiffness epatico. Pertanto, non a caso, i cambiamenti nei valori di stiffness che si verificano dopo il test del pasto non offrono nessun vantaggio per discriminare i pazienti cirrotici con Child A dai Child B e nel predire la presenza o assenza di varici esofagee.

In conclusione, i risultati del presente studio dimostrano definitivamente l'effetto confondente del pasto sull'accuratezza diagnostica delle misurazioni di stiffness e suggeriscono che dovrebbe essere osservato un periodo di digiuno di 120 minuti prima dell'esame.

L'impatto del pasto sulle misurazioni dello stiffness è proporzionale allo stadio della fibrosi con più alti valori delta di stiffness nei pazienti con cirrosi.

In questo stadio specifico di malattia, un incremento del picco delta di stiffness di 8 kPa potrebbe ulteriormente confermare la presenza di cirrosi, sebbene la grande variabilità individuale delle variazioni post-pasto nello stiffness non offra vantaggi diagnostici addizionali quando comparato ai

valori basali di stiffness.

TITOLO DEL PROGETTO 2:

VALUTAZIONE LONGITUDINALE DELLO STIFFNESS EPATICO IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TERAPIA ANTIVIRALE

2.1. INTRODUZIONE

Le malattie croniche di fegato (CLD) sono un importante problema di sanità pubblica a causa della loro morbilità, mortalità e costi economici associati. In particolare, l'epatite C (HCV) colpisce almeno 130 milioni di persone in tutto il mondo [1].

La terapia standard (SOC) con interferone + ribavirina può indurre una risposta virologica sostenuta (SVR, cioè l'assenza di RNA virale dal sangue per almeno sei mesi dopo la fine della terapia) con una percentuale di eradicazione compresa tra il 50 ed il 90% a seconda del genotipo virale. La decisione se iniziare il trattamento antivirale in gran parte dipende da diversi fattori tra cui il genotipo virale, la carica virale, i livelli di ALT e l'istologia epatica; in particolare difficili da trattare sono i genotipi 1 e 4 [8].

Il grado di fibrosi epatica può influenzare negativamente il tasso di risposta alla terapia antivirale, pertanto i pazienti cirrotici che possono avere il massimo beneficio dall'eradicazione virale, presentano le percentuali più basse di SVR. D'altra parte, è stato dimostrato che in pazienti con fibrosi significativa, la SVR può essere associata ad una regressione della fibrosi epatica.

In questo contesto, strumenti non invasivi per la valutazione della fibrosi durante e dopo trattamento potrebbero essere utili per ridurre la necessità delle biopsie epatiche.

La ET è stata proposta come un possibile strumento per la diagnosi di fibrosi non significativa o di fibrosi grave/cirrosi in pazienti con infezione da HCV cronica mostrando una precisione simile a quella riportata per altri metodi non invasivi per la diagnosi della fibrosi epatica come APRI, Forns e FibroTest [58,59,60].

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le modificazioni dei valori di stiffness epatico durante terapia antivirale in pazienti con infezione da HCV e il suo ruolo come possibile fattore predittivo di SVR.

2.2. PAZIENTI E METODI

2.2.1. Pazienti

Lo studio è stato condotto in 416 pazienti consecutivi con epatopatia cronica HCV-correlata seguiti negli ambulatori di epatologia dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi (AOUC) di Firenze per la valutazione dello stadio di malattia epatica e per l'eleggibilità alla terapia anti-virale. Settantaquattro pazienti sono stati ritenuti eleggibili per lo studio in base ai seguenti criteri di inclusione:

1. Presenza di livelli anormali degli enzimi epatici e di dosabilità dell'HCV-RNA
2. Possibilità di trattamento con Interferone peghilato e ribavirina per l'epatopatia cronica HCV-correlata

3. Assenza di cirrosi Child B/C

4. Assenza di carcinoma epatocellulare, malattia epatica acuta, coinfezione con HBV o HIV, malattia metabolica del fegato, epatite autoimmune, malattia vascolare del fegato, disturbi del tratto biliare

5. Assenza di abuso alcolico o uso di farmaci epatotossici

6. Assenza di condizioni cliniche che potevano incidere sullo stiffness, ad esempio insufficienza cardiaca, o in cui questa tecnica o trattamento antivirale è controindicato.

Trenta pazienti avevano genotipo 1a/1b (40.55%), 21 avevano genotipo 2a/2c, 21 avevano genotipo 3a (28.37%), 2 pazienti avevano genotipo 4c/4d (2.71%). Dei 55 SVR, 13 pazienti avevano genotipo 1b o 1a (46.15% avevano il polimorfismo CT dell'IL-28, 46.15% avevano il polimorfismo CC e 7.69 avevano il polimorfismo TT).

I pazienti sono stati trattati con interferone peghilato α -2a (180 mg/week) e ribavirina (800-1200 mg) per 48 settimane (genotipo 1 e 4) o per 24 settimane (genotipi 2 e 3).

Gli esami del sangue e HCV-RNA sono stati controllati prima e durante la terapia, così come a 6, 12, 24, e 36 mesi dopo la fine della terapia. La natura dello studio è stata spiegata ai pazienti, che hanno fornito consenso informato scritto prima dell'entrata nello studio, in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki (revisione di Edimburgo, 2000).

2.2.2. Elastografia transiente

I valori di stiffness sono stati misurati usando il FibroScan® (Echosens, Paris, France), in accordo alle istruzioni della macchina, a livello degli spazi intercostali di destra.

La media di 10 acquisizioni valide, espresse in kiloPascal (kPa), sono considerate come rappresentative della rigidità del fegato. Infatti, solo procedure con 10 acquisizioni valide, con un tasso di successo non inferiore al 60% e un *interquartile range* (IQR) inferiore al 30% dei valori medi, è stato considerato attendibile. I valori di stiffness sono stati misurati all'inizio della terapia, alla fine della terapia e 36 mesi dopo la fine della terapia.

2.2.3. Biopsia epatica

La biopsia epatica è stata eseguita in 21 pazienti (16 SVR e 5 NR). Il giorno stesso dello studio i pazienti sono stati sottoposti a misurazione dello stiffness epatico e a biopsia epatica percutanea ecoguidata. La biopsia epatica è stata effettuata con guida ecografica sul lobo destro del fegato con un ago calibro 16 Gauge, sistema Menghini semiautomatico modificato (BIOMOL, Hospital Service, Aprilia, Italia) in anestesia locale. I campioni di fegato sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina per la valutazione istologica. Le sezioni di tessuto epatico sono state colorate con ematossilina ed eosina e sirius red e sono state esaminate da un patologo esperto non a conoscenza dei risultati di stiffness. Tutti i

campioni di fegato avevano una lunghezza > 25 mm ed includevano almeno 11 spazi portali completi, riflettendo standard adeguati [29]. La presenza di necroinfiammazione (grading) e fibrosi (staging) è stata stabilita secondo il metodo proposto dal gruppo di studio Metavir [98,99].

2.2.4. Analisi statistica

Tutti i risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard. Il confronto numerico dei dati è stato effettuato utilizzando il test *t* di Student per campioni appaiati con correzione di Bonferroni, dopo aver eseguito il test di Levine per la varianza. La significatività statistica è stata fissata a un valore di $p < 0.05$. Al fine di valutare il valore di rigidità come predittore di SVR alla terapia, i 74 pazienti arruolati sono stati suddivisi in due gruppi in base ai valori di rigidità del fegato >12 kPa, corrispondente a una fibrosi grave e cirrosi [68]. I valori predittivi sono stati determinati calcolando il rischio relativo (RR) ed il rischio attribuibile (RA). L'analisi statistica e i grafici sono stati ottenuti utilizzando il software statistico Stata 11 (College Station, TX, USA) e SPSS v18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2.3. RISULTATI

2.3.1. Stiffness prima, durante e dopo trattamento con interferone e ribavirina

Nella popolazione in studio, il valore della rigidità media prima del trattamento era 10.58 ± 7.36 (range 3.60 ± 42.20). I parametri biochimici prima del trattamento sono riassunti nella tabella 1.

Tabella 1: Parametri di laboratorio nei pazienti dello studio prima del trattamento antivirale

Parametri	Valori	Range Normali
Età (anni)	51.09 ± 12.84	
Maschi, n (%)	58,10 %	
BMI (kg/m²)	24.63 ± 3.50	
Viremia (IU/mL)	3321.60 ± 5462.87 (x1000)	
Bilirubina totale(mg/dL)	0.96 ± 0.65	0.30 - 1
Albumina (g/dL)	4.12 ± 0.34	4.20 – 4.76
INR	1.01 ± 0.09	0.8 – 1.2
γ-GT (U/L)	65.02 ± 74.50	10 - 40
AST (U/L)	73.36 ± 55.06	5 - 40
ALT (U/L)	110.39 ± 86.49	5 - 40
Glucosio a digiuno (mg/dL)	99.89 ± 42.49	65 - 110
Piastrine (10⁹/L)	190.71 ± 57.46	140 - 440
Creatinina (mg/dL)	0.79 ± 0.16	0.48 – 1.03

I risultati sono espressi come media ± DS.

Abbreviazioni: BMI, body mass index; INR, international normalized ratio; γ-GT, gamma glutamil-transpeptidasi; AST, aspartato aminotransferasi; ALT, alanina aminotransferasi

Dopo 12 settimane di trattamento, in 12 pazienti l'HCV-RNA risultava ancora dosabile con una riduzione ≤ 2 log della carica virale (NR), tale che il trattamento antivirale è stato interrotto. In questi pazienti i valori di stiffness alla fine della terapia (10.11 ± 4.68 kPa) non erano significativamente diversi da quelli osservati prima dell'inizio della terapia (9.71 ± 4.26 kPa, range 4.10 – 17.3) (95% I.C. 8.06 – 11.76, $p = 0.587$) (Figura 1 B).

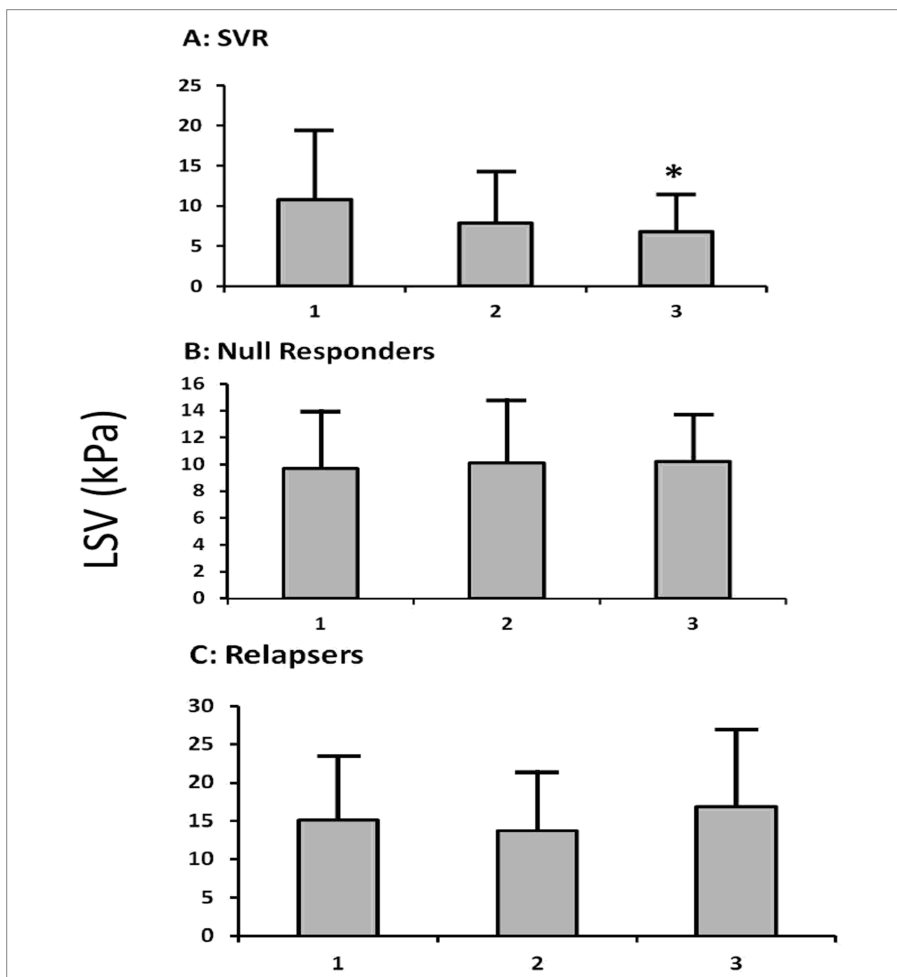


Figura 1. Cambiamenti nei valori di stiffness alla fine del trattamento e dopo tre anni di follow-up. 1) Valori pre-trattamento; 2) valori alla fine del trattamento; 3) valori tre anni dopo il trattamento.

Durante il follow-up post-trattamento, 7 pazienti hanno avuto una recidiva di HCV-RNA entro 24 settimane dopo la fine del trattamento antivirale (relapsers), mentre 55 pazienti hanno avuto una risposta virologica sostenuta (SVR). Venticinque di questi pazienti non erano d'accordo a proseguire il follow-up. Cinquantacinque pazienti hanno mostrato una riduzione dell'HCV-RNA ≥ 2 log (completa risposta virologica precoce, cEVR) o hanno mostrato una riduzione della carica virale (parziale risposta virologica precoce, pEVR) dopo 12 settimane di trattamento e sono risultati successivamente negativi a 24 settimane. In questi pazienti, la terapia antivirale è stata continuata per un totale di 24 o 48 settimane in pazienti con genotipo 2-3 o 1-4, rispettivamente. Alla fine della terapia, sia i pazienti cEVR che pEVR avevano valori di stiffness (6.8 ± 4.86 kPa), che erano significativamente diversi da quelli osservati prima dell'inizio della terapia (9.5 ± 6.88 kPa, range 3.60 – 42.20) (95 % I.C. 6.95 – 9.24, $p = 0.02$).

Tre anni dopo la fine del trattamento, i valori di rigidità erano disponibili per 12 NR, 7 Relapser, e 30 pazienti SVR. Nei pazienti NR, i valori di stiffness prima del trattamento (9.71 ± 4.26 , range 4.10 – 17.30) non erano significativamente differenti da quelli osservati alla fine del trattamento (10.11 ± 4.68 , range 5.4 – 16.9)(95% I.C. 8.06 – 11.76, $p=0.825$) e alla fine del follow-up (10.19 ± 3.43 kPa, range 7.00 – 18.40) (95% I.C. 8.27 – 11.62, $p=0.765$) (Figura 1 B). Anche nei relapsers i valori di stiffness osservati prima del trattamento (15.16 kPa ± 8.20 , range 4.00 – 26.30)

non erano significativamente differenti da quelli osservati alla fine del trattamento (13.73 ± 7.72 , range 3.00 – 23.40) (95% I.C. 10.91 – 21.10, $p = 0.74$) e alla fine del follow-up (16.86 ± 10.00 kPa, range 6.00 – 33.30) (95% I.C. 10.91 - 21.10, $p = 0.734$)(Figura 1 C). In 30 pazienti con risposta virologica sostenuta, i valori di stiffness dopo tre anni di follow-up (6.76 ± 4.58 , range 3.5 - 25) erano significativamente più bassi (95% I.C. 6.92 – 10.64, $p = 0.0141$) rispetto ai valori di inizio trattamento (10.80 kPa ± 8.50 , range 3.60 – 42.20) (Figura 1 A).

2.3.2. Valori di stiffness come possibile indicatore di risposta al trattamento antivirale

I pazienti SVR con valori di stiffness > 12 erano 9, mentre i non responders e i relapsers con valori di stiffness > 12 erano 8. I valori di stiffness > 12 sono risultati significativamente associati ad un'assenza di SVR ($p < 0.025$), con un RR di 2.44 (95% I.C. 1.17 – 5.07) e un RA del 31%.

2.3.3. Biopsia epatica

In 19 di 21 pazienti i valori di stiffness riflettevano lo score METAVIR, in accordo ai cut-off di fibrosi assente, significativa, severa e cirrosi [68]. In 2 pazienti SVR, i valori di stiffness erano più alti rispetto a quelli attesi per lo stadio istologico (numero 12 e 13, tabella 2).

Tabella 2: Caratteristiche cliniche e istologiche di 21 pazienti

	Sesso	Età (anni)	BMI (kg/m²)	LSV (kPa)	Spazi portal esaminati	Metavir A	Score F
1	M	40	25	3.6	20	1	0
2	F	41	23	3.8	11	1	0
3	F	51	23	4.9	12	1	0
4	F	42	21	6.1	11	1	1
5	M	50	22	6.1	13	0	0
6	M	36	23	6.6	11	1	0
7	F	47	22	6.8	12	1	1
8	M	61	27	8.6	24	1	1
9	M	69	25	8.9	12	2	1
10	M	45	21	9	14	1	1
11	F	66	19.5	9.3	14	2	1
12	M	47	25	9.7	11	2	0
13	F	53	21.7	11.3	12	2	0
14	M	44	25	11.8	12	2	1
15	M	43	29.2	17.6	20	2	4
16	F	66	21	6.1	14	1	0
17	M	72	29	8.4	11	1	1
18	F	48	24.6	15.1	14	2	3
19	M	46	28	17.3	12	3	2
20	M	64	24	8.6	12	1	1
21	M	48	28	22.3	13	2	3

Abbreviazioni: BMI, body mass index; LSV, liver stiffness value; A, stadio METAVIR di necroinfiammazione; F, stadio METAVIR di fibrosi.

2.4. DISCUSSIONE

L'elastografia transiente è stata proposta per la valutazione non invasiva della fibrosi epatica nei pazienti con epatite cronica virale [59,60,67,68,112] ed è stato raccomandato come "discriminatore diagnostico" per l'indicazione alla biopsia epatica. Tuttavia, pochi studi [113,114,115] hanno indagato la sua utilità nella valutazione longitudinale della regressione o progressione della fibrosi epatica con o senza terapia antivirale.

Il nostro studio dimostra che in pazienti affetti da epatopatia cronica HCV-correlata con risposta virologica sostenuta dopo SOC terapia, i valori di rigidità del fegato diminuiscono costantemente dopo tre anni di follow-up. Questi dati confermano precedenti osservazioni [113,114,115] che mostravano che la SVR è associata ad una significativa riduzione dello stiffness epatico durante il follow-up post-trattamento.

In accordo con i pochi studi in cui il danno epatico è stato valutato longitudinalmente, tutti i pazienti con risposta virologica sostenuta [113,114,115] hanno mostrato evidenza di valori di stiffness diminuiti anche a fine trattamento.

Nel nostro studio, relapsers e pazienti NR non mostravano variazioni significative dei valori di stiffness epatico, prima, a fine e dopo trattamento antivirale. Questi dati sono in accordo con le osservazioni di Toccaceli et al. [116], che hanno valutato i cambiamenti istologici a lungo termine indotti dal trattamento con interferone sia negli SVR che nei relapsers. Questi Autori non hanno riscontrato una differenza significativa fra i valori

basali ed il post-trattamento. D'altra parte, i dati sono parzialmente in conflitto con le osservazioni di Arima et al. [114], dimostrando che la rigidità epatica (10.6 kPa, range 7-16.6) è significativamente diminuita in 28 relapsers alla fine del trattamento e due anni dopo il trattamento rispetto ai valori pre-trattamento. Non possiamo escludere che il numero limitato di relapsers studiati possa essere responsabile della discrepanza.

La fibrosi epatica è considerata un importante predittore negativo di risposta virale alla terapia con interferone [117,118]. Nel nostro studio è stato evidenziato che la rigidità epatica, anche se non rappresentativa della fibrosi epatica, può anche avere un valore predittivo negativo. I pazienti con valori di stiffness superiori a 12 kPa hanno avuto una risposta significativamente inferiore alla terapia antivirale, suggerendo che la rigidità del fegato dovrebbe essere considerata insieme ad altri predittori prima di decidere della terapia [119], in particolare in coloro che non hanno la possibilità di trarre beneficio da terapie di ultima generazione. In conclusione, i nostri dati suggeriscono che in pazienti con epatopatia cronica HCV-correlata, la misurazione della rigidità epatica prima, alla fine e dopo terapia antivirale può essere un utile strumento per valutare la risposta a lungo termine, probabilmente riflettendo modificazioni sia necroinfiammatorie che di fibrosi. Inoltre la valutazione dello stiffness pre-trattamento come predittore di risposta virologica sostenuta, anche se ha bisogno di essere confermata in coorti più ampie, può essere utile nella selezione dei pazienti.

TITOLO DEL PROGETTO 3:

ELASTOGRAFIA TRANSIENTE PER IL MONITORAGGIO DELLA FIBROSI EPATICA IN PAZIENTI CON ARTRITE REUMATOIDE IN TRATTAMENTO CON METOTREXATE

3.1 INTRODUZIONE

Il Metotrexate (MTX), antagonista dei folati [120], è il trattamento di prima linea più comunemente usato per le malattie infiammatorie croniche tra cui l'artrite reumatoide (AR), la psoriasi e la malattia di Crohn. In particolare, il MTX è considerato un farmaco chiave per il trattamento dell'artrite reumatoide secondo le linee guida dell'American College of Rheumatology (ACR) [121]. La terapia a lungo termine con MTX è associata a un rischio di fibrosi epatica, che sembra essere correlato alla dose giornaliera, alla dose cumulativa, all'abuso di alcool, e alla malattia epatica pre-esistente [19].

Le caratteristiche istologiche legate alla tossicità epatica del MTX vanno dalla steatosi lieve, all'anisonucleosi degli epatociti, alla lieve infiammazione portale e dalla necrosi focale fino ad una più grave necrosi epatocellulare, fibrosi e cirrosi [19]. Le linee guida formulate dall'ACR suggeriscono un controllo regolare (ogni 1-3 mesi) delle aminotransferasi sieriche e dell'albumina. La sospensione del farmaco è consigliata in presenza di un aumento delle transaminasi maggiore di tre volte il limite superiore della norma, mentre la biopsia epatica è consigliata in caso di test di funzione epatica persistentemente alterati dopo la sospensione del

farmaco [121,122]. La presenza di fibrosi epatica dopo trattamento a lungo termine non sembra essere correlata con un aumento delle aminotransferasi o ad altre anomalie negli esami di funzionalità epatica e la sua identificazione si basa solo sulla biopsia epatica [120,123]. Tuttavia, considerando che l'incidenza di fibrosi epatica MTX-indotta sembra essere molto più bassa di quanto si ritenesse, almeno nei pazienti con AR [124], l'indicazione alla biopsia epatica è attualmente molto controversa in questo ambito clinico [125]. In accordo con questa linea di pensiero, una serie di studi recentemente pubblicati ha preso in considerazione la possibilità di monitorare la presenza di fibrosi epatica con metodi non invasivi in pazienti con differenti gradi di malattia epatica cronicamente trattati con MTX [126-129]. Questi studi riguardavano anche l'uso dei valori di stiffness del fegato (LSV), ottenuti tramite la ET, che è sempre più utilizzata nella pratica clinica per la valutazione ed il monitoraggio della progressione della fibrosi epatica in pazienti con epatopatia cronica, in particolare epatite cronica C [68,103]. Due degli studi retrospettivi di cui sopra [128,129] hanno valutato una coorte di pazienti con artrite reumatoide, una situazione clinica in cui un coinvolgimento del fegato è raro o assente rispetto ai pazienti con malattia di Crohn o psoriasi [130,131]. Entrambi gli studi hanno mostrato una percentuale molto limitata di pazienti che presentano anomali valori di stiffness, concludendo che la dose cumulativa non è probabilmente un fattore di rischio per la fibrosi epatica MTX-indotta, come risulta dai valori di stiffness. Tuttavia, questi risultati non consentono conclusioni definitive a causa di una non

adeguata o assente valutazione istopatologica dei pazienti con valori di stiffness superiori al normale valore di cut-off ed una non chiara aderenza al trattamento secondo le linee guida dell'ACR. In particolare, non erano esclusi in modo appropriato la pre-esistenza o la presenza simultanea di test di funzionalità epatica alterati e di disordini epatici che possono potenzialmente causare danni al fegato durante il periodo di trattamento.

Scopo primario di questo studio è stato quello di valutare i determinanti clinici e di laboratorio dell'associazione fra valori di rigidità del fegato, misurati mediante ET (FibroScan $\text{\textcircled{O}}$) e il trattamento di MTX in pazienti con AR, con una dose minima cumulativa di 1500 mg, in assenza di altri fattori predisponenti o che contribuiscono al danno epatico e alla fibrosi. L'obiettivo secondario è stato quello di effettuare una stadiazione istopatologica nei pazienti con anormali valori di stiffness, al fine di fornire ulteriori informazioni sull'utilità pratica della ET nel follow-up dei pazienti con artrite reumatoide trattati cronicamente con MTX.

3.2 PAZIENTI E METODI

Abbiamo contattato telefonicamente 118 pazienti in trattamento con MTX per AR, se ne sono presentati 106, di cui 6 non soddisfavano i requisiti minimi: 1 per la presenza di HCV, 1 per la presenza di HBV, 1 per l'abuso di alcool, 3 per range interquartile (IQR) inferiore al 30%. Lo studio ha incluso 100 pazienti consecutivi (24 uomini e 76 donne, età media 64 ± 25 anni, fascia di età 26-88 anni), seguiti in diversi ambulatori dell'Azienda Sanitaria Fiorentina, Firenze, con la diagnosi di artrite reumatoide. La dose media settimanale di MTX era $10,02 \pm 2,54$ mg per una dose

cumulativa di MTX che variava da 1.530 a 13.000 in un periodo medio di $7,07 \pm 3,89$ anni. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a misurazione dello stiffness epatico nel Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Firenze. I criteri di esclusione sono stati la diagnosi di precedente malattia epatica acuta o cronica sospettata sulla base dei parametri clinici, ecografici e biochimici standard. È stata esclusa in tutti i pazienti la presenza di abuso di alcol o l'uso di farmaci epatotossici oltre MTX nei sei mesi precedenti lo studio. Inoltre, sono state escluse le condizioni cliniche potenzialmente influenzanti la misura dello stiffness epatico, ad esempio, insufficienza cardiaca, o in cui questa tecnica è controindicata, ad esempio, la gravidanza. La natura dello studio è stata spiegata ai pazienti, ciascuno dei quali ha fornito un consenso informato scritto prima dell'inizio dello studio, in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki (revisione di Edimburgo, 2000).

3.2.1 Elastografia transiente

Dopo una notte di digiuno, i pazienti sono stati sottoposti a un esame ecografico completo dell'addome superiore. Subito dopo, è stata effettuata l'elastografia utilizzando l'apparato FibroScan® (Echosens, Parigi, Francia), che consiste in una sonda di 3,5 MHz con un trasduttore ad ultrasuoni montato sull'asse di un vibratore. Le vibrazioni di bassa frequenza (50 Hz) e piccola ampiezza vengono trasmesse al parenchima epatico, inducendo un'onda elastica che si propaga attraverso il parenchima epatico sottostante. La velocità dell'onda è direttamente

correlata alla rigidità del tessuto. La punta del trasduttore è stata coperta con una goccia di gel e collocata perpendicolarmente nello spazio intercostale con il paziente in decubito dorsale ed il braccio destro in massima abduzione. Sotto il controllo TM e A-mode l'operatore sceglieva una porzione di fegato nel lobo epatico destro di almeno 6 cm di spessore, privo di grandi strutture vascolari e della colecisti. La rigidità è stata misurata su un cilindro di tessuto epatico di 1 cm di diametro e 4 cm di lunghezza. Il valore mediano di dieci acquisizioni, espresse in kiloPascal (kPa), è stato ritenuto rappresentativo della misura dello stiffness epatico, con un tasso di successo di almeno il 60%, e con un IQR inferiore al 30%.

3.2.2. Biopsia epatica

Nei pazienti sottoposti all'esame istopatologico, la biopsia epatica è stata effettuata in anestesia locale con guida ecografica sul lobo destro del fegato con un ago calibro 16 del sistema Menghini (BIOMOL, Hospital Service, Aprilia, Italia). I campioni di fegato sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina per la valutazione istologica. Le sezioni di tessuto epatico sono state colorate con ematossilina ed eosina e tricromica di Masson, e sono stati esaminati da un esperto patologo a conoscenza dei risultati della misura dello stiffness epatico. Tutti i campioni di fegato avevano una lunghezza > 25 mm ed almeno 11 spazi portali completi, riflettendo gli standard adeguati [29]. La presenza di necroinfiammazione (grading) e fibrosi (staging) è stata stabilita in accordo al metodo proposto da Kleiner et al. [132], che permette una migliore caratterizzazione del campione in presenza di fibrosi perisinusoidale.

3.2.3. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando StataCorp 2007 Version 10.1 (Stata Statistical Software, College Station, TX, USA). Tutti i risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (DS). L'analisi di regressione lineare tra due variabili è stata eseguita usando il coefficiente di correlazione di Pearson e/o Spearman quando appropriato. L'analisi di regressione multipla è stata effettuata per identificare l'associazione tra valori di stiffness e fattori di rischio di fibrosi epatica. Il confronto numerico di dati continui è stato effettuato mediante t-test di Student. I valori medi di stiffness dei pazienti che hanno ricevuto una dose cumulativa di MTX $<$ o $>$ 4000 mg sono stati confrontati utilizzando i box plot. Solo valori di p inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

3.3. RISULTATI

I parametri demografici, clinici e biochimici dei pazienti inclusi nello studio sono elencati nella tabella 1. Nessun paziente incluso nell'analisi finale mostrava segni clinici e biochimici indicativi di diabete mellito o sindrome metabolica [133]. I valori medi di stiffness riscontrati nella popolazione dello studio erano di 4.93 ± 1.87 kPa, un valore considerato normale nella popolazione generale [134].

Una correlazione statisticamente significativa è stata trovata fra stiffness e dose cumulativa di MTX ($r^2 = 0.64$, $p < 0.0001$) e durata del trattamento ($r^2 = 0.36$, $p < 0.0001$) (figura 1), mentre solo una lieve correlazione è stata riscontrata tra stiffness e ALT ($r^2 = 0.050$, $p = 0.0250$). Inoltre, una lieve correlazione è stata riscontrata anche fra stiffness e BMI ($p < 0.01$), γ GT

($p=0.02$), e la presenza della steatosi all'esame ecografico ($p=0.05$).
All'analisi multivariata, una correlazione significativa è stata riscontrata solo fra stiffness e dose cumulativa di MTX ($p<0.0001$).

Tabella 1: Parametri clinici e di laboratorio nella popolazione dello studio

Parametri	Valori	Range di Normalità
Età (anni)	64.12 ± 12.70	
Maschi, n (%)	24 (24%)	
BMI (kg/m ²)	25.02 ± 4.39	
Dose cumulativa di MTX (mg)	3595.49 ± 1938.58 (1530-13000)	
Tempo medio di somministrazione (anni)	7.07 ± 3.89	
MTX dose/ settimana (mg)	10.03 ± 2.54	
Bilirubina totale (mg/dL)	0.61 ± 0.27	0.30 - 1
Albumina (g/dL)	4.2 ± 0.2	4.20 – 4.76
INR	0.95 ± 0.06	0.8 – 1.2
γ-GT (U/L)	23.9 ± 12.95	10 - 40
AST (U/L)	22.11 ± 7.37	5 - 40
ALT (U/L)	22.28 ± 8.97	5 - 40
Glucosio a digiuno (mg/dL)	89.77 ± 17.60	65-110
Conta delle piastrine (10 ⁹ /L)	257 ± 80	140- 440
Creatinina (mg/dL)	0.77 ± 0.18	0.48 – 1.03

I risultati sono espressi come media ± DS.

* più di 7 unità/settimana

Abbreviations: BMI, body mass index; INR, international normalized ratio; γ-GT, gamma glutamyltranspeptidasi; AST, aspartato aminotransferasi; ALT, alanina aminotransferasi; MTX, metotrexate.

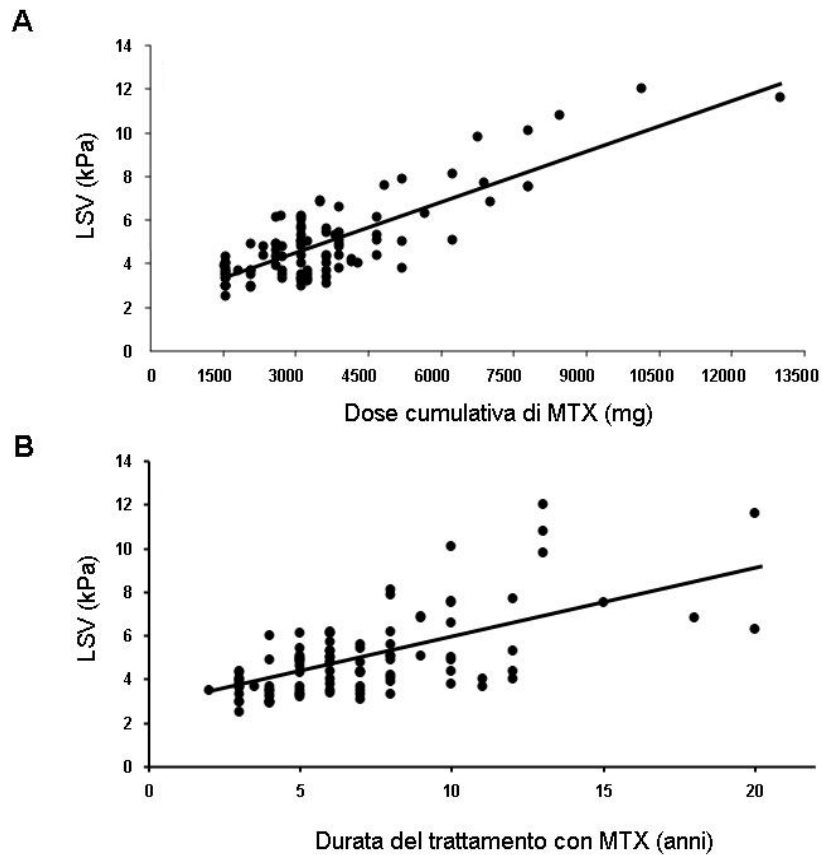


FIGURA 1. Analisi di regressione fra valori di stiffness (LSV), misurati mediante elastografia (Fibroscan^R), e **[A]** dose cumulativa di metotrexate (MTX) ($R^2=0.6775$, $p<0.0001$) e **[B]** durata del trattamento (anni) ($R^2=0.368$; $p<0.0001$).

Come illustrato nella Figura 2, la media dei valori di stiffness nei pazienti che ricevevano una dose cumulativa di MTX ≥ 4000 mg ($n=22$) era significativamente piú alta dei valori medi di stiffness riscontrati nei pazienti che ricevevano una dose cumulativa di MTX ≤ 4000 mg ($n=76$) ($p<0.0001$).

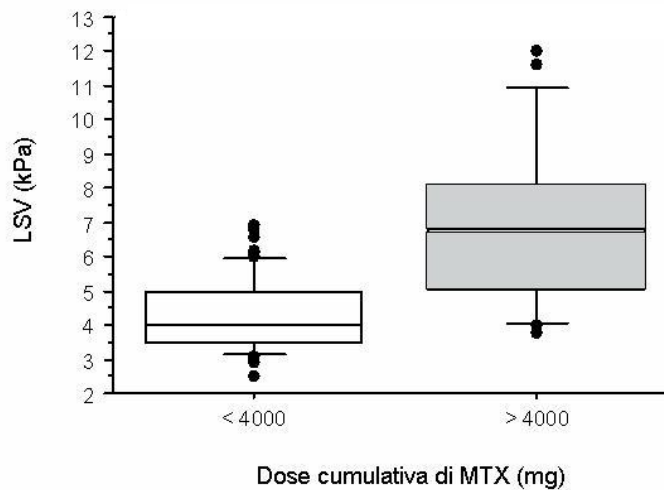


FIGURA 2. Box plot per la distribuzione dei valori di stiffness (LSV), valutati mediante elastografia transiente (Fibroscan^R). La media dei valori di LSV nei pazienti che ricevevano una dose cumulative di MTX ≥ 4000 mg (n=22) era significativamente più alta rispetto ai valori medi di LSV riscontrati nei pazienti che ricevevano una dose ≤ 4000 mg (n=76) ($p < 0.0001$).

La biopsia epatica è stata proposta a 11 pazienti con valori di stiffness ≥ 7.0 kPa ed è stata ottenuta in 5 che hanno accettato di essere sottoposti a tale procedura. Questo valore di cut-off è stato scelto sulla base del recente studio di Colombo et al. [135] (condotto su donatori di sangue senza evidenza di steatosi epatica), che indicava un valore mediano di stiffness di 6.7 kPa al 95° percentile. Come mostrato in Tabella 2, in

questo gruppo di pazienti, la dose cumulativa di MTX variava fra 3510 e 13000 mg e i valori di stiffness fra 7.1 e 11.6 kPa. In 3 pazienti (n. 1-3, Tabella 2) con valori di stiffness di 7.1, 7.2 e 7.7 kPa nessun segno di fibrosi epatica era stato riscontrato all'analisi istopatologica (Kleiner score 0) mentre in 2 pazienti (n. 4 e n. 5, Tabella 2) con valori di stiffness di 9.8 e 11.6 kPa era stata riscontrata la presenza di fibrosi perisinusoidale lieve o moderata (Kleiner score 1A e 1B, rispettivamente). In 4 pazienti su 5, erano stati riscontrati segni minimi di infiammazione lobulare (corrispondenti allo score di Kleiner 1: <2 foci per 200 x campo).

Tabella 2. Caratteristiche cliniche e istopatologiche di 5 pazienti con biopsia epatica

	Sesso	Età (anni)	BMI (kg/m²)	dose cum. MTX (mg)	ALT (U/L)	Anni di tratt.	Score Steatosi*	Spazi portal esaminati	Ishak G	Score S	LSV (kPa)
1	F	41	23.1	3510	20	9	1	12	1	0	7.1
2	F	41	19.7	7020	10	18	0	24	1	0	7.2
3	M	65	26.8	6890	47	12	3	12	1	0	7.7
4	F	48	23.8	6760	17	13	0	14	0	1**	9.8
5	F	73	27.5	13000	37	20	3	14	1	2**	11.6

Abbreviazioni: BMI, body mass index; ALT, alanine aminotransferasi; MTX, metotrexate; LSV, liver stiffness values; Ishak G: grading, S: staging. *: Score della Steatosi, valutato in accordo alla percentuale di epatociti con grasso: 0 (<1%), 1 (1–5%), 2 (5–33%), 3 (33–67%) e 4 (>67%). **: Fibrosi sinusoidale predominante.

3.4. DISCUSSIONE

Il MTX esercita i suoi effetti antireumatici attraverso la poligluttammazione catalizzata dall'enzima folipoligluttammato sintetasi nelle cellule bersaglio (cellule mononucleate, linfociti, o cellule sinoviali), in cui è ritenuto intracellularmente per un lungo periodo di tempo [136]. Il danno epatico MTX-indotto sembra essere dose-dipendente [19] ed è stato interpretato come conseguenza di danno tossico diretto. Pertanto, analogamente ad altri agenti che causano tossicità diretta del fegato (e.g. etanolo), l'entità dei danni acuti o cronici ed il possibile sviluppo di fibrosi epatica sono subordinati ad un'alta variabilità inter-individuale eventualmente collegata a polimorfismi genetici coinvolti nell'assorbimento, nel metabolismo, nell'escrezione, nel trasporto cellulare [15, 16], così come nella fibrosi [17,18]. La fibrosi epatica significativa è stata originariamente segnalata in pazienti con AR e psoriasi cronica trattata con MTX con un'incidenza più alta del 23% [19-23]. Tuttavia, come recentemente riportato da Aithal et al. in una coorte di pazienti affetti da Psoriasi [124], l'incidenza di fibrosi MTX-indotta sembra essere molto più bassa, raggiungendo l'8,2% con dosi cumulative di gran lunga superiori a 1500 mg. Di conseguenza, i pochi studi in cui il danno al fegato MTX-indotto è stato valutato longitudinalmente da biopsie epatiche sequenziali, nessun paziente aveva mostrato evidenza di fibrosi severa e di cirrosi dopo 4 anni di trattamento con una dose cumulativa di MTX approssimativamente di 2000 mg [21,136].

È chiaro che la fibrosi severa e anche la cirrosi nei pazienti trattati cronicamente con MTX sono in gran parte legati alla presenza di concause di danno al fegato, abuso cronico di alcool in particolare [125]. Inoltre è probabile che il MTX aggravi o precipiti

la steatoepatite e la fibrosi nei pazienti a rischio, quali quelli obesi e diabetici [137]. Negli ultimi 10 anni, sono state proposte diverse metodologie per lo screening non invasivo del possibile sviluppo di fibrosi epatica e di cirrosi nei pazienti con malattia epatica cronica [138]. Tuttavia, nessuno di questi metodi è stato finora ampiamente studiato e convalidato in pazienti sottoposti a trattamento cronico con MTX. In questo contesto, solo due studi hanno valutato l'accuratezza diagnostica del propeptide terminale del procollagene di tipo III (PIIINP) nel predire la fibrosi epatica nei pazienti con epatite cronica virale [139,140]. La ET è stata proposta per la valutazione non-invasiva della fibrosi epatica in pazienti con epatite cronica virale [58,59,68,112] e nella steatoepatite pediatrica non alcolica (NASH) [65]. La ET è attualmente raccomandata come "discriminatore diagnostico" per l'indicazione alla biopsia epatica in pazienti con epatite cronica C [69]. Solo due studi recentemente pubblicati hanno indagato la performance dell'elastografia in coorti di pazienti con RA cronicamente trattati con MTX [128,129]. Analogamente a quanto riportato nel nostro studio, entrambi gli studi hanno rilevato che una percentuale molto limitata di pazienti presentava anomali valori di stiffness, in accordo generale con la bassa incidenza recentemente riportata in questo contesto clinico [124]. Nello studio di Park et al. [128], sono stati studiati 177 pazienti con artrite reumatoide trattati con MTX per più di tre anni con una dose media cumulativa di 3988 ± 1566 mg.

Quando veniva considerata l'intera popolazione dello studio, questi Autori non trovavano alcuna correlazione tra stiffness e dose cumulative di MTX. Inoltre, quando i pazienti sono stati divisi in due gruppi, ovvero pazienti che hanno ricevuto una dose cumulativa di MTX <4000 o >4000 mg, la differenza tra lo stiffness medio nei due gruppi non era statisticamente significativa. I limiti principali di questo studio sono

stati la mancanza di esclusione di altri farmaci per il trattamento concomitante della AR potenzialmente capaci di incidere sulla funzionalità epatica, la carenza di informazioni sulla presenza di anomalie della funzionalità epatica durante il periodo di somministrazione del MTX, l'assenza di esame istologico in quei pazienti che presentavano valori anomali di stiffness. Lo studio di Laharie et al. [126] ha indagato un'ampia coorte di pazienti trattati con MTX per differenti patologie e ha incluso 124 pazienti con artrite reumatoide trattati con una dose media cumulativa di MTX di 1950 mg. Analogamente allo studio di Park et al. [128] non è stata osservata nessuna correlazione significativa tra la dose cumulativa di MTX e valori di stiffness e nessuna differenza nella media dei valori di stiffness è stata rilevata nei pazienti con dose cumulativa superiore o inferiore a 1500 mg. Non sono state fornite informazioni riguardanti l'utilizzo di altri trattamenti oltre al MTX e la presenza di anomalie della funzione epatica durante il periodo di somministrazione del MTX. È importante sottolineare che una percentuale significativa di pazienti AR inclusi nello studio presentavano i segni clinici della sindrome metabolica. In questo studio, solo due pazienti con AR con anormali valori di stiffness, cioè 9,9 e 12,4 kPa, e dosi cumulative di MTX di 300 e 5460 mg, rispettivamente, sono stati sottoposti a biopsia epatica. Nel paziente con la dose più alta di MTX, l'analisi istopatologica ha rivelato lesioni compatibili con steatoepatite non alcolica in paziente con obesità patologica e sindrome metabolica. Sulla base dei risultati di cui sopra, questi studi hanno concluso che la ET può essere impiegata per la detezione della fibrosi epatica in pazienti con AR trattati con MTX, sebbene questa indicazione non sia veramente stringente in ragione della scarsa correlazione tra valori di stiffness e dose cumulativa di MTX. In contrasto con le osservazioni di cui sopra i risultati del nostro

studio suggeriscono che i valori di stiffness tendono ad aumentare in parallelo con la dose cumulativa di MTX e che vi è una differenza significativa tra valori di stiffness nei due gruppi con una dose cumulativa di MTX $< 0 >$ a 4000 mg. Inoltre come dimostrato dalla valutazione istopatologica, in due dei cinque pazienti con anormali valori di stiffness e un'alta dose cumulativa in assenza di altri fattori di rischio clinicamente evidenti è stata rilevata fibrosi epatica moderata e significativa. La differenza tra i risultati del nostro studio e quelli degli studi di Park et al. [128] e Laharie et al. [126] potrebbe essere dovuto a differenze nei criteri di inclusione ed esclusione della popolazione di pazienti. Infatti, l'esclusione delle condizioni cliniche che notoriamente portano a danno di fegato e fibrosi come il diabete, la sindrome metabolica, altri agenti potenzialmente epatotossici che includono l'eccessivo uso di alcool, così come di altri fattori che possono influenzare i valori di stiffness [103], ha prodotto un'analisi più accurata degli effetti della somministrazione cronica di MTX sulla rigidità del fegato. Sulla base di questa ipotesi, è possibile che il MTX, in ragione delle sue caratteristiche pro-ossidanti [15,142], induca progressivamente modifiche fibrogeniche nella normale matrice extracellulare perisinusoidale del fegato [143], dando luogo ad un progressivo aumento della rigidità epatica. È importante sottolineare che lo stress ossidativo cronico dei tessuti può causare la sovra-regolazione di geni pro-fibrogenetici (cioè procollagene I alfa-1, fattore di crescita trasformante β 1 e molti altri) nelle cellule stellate epatiche in assenza di necrosi cellulare evidente e infiltrato infiammatorio [144]. Tuttavia, questi cambiamenti potrebbero diventare evidenti morfologicamente solo con elevate dosi cumulative di MTX e possibilmente superiori a 4000 mg. La presenza di steatosi osservata in tre dei cinque pazienti sottoposti a biopsia epatica può riflettere un effetto diretto delle

caratteristiche pro-ossidanti di MTX. Tuttavia, è improbabile che la steatosi nonché la lieve attività necroinfiammatoria osservata in alcuni pazienti influenzi significativamente i valori di stiffness. Un'altra osservazione importante del presente studio è la debole correlazione statistica tra i valori di stiffness e gli enzimi epatici (ad esempio ALT e γ GT) e la presenza/assenza di steatosi all'ecografia è un'ulteriore conferma indiretta che il potenziale fibrogenico del MTX non può essere rilevato esclusivamente dagli indici di funzionalità epatica o dall'ecografia. In conclusione, i risultati del presente studio suggeriscono che un progressivo aumento della rigidità del fegato è associato con una dose cumulativa crescente di MTX in pazienti con AR in assenza di altri fattori di rischio potenziale di danno epatico e fibrosi. Questa osservazione necessita di essere confermata da studi longitudinali attraverso misurazioni seriali dello stiffness durante il trattamento cronico con MTX. Sebbene questo studio sia caratterizzato da un numero limitato di pazienti con anormali valori di stiffness, la presenza di fibrosi MTX-indotta può essere sospettata in presenza di valori di stiffness superiori a 9 kPa e deve essere confermata da biopsie epatiche prima di prendere qualsiasi decisione sul proseguimento o la sospensione del trattamento con MTX o in associazione con altri farmaci con potenziale tossicità epatica. Ovviamente questa possibilità deve essere confermata in una più ampia coorte di pazienti.

DISCUSSIONE, CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La presenza di fibrosi significativa è un'indicazione al trattamento antivirale sia nelle epatopatia croniche B che C. In questi ultimi anni un approccio terapeutico molto più basato sul virus che sul paziente ha ridotto notevolmente il ruolo della biopsia per la valutazione dell'efficacia del trattamento. Questo declino nella rilevanza diagnostica della biopsia, soprattutto nei pazienti con epatopatia cronica HCV correlata ha indotto lo sviluppo di metodiche non-invasive per la "predizione" della fibrosi del fegato [103]. Per quanto concerne i cambiamenti nei valori di stiffness causati dal pasto, si è visto, in accordo col lavoro di Mederacke et al. [94], che non offrono alcun vantaggio nella predizione degli stadi di fibrosi quando comparati con i valori basali. Tuttavia un piccolo delta di incremento di stiffness ≥ 8 kPa potrebbe ulteriormente confermare la presenza di cirrosi. Questi risultati evidenziano una generale variabilità nei fattori che regolano l'adattamento della microcircolazione epatica all'iperemia post-prandiale e a loro volta, i cambiamenti dello stiffness epatico. Pertanto, non solo i cambiamenti nei valori di stiffness che si verificano dopo il test del pasto non offrono nessun vantaggio per discriminare i pazienti cirrotici con Child A dai Child B e nel predire la presenza o assenza di varici esofagee, ma dimostrano l'effetto confondente del pasto sull'accuratezza diagnostica delle misurazioni di stiffness, suggerendo che dovrebbe essere osservato un periodo di digiuno di 120 minuti prima dell'esame.

La ricerca riguardante la valutazione longitudinale della regressione della fibrosi ha ulteriormente messo in evidenza il ruolo dell'elastografia per la valutazione della regressione della fibrosi nei pazienti con epatopatia cronica virale con risposta

virologica sostenuta. Al momento attuale, in cui altri farmaci possono essere utilizzati nei pazienti in cui la terapia ha fallito, l'elastografia e i marcatori non-invasivi potrebbero essere utilizzati per una migliore selezione dei pazienti da ritrattare. In tale prospettiva nello studio longitudinale sull'epatite cronica C, la rilevazione dello stiffness pre-terapia ha permesso di individuare i valori predittivi di stiffness per la risposta alla terapia antivirale, che insieme al polimorfismo dell'IL-28 può fornire più precise indicazioni su un'eventuale risposta alla terapia standard. Questo studio necessita però di essere confermato su un più ampio campione.

Per quanto riguarda invece le epatopatia da farmaci è possibile che il MTX, in ragione delle sue caratteristiche pro-ossidanti [15,142], induca progressivamente modifiche fibrogeniche nella normale matrice extracellulare perisinusoidale del fegato [143] dando luogo ad un progressivo aumento della rigidità del fegato. Tuttavia, questi cambiamenti potrebbero diventare evidenti morfologicamente solo con elevate dosi cumulative di MTX e possibilmente superiori a 4000 mg. I risultati del presente studio suggeriscono che un progressivo aumento della rigidità del fegato è associato con una dose cumulativa crescente di MTX in pazienti con AR in assenza di altri fattori di rischio potenziale di danno epatico e fibrosi. Questa osservazione necessita tuttavia di essere confermata da studi longitudinali attraverso misurazioni seriali dello stiffness durante il trattamento cronico con MTX. La presenza di fibrosi MTX-indotta può essere sospettata in presenza di valori di stiffness superiori a 9 kPa e deve essere confermata da biopsie epatiche prima di prendere qualsiasi decisione sul proseguimento o la sospensione del trattamento con MTX o in associazione con altri farmaci con potenziale tossicità epatica.

Nel complesso di questi studi condotti durante il Dottorato l'elastografia si è dimostrata uno strumento prezioso, se ne conosciamo i limiti, infatti, in alcuni casi è comunque necessaria l'integrazione con altri approcci diagnostici, inclusi la biopsia epatica, per una migliore definizione dello stadio di malattia.

I metodi non invasivi sono inesatti così come la biopsia epatica per la valutazione dello stadio di fibrosi, almeno per come previsto dai metodi semiquantitativi di scoring (vale a dire, METAVIR, Ishak, e altri). Questo poiché la biopsia epatica, quando usata per questo scopo, non è un vero gold standard dato che descrive ma non quantifica la fibrosi e non dà informazioni circa l'evoluzione fibrotica. Quando viene eseguita con standard ottimali e al meglio delle sue potenzialità interpretative, la biopsia epatica può discriminare un fegato senza fibrosi da uno con fibrosi significativa (cioè, METAVIR F2) da uno con caratteristiche distintive di cirrosi. Recentemente, è stato suggerito che alcuni metodi non invasivi possono comportarsi meglio della biopsia epatica per la predizione degli esiti clinici a lungo termine in pazienti con epatopatia cronica [145]. Questa possibilità è stata suggerita dallo studio di Parkes et al. [146] effettuato dopo 7 anni di follow-up in 457 pazienti dello studio ELF originale [46]. Inoltre, gli stessi ricercatori hanno dimostrato che le prestazioni prognostiche del pannello ELF erano significativamente migliori rispetto al MELD o al punteggio Mayo R nei pazienti con cirrosi biliare primitiva. Lo studio di Vergniol et al. [147], aggiunge una grande quantità di informazioni sull'utilità dei metodi non invasivi come indicatori prognostici. Tale studio, effettuato su una coorte di 1.457 pazienti consecutivi con epatopatia cronica HCV correlata in diverse fasi di evoluzione fibrotica, valuta il valore prognostico di diversi metodi non invasivi. Fibroscan e FibroTest hanno un valore prognostico superiore ad altri test non invasivi.

Questo studio dimostra anche i cambiamenti che si stanno verificando in epatologia. È possibile che ulteriori progressi deriveranno dal confronto dei metodi non invasivi con misure quantitative di fibrosi epatica ottenute mediante l'analisi morfometrica, quali il recente collagene proportionate area, che ha dimostrato un'eccellente correlazione con la pressione portale nel paziente cirrotico [47,148]. In tale prospettiva uno studio sulle epatopatie croniche in cui è stata confrontata l'analisi morfometrica ed un pannello di marcatori sierici è attualmente ancora in corso.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO, Fact sheet N°164, June 2011. <http://goo.gl/5m3sY>.
2. 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.
3. Schreiber G, Busch M, Kleinman S, et al. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 1996; 334: 1685-90.
4. Chen SL, Morgan TR. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci* 2006;3:47-52.
5. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13:2436-41.
6. Burra P. Hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2009; 29:53-65.
7. Kim AI, Saab S. Treatment of hepatitis C. *Am J Med* 2005;118:808-15.
8. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C. *J Hepatol* 2011;55:245-64.
9. Puoti C. HCV carriers with persistently normal aminotransferase levels: normal does not always mean healthy. *J Hepatol* 2003;38:529-32.
10. Shiffman ML, Diago M, Tran A, et al. Chronic Hepatitis C in Patients With Persistently Normal Alanine Transaminase Levels. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:645-652.
11. 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.

12. Allain JP. Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. *J Clin Virol* 2006; 36:S12-17.
13. Zanetti AR, Romano L, Zappa A, et al. Changing patterns of hepatitis B infection in Italy and NAT testing for improving the safety of blood supply. *J Clin Virol* 2006; 36:S51-55.
14. WHO. Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. Hepatitis B. Available from: http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf.
15. Ahern MJ, Kevat S, Hill W, et al. Hepatic methotrexate content and progression of hepatic fibrosis: Preliminary findings. *Ann Rheum Dis* 1991; 50:477–80.
16. Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Br J Haematol* 2009;146:489-503.
17. Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, et al. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1227–31.
18. Ventura P, Rosa MC, Abbati G, et al. Hyperhomocysteinaemia in chronic liver diseases: role of disease stage, vitamin status and methylenetetrahydrofolate reductase genetics. *Liver Int* 2005; 25: 49–56.
19. Whiting-O'Keefe QE, Fye KH, Sack KD. Methotrexate and histologic hepatic abnormalities: a meta-analysis. *Am J Med* 1991; 90:711–6.
20. Beyeler C, Reychen J, Thomann SR, et al. Quantitative liver function in patients with rheumatoid arthritis treated with low-dose methotrexate: a longitudinal study. *Br J Rheumatol* 1997;36:338-44.

21. Kremer JM, Alarcon GS, Lightfoot RW Jr, et al. Methotrexate for rheumatoid arthritis: suggested guidelines for monitoring liver toxicity. American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 316–28.
22. Boffa MJ, Chalmers RJ, Haboubi NY, et al. Sequential liver biopsies during long-term methotrexate treatment for psoriasis: a reappraisal. *Br J Dermatol* 1995; 133: 774–8.
23. Malatjalian DA, Ross JB, Williams CN, et al. Methotrexate hepatotoxicity in psoriatics: report of 104 patients from Nova Scotia, with analysis of risks from obesity, diabetes and alcohol consumption during long-term follow-up. *Can J Gastroenterol* 1996; 10: 369–75.
24. Ismail MH and Pinzani M. Reversal of Liver Fibrosis. *Saudi J Gastroenterol* 2009; 15: 72–9.
25. Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol* 2004;40:860-7.
26. Pinzani M, Vizzutti F. Fibrosis and cirrhosis reversibility: clinical features and implications. *Clin Liver Dis.* 2008;12:901-13
27. Seef LB, Everhart JE. Is cirrhosis an inevitable consequence of chronic hepatitis C infection? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3: 840–2
28. Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: The Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000;31:241-6.
29. Guido M, Ruge M. Liver biopsy sampling in chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 2004;24:89-97.
30. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:1449-57.

31. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2614-8.
32. Cadranel JF, Rufat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Hepatology* 2000;32:477-481.
33. Pinzani M. The ELF panel: a new crystal ball in hepatology? *Gut* 2010;59: 1165-67.
34. Wai CT, Greenson J, Fontana R, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518-26.
35. Forns X. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986-92.
36. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-75.
37. <http://www.patentstorm.us/patents/6631330/fulltext.html>
38. Poynard T, Morra R, Ingiliz P, et al. Assessment of Liver Fibrosis: Noninvasive Means. *Saudi J Gastroenterol* 2008; 14:163–73.
39. Ngo Y, Munteanu M, Messous D, et al. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2006;52:1887-96.

40. Ngo Y, Benhamou Y, Thibault V, et al. An accurate definition of the status of inactive hepatitis B virus carrier by a combination of biomarkers (FibroTest-ActiTest) and viral load. *PLoS One* 2008;3:e2573.
41. Naveau S, Gaude´ G, Asnacios A, et al. Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;49:97-105.
42. Lok AS, Ghany MG, Goodman ZD, et al. Predicting Cirrhosis in Patients With Hepatitis C Based on Standard Laboratory Tests: Results of the HALT-C Cohort. *Hepatology* 2005; 42:282-92
43. Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, et al. FibroIndex, a Practical Index for Predicting Significant Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 2007;45:297-306.
44. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006; 43: 1317–25.
45. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 2007; 46:32–6.
46. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004; 127:1704 –13.
47. Calvaruso V, Burroughs AK, Standish R, et al. Computer-assisted image analysis of liver collagen: Relationship to Ishak scoring and hepatic venous pressure gradient. *Hepatology* 2009; 49:1236-44.
48. Konofagou EE. Quo vadis elasticity imaging? *Ultrasonics* 2004;42:331-336.

49. Dickinson RJ, Hill CR. Measurement of soft tissue motion using correlation between A-scans. *Ultrasound Med Biol* 1982; 8:263-71.
50. Wilson LS, Robinson DE. Ultrasonic measurement of small displacements and deformations of tissue. *Ultrason Imaging* 1982; 4:71-82.
51. Ophir J, Cespedes I, Ponnekanti H, et al. Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrason Imaging* 1991;13:111-134.
52. de Korte CL, Pasterkamp G, van der Steen AFW, et al. Characterization of Plaque Components With Intravascular Ultrasound Elastography in Human Femoral and Coronary Arteries In Vitro. *Circulation* 2000;102:617-23.
53. Frey H. Realtime-elastography: a new ultrasound procedure for the reconstruction of tissue elasticity. *Radiologe* 2003; 43:850–5.
54. Friedrich-Rust M, Ong MF, Herrmann E, et al. Real-time elastography for noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188:758-64.
55. Itoh A, Ueno E, Tohno E, et al. Breast Disease: Clinical Application of US Elastography for Diagnosis. *Radiology* 2006; 239:341-50.
56. Wang H, Brylkab D, Suna L-N, et al. Comparison of strain ratio with elastography score system in differentiating malignant from benign thyroid nodules. *Clinical Imaging* 2013; 37:50–5.
57. Fleming IN, Kut C, Macura KJ, et al. Ultrasound elastography as a tool for imaging guidance during prostatectomy: Initial experience. *Med Sci Monit* 2012; 18:CR635-642.

58. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41:48–54.
59. Castera L, Vergniol J, Foucher J, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128:343-350.
60. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003;29:1705–13.
61. Konofagou EE, D'Hooge J, Ophir J. Myocardial elastography--a feasibility study in vivo. *Ultrasound Med Biol* 2002;28:475-82.
62. Beaugrand M. Fibroscan: instructions for use *Gastroenterol. Clin Biol* 2006;30:513–514
63. Foucher J, Castera L, Bernard PH, et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:411–2.
64. Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007; 56:968–973
65. Nobili V, Vizzutti F, Arena U et al. Accuracy and reproducibility of transient elastography for the diagnosis of fibrosis in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008; 48: 442–8.
66. Milloning FM, Reimann S, Friedrich et al. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis. *Hepatology* 2008; 48;1718–23.

67. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006;55:403-8.
68. Arena U, Vizzutti F, Abraldes JG, et al. Reliability of transient elastography for the diagnosis of advanced fibrosis in chronic hepatitis C. *Gut* 2008; 57:1288–93.
69. Vizzutti F, Arena U, Marra F, et al. Elastography for the non-invasive assessment of liver disease: limitations and future developments. *Gut* 2009; 58:157–60.
70. Marcellin P, Ziol M, Bedossa P, et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B. *Liver Int* 2009; 29:242–47.
71. Carosi G, Rizzetto M. Treatment of chronic hepatitis B: Recommendations from an Italian workshop. *Dig Liv Dis* 2008; 40:603-17.
72. Carrión JA, Navata M, Bosch J, et al. Transient elastography for diagnosis of advanced fibrosis and portal hypertension in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:1791–8.
73. Gomez-Dominguez E, Mendoza J, Rubio S, et al. Transient elastography: a valid alternative to biopsy in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:513-8.
74. Corpechot C, El Naggar A, Poujol-Robert A, et al. Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC. *Hepatology* 2006;43:1118-24.
75. Kim KM, Choi WB, Park SH, et al. Diagnosis of hepatic steatosis and fibrosis by transient elastography in asymptomatic healthy individuals: a prospective study of living related potential liver donors. *J Gastroenterol* 2007;42:382-8.

76. De Ledinghen V, Douvin C, Kettaneh A, et al. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:175-9
77. De Ledinghen V, Barreiro P, Foucher J, et al. Liver fibrosis on account of chronic hepatitis C is more severe in HIV-positive than HIV-negative patients despite antiretroviral therapy. *J Viral Hepat* 2008;15:427-33
78. Vergara S, Macias J, Rivero A, et al. The use of transient elastometry for assessing liver fibrosis in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis* 2007;45:969-74
79. Ganne-Carrié N, Ziol M, de Ledinghen V, et al. Accuracy of liver stiffness measurement for the diagnosis of cirrhosis in patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2006; 44:1511–1517
80. Coco B, Olivieri F, Maina AM, et al. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J Viral Hepat* 2007; 14:360–369
81. Arena U, Vizzutti F, Corti G, et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology* 2008; 47:380–384
82. Sagir A, Erhardt A, Schmitt M, et al. Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage. *Hepatology* 2008; 47: 592–5.
83. Castera L, Foucher J, Bertet J, et al. FibroScan and FibroTest to assess liver fibrosis in HCV with normal aminotransferases. *Hepatology* 2006; 43:373–4.

84. Colletta C, Smirne C, Fabris C, et al. Value of two noninvasive methods to detect progression of fibrosis among HCV carriers with normal aminotransferases. *Hepatology* 2005;42:838–45
85. Rigamonti C, Donato MF, Fraquelli M, et al. Transient elastography predicts fibrosis progression in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Gut* 2008; 57:821–7
86. Harada N, Soejima Y, Taketomi A, et al. Assessment of graft fibrosis by transient elastography in patients with recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Transplantation* 2008;85:69–74
87. Pinzani M, Vizzutti F. Fibrosis and cirrhosis reversibility: clinical features and implications. *Clin Liver Dis* 2008;12:901–913
88. Garcia-Tsao G, Bosch J, Groszmann RJ. Portal hypertension and variceal bleeding-unresolved issues. Summary of an American Association for the study of liver diseases and European Association for the study of the liver single-topic conference. *Hepatology* 2008;47:1764–72
89. Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, et al. Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:1290–7
90. Kazemi F, Kettaneh A, N’Kontchou G, et al. Liver stiffness measurement selects patients with cirrhosis at risk of bearing large oesophageal varices. *J Hepatol* 2006; 45:230–5
91. de Franchis R. Evolving consensus in portal hypertension. Report of the Baveno IV Consensus Workshop on Methodology of Diagnosis and Therapy in Portal Hypertension. *J Hepatol* 2005;43:167–176.

92. Castera L. Transient elastography and other noninvasive tests to assess hepatic fibrosis in patients with viral hepatitis. *J Viral Hepat* 2009;16:300-314.
93. Vispo E, Barreiro P, Del Valle J, Maida I, et al. Overestimation of liver fibrosis staging using transient elastography in patients with chronic hepatitis C and significant liver inflammation. *Antivir Ther* 2009;14:187-93.
94. Mederacke I, Wursthorn K, Kirschner J, et al. Food intake increases liver stiffness in patients with chronic or resolved hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2009; 29: 1500-06.
95. Moneta GL, Taylor DC, Helton WS, et al. Duplex ultrasound measurement of postprandial intestinal blood flow: effect of meal composition. *Gastroenterology* 1988;95:1294–301.
96. Sabba C, Ferraioli G, Genecin P, et al. Evaluation of postprandial hyperemia in superior mesenteric artery and portal vein in healthy and cirrhotic humans: an operator-blind echo-Doppler study. *Hepatology* 1991;13:714–8.
97. Iwao T, Oho K, Nakano R, et al. Upright posture blunts postprandial splanchnic hyperemia in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Gastroenterol* 1999;34:359-65.
98. 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.
99. The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;20:15-20.
100. Siegel S, Castellan NJ. *Nonparametric statistics for the behavioural sciences*. New York: McGraw-Hill; 1988.

101. Williams R. Fitting heterogeneous choice models with OGLM. *Stata Journal* 2010;10:540-567.
102. Raftery AE. Bayesian model selection in social research. *Social Methodol* 1995; 25:111-63.
103. Castera L, Pinzani M. Biopsy and non-invasive methods for the diagnosis of liver fibrosis: does it take two to tango? *Gut* 2010;59:861-6.
104. Bellis L, Berzigotti A, Abraldes JG, et al. Low doses of isosorbide mononitrate attenuate the postprandial increase in portal pressure in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2003;37:378-84.
105. Ludwig D, Schwarting K, Korbel CM, et al. The postprandial portal flow is related to the severity of portal hypertension and liver cirrhosis. *J Hepatol* 1998;28:631-38.
106. Gaiani S, Bolondi L, Li Bassi S, et al. Effect of meal on portal hemodynamics in healthy humans and in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1989;9:815-19.
107. Dauzat M, Lafortune M, Patriquin H, et al. Meal induced changes in hepatic and splanchnic circulation: a noninvasive Doppler study in normal humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1994;68:373-80.
108. Zardi EM, Dobrina A, Uwechie V, et al. Postmeal portal flow variations in HCV-related chronic hepatitis and liver cirrhosis with and without hyperdynamic syndrome. *In Vivo* 2008;22:509-12.
109. Shah V, Toruner M, Haddad F, et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222-28.

110. Iwakiri Y, Groszmann RJ. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J Hepatol* 2007;46:927-34.
111. Fernández M, Semela D, Bruix J, et al. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50:604-20.
112. Stasi C, Arena U, Vizzutti F, et al. Transient elastography for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis: the missing tool? *Dig Liver Dis* 2009;41:863-6.
113. Ogawa E, Furusyo N, Toyoda K, et al. The longitudinal quantitative assessment by transient elastography of chronic hepatitis C patients treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. *Antiviral Res* 2009;83:127-34
114. Arima Y, Kawabe N, Hashimoto S, et al. Reduction of liver stiffness by interferon treatment in the patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2010; 40:383-92.
115. Wang JH, Changchien CS, Hung CH, et al. Liver stiffness decrease after effective antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C: Longitudinal study using FibroScan. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25:964-9.
116. Toccacelli F, Laghi V, Capurso L, et al. Long-term liver histology improvement in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon. *J Viral Hepat* 2003;10:126-33.
117. Dalgard O, Bjørø K, Hellum KB, et al. Treatment with pegylated interferon and ribavirin in HCV infection with genotype 2 or 3 for 14 weeks: a pilot study. *Hepatology* 2004;40:1260-5.

118. Bourlière M, Ouzan D, Rosenheim M, et al. Peg interferon alfa 2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in a real life setting: the Hepatys French cohort (2003-2007). *Antiviral Ther* 2012;17:101-10.
119. Andersen ES, Moessner BK, Christensen PB et al. Lower liver stiffness in patients with sustained virological response 4 years after treatment for chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23:41-4.
120. Belinsky GS, Parke AL, Huang Q, et al. The Contribution of Methotrexate Exposure and Host Factors on Transcriptional Variance in Human Liver. *Toxicol Sci* 2007;97:582–94.
121. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines: Guidelines for the management of rheumatoid arthritis 2002 update. *Arthritis Rheum* 2002;46:328-46.
122. Visser K, Katchamart W, Loza E, et al. Multinational evidence-based recommendations for the use of methotrexate in rheumatic disorders with a focus on rheumatoid arthritis: integrating systematic literature research and expert opinion of a broad international panel of rheumatologists in the 3E Initiative. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1086–93.
123. Richard S, Guerret S, Gerard F, et al. Hepatic fibrosis in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate: Application of a new semi-quantitative scoring system. *Rheumatology* 2000; 39:50–4.
124. Aithal GP, Haugk B, Das S, et al. Monitoring methotrexate-induced hepatic fibrosis in patients with psoriasis: are serial liver biopsies justified? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 391–9.

125. Salliot C, van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1100–4.
126. Laharie D, Zerbib F, Adhoute X, et al. Diagnosis of liver fibrosis by transient elastography (FibroScan) and non-invasive methods in Crohn's disease patients treated with methotrexate. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1621-8.
127. Berends MA, Snoek J, de Jong EM, et al. Biochemical and biophysical assessment of MTX-induced liver fibrosis in psoriasis patients: Fibrotest predicts the presence and Fibroscan predicts the absence of significant liver fibrosis. *Liver Int* 2007;27:639-45.
128. Park S-H, Choe J-Y, Kim S-K. Assessment of liver fibrosis by transient elastography in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Joint Bone Spine* 2010;77:588-92.
129. Laharie D, Seneschal J, Schaefferbeke T, et al. Assessment of liver fibrosis with transient elastography and FibroTest in patients treated with methotrexate for chronic inflammatory diseases: a case-control study. *J Hepatol* 2010; 53:1035-40.
130. Mendes FD, Levy C, Enders FB, et al. Abnormal hepatic biochemistries in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:344-50.
131. Viguier M, Allez M, Zagdanski AM, et al. High frequency of cholestasis in generalized pustular psoriasis: Evidence for neutrophilic involvement of the biliary tract. *Hepatology* 2004; 40:452-8.

132. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
133. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433-8.
134. Roulot D, Czernichow S, Le Clésiau H, et al. Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome. *J Hepatol* 2008; 48:606-13.
135. Colombo S, Belloli L, Zaccanelli M, et al. Normal liver stiffness and its determinants in healthy blood donors. *Dig Liver Dis* 2011;43:231-36.
136. Inoue S, Hashiguchi M, Takagi K, et al. Preliminary study to identify the predictive factors for the response to methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Yakugaku Zasshi* 2009;129:843-49.
137. Tishler M, Caspi D, Halperin Z, et al. A prospective analysis of liver biopsies in rheumatoid arthritis patients receiving long term methotrexate therapy. *Rheumatol Int* 1992;12:39-41.
138. Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J Clin Pathol* 2009;62:481-92.
139. Pinzani M, Vizzutti F, Arena U, et al. Technology Insight: non invasive assessment of liver fibrosis by biochemical scores and elastography. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008;5:95-1006

140. Zachariae H, Heickendorff L and Ségaard H. The value of amino-terminal propeptide of type III procollagen in routine screening for methotrexate-induced liver fibrosis: a 10-year follow-up. *Br J Dermatol* 2001; 143: 100-03.
141. Chalmers RJG, Kirby B, Smith A, et al. Replacement of routine liver biopsy by procollagen III aminopeptide for monitoring patients with psoriasis receiving long-term methotrexate: a multicentre audit and health economic analysis. *Br J Dermatol* 2005; 152, 444–50.
142. Hersh EM, Wong VG, Henderson ES, et al. Hepatotoxic effects of methotrexate. *Cancer* 1966;19:600-06.
143. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35:297-306.
144. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008 13;1:5
145. Pinzani M. Noninvasive Methods for the Assessment of Liver Fibrosis: A Window Open on the Future? *Hepatology* 2011;54:1476-7. doi: 10.1002/hep.24584.
146. Parkes J, Roderick P, Harris S, et al. Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Gut* 2010;59:1245-1251.
147. Vergniol J, Foucher J, Terrebonne E, et al. Noninvasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140:1970-1979.
148. Germani G, Burroughs AK, Dhillon AP. The relationship between liver disease stage and liver fibrosis: a tangled web. *Histopathology* 2010;57:773-784.

ABBREVIAZIONI

A = attività necroinfiammatoria secondo lo score METAVIR

ACR = American College of Rheumatology

ALT = Alanina aminotransferasi

AR = Artrite Reumatoide

AST = Aspartato aminotransferasi

BMI = indice di massa corporea

cEVR = completa risposta virologica precoce

CLD = malattia cronica di fegato, i.e. HCV, HBV, epatopatia alcolica e steatoepatite non alcolica

CPA = collagene proportionate area

EC = epatopatie croniche

EGDS = esofagogastroduodenoscopia

ELF = European Liver Fibrosis

ET = elastografia transiente

EV = varici esofagee

F = stadio della fibrosi secondo lo score METAVIR

HBV = virus dell'epatite B

HCV = virus dell'epatite C

HIV = virus dell'immunodeficienza acquisita

HVPG = gradiente di pressione venosa epatica

INR = International Normalized Ratio

IQR = range interquartile

JT = Jonckheere Terpstra test

kPa = kiloPascal

LSV = liver stiffness value

MMP = metalloproteinasi

MTX = Metotrexate

NASH = steatoepatite non alcolica

NPV = valori predittivi negativi

NR = null responders

OGLM = modello ordinale di regressione logistica

PBC = cirrosi biliare primitiva

PBF = flusso sanguigno post-pasto

pEVR = parziale risposta virologica precoce

PIIINP = propeptide terminale del procollagene di tipo III

Post OLT = dopo trapianto di fegato

PPV = valori predittivi positivi

PSC = colangite sclerosante primitiva

TGF β = Transforming growth factor beta

TIMP = Inibitori delle metalloproteinasi

RA = rischio attribuibile

RR = rischio relativo

SOC = terapia standard

SVR = risposta virologica sostenuta

PUBBLICAZIONI

- Arena U*, **Stasi C***, Vizzutti F, Moscarella S, Marra F, Pinzani M, Laffi G. *UA e CS hanno contribuito nella stessa maniera allo studio. Ruolo dell'elastografia transiente nell'identificazione della fibrosi in pazienti con epatopatia cronica HCV correlata. Atti dell'Incontro annuale della Sezione Toscana – Umbria della Societa' Italiana di Medicina Interna. Arezzo 23 gennaio 2010.
- Arena U, **Stasi C**, Cannoni A, Benucci M, Maddali-Bongi S, Cammelli D, Assarat A, Marra F, and Pinzani M. Liver stiffness correlates with methotrexate cumulative dose in patients with rheumatoid arthritis. Dig Liv Dis 2012;44:149-53.
- **Stasi C**, Arena U, Zignego AL, Corti G, Monti M, Triboli E, Pellegrini E, Renzo S, Leoncini L, Marra F, Laffi G, Milani S and Pinzani M. Longitudinal assessment of liver stiffness in patients undergoing antiviral treatment for hepatitis C. Proceedings dell' EASL-AASLD Special Conference on Therapy of Hepatitis C: Clinical application and drug development. 14-16 Settembre 2012, Praga
- Arena U*, Platon M*, **Stasi C**, Moscarella S, Assarat A, Bedogni G, Piazzolla V, Badea R, Marra F, Mangia A and Pinzani M. * UA and MP contributed equally to this study. Liver stiffness influenced by a standardized meal in patients with chronic hepatitis at different stages of fibrotic evolution. Accettato da rivista con I.F.

- **Stasi C**, Arena U, Zignego AL, Corti G, Monti M, Triboli E, Pellegrini E, Renzo S, Leoncini L, Marra F, Laffi G, Milani S and Pinzani M. Longitudinal assessment of liver stiffness in patients undergoing antiviral treatment for hepatitis C. Sottomesso a rivista con I.F.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare il Prof. Pinzani, che è stato il mio Tutore per gran parte degli anni del Dottorato e con il quale sono iniziati vari progetti di ricerca ed il Prof. Laffi, per la disponibilità, i consigli e l'ospitalità nel Reparto di Medicina Interna ed Epalogia.

Ringrazio il Dr. Arena con il quale, ancora prima del Dottorato, iniziai a collaborare e a usare il fibroscan per motivi di ricerca clinica.

Inoltre, vorrei esprimere la mia gratitudine al Prof. Marra, alla Prof.ssa Zignego, al Dott. Corti, alla Dott.ssa Mangia, alla Dott.ssa Platon per la loro preziosa collaborazione e a tutti gli altri Colleghi che hanno contribuito alla realizzazione di queste ricerche.

Ringrazio il Prof. Milani per la disponibilità, i validi consigli e le collaborazioni scientifiche tuttora in corso.

Intendo poi ringraziare il Prof. Dhillon, sottolineando la particolare disponibilità di tutto il Department of Cellular Pathology del Royal Free di Londra per la loro preziosa collaborazione.

Ringrazio inoltre la Dott.ssa Moscarella, Responsabile del DH e tutti gli infermieri, in particolare Elisabetta, infermiera del DH.

Infine, ho desiderio di ringraziare con affetto la mia mamma Caterina e tutta la mia famiglia, in particolare i miei fratelli, Luigi e Maria, i miei affettuosi cognati, Pina e Pietro, i miei nipoti Vincenzo, Caterina, Domenico, Vincenzo jr, Bruno e Gemma per il prezioso sostegno ed il grande amore che mi hanno dato in ogni momento della vita.

Ringrazio inoltre gli Amici veri, che rendono la vita serena nonostante le difficoltà.