



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Fisiopatologia delle Malattie di Fegato
Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (DiBiMIS)
Settore Scientifico Disciplinare Med/09

ESPRESSIONE DI VEGF, HSP90 E Bip/GRP78 E RICORRENZA DI CARCINOMA EPATOCELLULARE DOPO TRAPIANTO DI FEGATO

IL DOTTORE
Dr. SVEVA CORSALE

IL COORDINATORE
Prof. PIERO ALMASIO

IL TUTOR
Dr. LYDIA GIANNITRAPANI

CICLO XXIV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

TESI DELLA Dr.ssa S.CORSALE PER IL DOTTORATO IN “FISIOPATOLOGIA DELLE MALATTIE DI FEGATO”.

Epidemiologia

Il carcinoma epatocellulare è diagnosticato in più di mezzo milione di persone nel mondo ogni anno. Esso rappresenta il quinto cancro in ordine di frequenza, la terza causa di morti cancro-correlate ed il 7% di tutte le neoplasie maligne (1).

L'epatocarcinoma costituisce oltre il 90% dei tumori maligni primitivi del fegato ed è un importante problema di salute mondiale. Infatti, l'HCC è una neoplasia con una severa prognosi, in quanto nella maggior parte dei casi si sviluppa su una sottostante cirrosi epatica, può avere uno sviluppo multifocale, si presenta con caratteristiche di elevata farmacoresistenza, insorge su pazienti con severe turbe emocoagulative, condizioni, queste, che spesso limitano la possibilità terapeutiche.

Negli ultimi anni, però, la diffusione di procedure di screening e l'introduzione di nuove possibilità terapeutiche hanno condotto ad una migliore aspettativa di vita per questi pazienti. E' chiaro, però, che per ottimizzare l'applicabilità dei nuovi trattamenti la migliore arma ad oggi disponibile è la diagnosi precoce. Per questo motivo le linee guida delle principali associazioni mondiali per lo studio delle malattie del fegato, (EASL, AASLD), hanno consigliato l'attivazione di programmi di sorveglianza per i soggetti a rischio. Ed è proprio grazie alla diagnosi precoce che, rispetto alle decadi passate, l'HCC è divenuto da una quasi universale sentenza di morte, una neoplasia che può essere curato con apprezzabile frequenza.

L'incidenza di HCC aumenta progressivamente con l'età, raggiungendo un picco a 70 anni (2). Nelle popolazioni dei Cinesi e degli Africani, l'età media dei pazienti con il tumore è apprezzabilmente più bassa. Ciò è in netto contrasto con il dato che si registra in Giappone, dove l'incidenza di epatocarcinoma è più alta negli uomini di età 70-79 anni (3). L'HCC ha una forte preponderanza nel sesso maschile, con un rapporto maschi/femmine di 4:2 (1) .

A livello mondiale si registra un incremento di incidenza dell'epatocarcinoma. Complessivamente i tassi di incidenza e mortalità nel 2008 sono stati, rispettivamente di 65.000 e 60.240 casi in Europa e di 21.000 e 18.400 casi negli Stati Uniti. È stato stimato che dal 2020 il numero di casi raggiungerà, rispettivamente, i valori di 78.000 e 27.000 casi, rispettivamente.(1) Le persone infettate dall'HCV in Europa negli anni 1940-1960 e negli USA negli anni 1960-1970 giustificano l'attuale aumento di incidenza dell'HCC (4). In Europa, i tassi di incidenza e mortalità riportati sono abbastanza eterogenei da Nord a Sud (5). Negli Stati Uniti il tasso di mortalità per HCC sembra aver avuto un incremento del 40% nel periodo 1990-2004, mentre il tasso complessivo di morti per cancro si è ridotto del 18% nello stesso periodo (6). La sopravvivenza a 5 anni è stata stimata del 15% circa in USA tra il 2002 - 2008, e di circa il 12% in Europa tra 2000 - 2007 (5)

Oltre che alla comparsa dell'epatopatia dovuta all'epatite C, tale crescita di incidenza può anche essere ricondotta all'aumento di epatocarcinomi HBV-correlati, in particolare tra gli immigrati provenienti da nazioni endemiche.

Infine, l'effetto della vaccinazione generale nell'infanzia contro l'HBV ha ridotto il tasso dell'epatocarcinoma HBV-correlato nelle nazioni di endemia. Finora questo trend è stato osservato nei bambini di Taiwan, ma ci si aspetta che divenga più evidente con la crescita dei bambini vaccinati (7).

Fattori di rischio

Il 90% circa degli HCC è associato ad un fattore di rischio conosciuto, tra i quali i più frequenti comprendono i virus delle epatiti virali B e C, l'abuso di alcool e l'esposizione ad aflatossine. In Africa e in Asia orientale, la frazione più ampia, pari al 60%, è attribuibile al virus dell'epatite B, mentre nel mondo occidentale solo il 20% dei casi può essere attribuito all'infezione da HBV mentre il virus dell'epatite C appare come il maggior fattore di rischio (8). A livello mondiale, circa il 45% dei casi può essere attribuito all'infezione da HBV (che interessa globalmente quasi 400.000.000 persone), mentre il 31% è attribuibile all'infezione da HCV (che interessa 170.000.000 persone), con il rimanente 15% circa associato ad altre cause (9).

La cirrosi è un importante fattore di rischio per l'HCC. Tutte le forme eziologiche di cirrosi possono complicarsi con la comparsa del tumore, ma il rischio è più alto nei pazienti con

infezioni da virus dell'epatite (HBV, HCV, HBV-HDV). Tuttavia, un terzo dei pazienti cirrotici svilupperà l'epatocarcinoma durante la propria vita (10). Il rischio cumulativo a 5 anni nei pazienti cirrotici oscilla tra il 5% ed il 30% in relazione alla causa (con il rischio più alto nei soggetti con infezione da HCV), alla regione e al gruppo etnico (17% negli USA e 30% in Giappone), ed allo stadio della cirrosi (con il rischio più alto in coloro che hanno una malattia scompensata) (11). In generale, le caratteristiche di severità dell'epatopatia (conta piastrinica inferiore a 100×10^3 ; presenza di varici esofagee), insieme all'età avanzata e al sesso maschile, correlano con lo sviluppo di epatocarcinoma nei pazienti cirrotici (12). Più recentemente l'ADRESS score, che tiene conto di età, diabete, razza, eziologia, sesso e severità della malattia, si è affermato uno strumento utile nel predire ad 1 anno il rischio di insorgenza di HCC nei pazienti con cirrosi (13).

Numerosi studi hanno identificato fattori legati all'HBV come predittori dello sviluppo di HCC in pazienti con malattia di fegato. In una meta-analisi di Cho et al (14) che includeva 37 studi caso-controllo e 10 studi di coorte, l'odds ratio per HCC fu stimato essere 13.5 per pazienti con infezione HBV rispetto a quelli senza infezione HBV (15). L'HBsAg positività, il genotipo C e l'alta carica virale, sono predittori indipendenti dello sviluppo di epatocarcinoma (16)(15). I pazienti con infezione da HBV possono sviluppare l'epatocarcinoma anche in assenza di cirrosi, in seguito all'integrazione del genoma virale all'interno del DNA della cellula ospite, ma nella maggior parte dei casi (70-80%) il tumore si instaura su una cirrosi pre-esistente (17).

Il rischio stimato di HCC è da 15 a 20 volte più alto tra i soggetti infetti dall'HCV rispetto ai non infetti; predittori tra gli infetti da HCV includono un'età più avanzata al momento della diagnosi, il sesso maschile, la coinfezione con HIV o HBV e, probabilmente, il diabete e l'obesità (18). In una recente meta-analisi, il genotipo 1b dell'HCV è stato anche chiamato in causa come responsabile dell'aumento del rischio di sviluppare il tumore (19). L'HCV, attraverso la cirrosi epatica, è il maggior contribuente di HCC; è auspicabile che l'avvento dei nuovi farmaci contro questo virus, grazie alla loro efficacia possano diminuire nei prossimi anni il peso che questo virus dà allo sviluppo di HCC.

L'abuso prolungato di alcool è un ben definito fattore di rischio per l'epatocarcinoma, sia indipendentemente (con il rischio aumentato di un fattore oscillante da 1.5 a 2.0), sia in combinazione con l'infezione da HCV e, in minore entità, con l'infezione da HBV. L'alcool di

per se non è un cancerogeno e la degenerazione neoplastica avviene sempre attraverso la cirrosi alcolica.

L'esposizione alimentare all'aflatossina B1, contenuta nei funghi *Aspergillus flavus* ed *Aspergillus parasiticus*, è un importante cofattore per lo sviluppo dell'HCC in alcune aree dell'Africa e dell'Asia. Queste muffe sono ubiquitarie in natura e contaminano un gran numero di derrate alimentari nelle regioni tropicali e sub-tropicali. Studi epidemiologici hanno mostrato una forte correlazione tra l'introduzione dietetica di aflatossina B1, mutazione di TP53 ed incidenza di epatocarcinoma, specificamente negli individui HBV-infetti (20).

L'obesità, il diabete e la steatosi sono stati riconosciuti come cause di carcinoma epatocellulare, sebbene il meccanismo secondo cui queste sovrapposte condizioni contribuiscano alla genesi tumorale rimanga vago (21). In studi basati su coorti di popolazione è stato osservato che l'HCC si sviluppava da 1.2 a 2.0 volte con maggior probabilità in persone obese piuttosto che non obese (18). Molti studi hanno mostrato che, in media, è due volte più probabile che la neoplasia si sviluppi in persone affette da diabete di tipo 2 che in persone che non hanno il diabete (23). La NAFLD, che è presente in oltre il 90% delle persone obese ed in oltre il 70% dei soggetti affetti da diabete di tipo 2, è stata proposta come fattore di rischio per l'HCC (24). La cirrosi epatica conseguente ad una steatoepatite non alcolica può progredire in HCC come tutte le altre forme di cirrosi.

Diversi studi, condotti in Giappone e nel Sud Europa, hanno mostrato che il consumo di **caffè** è associato ad una riduzione del rischio di epatocarcinoma. Più recentemente uno studio americano ha dimostrato che un aumentato consumo di caffè si associava, in modo dose dipendente, con un più basso rischio di incidenza di HCC e di mortalità in generale per malattia cronica di fegato in tutti i gruppi etnici (25). Lo stesso risultato è venuto fuori da una indagine europea sul consumo di caffè e the (26). Con quale meccanismo il caffè possa avere effetto protettivo rimane ancora sconosciuto. Il consumo di caffè è stato anche associato con ridotti livelli di insulina e ad un ridotto rischio di diabete di tipo 2 (17).

I pazienti con **emocromatosi** sviluppano l'HCC in oltre il 45% dei casi, più spesso su una pre-esistente cirrosi. Il carcinoma epatocellulare è, anche, ben documentato come complicazione della cirrosi da deficit di alfa-1-antitripsina. Occasionalmente

l'epatocarcinoma si sviluppa in pazienti affetti dalla malattia di Wilson, ma solo in presenza di cirrosi (EASL, 2012).

L'evidenza epidemiologica di un legame tra il **fumo di sigaretta** e la comparsa di HCC è sempre stata controversa (21), ma prove recenti sostengono che l'abitudine al fumo costituisca un chiaro cofattore di rischio interagendo negativamente con le concomitanti infezioni da virus B o C dell'epatite (28). I forti fumatori hanno un rischio più alto dei non fumatori ma i dati sono abbastanza eterogenei (29).

Bersagli molecolari e vie di segnalazione alterate nell'HCC

L'epatocarcinogenesi è un processo complesso e multi-step che risulta dalla combinazione alterazioni genetiche ed epigenetiche (tab 1). Nelle ultime decadi numerosi studi sono stati eseguiti per identificare molecole chiave interessate nello sviluppo e nella progressione dell'epatocarcinoma.

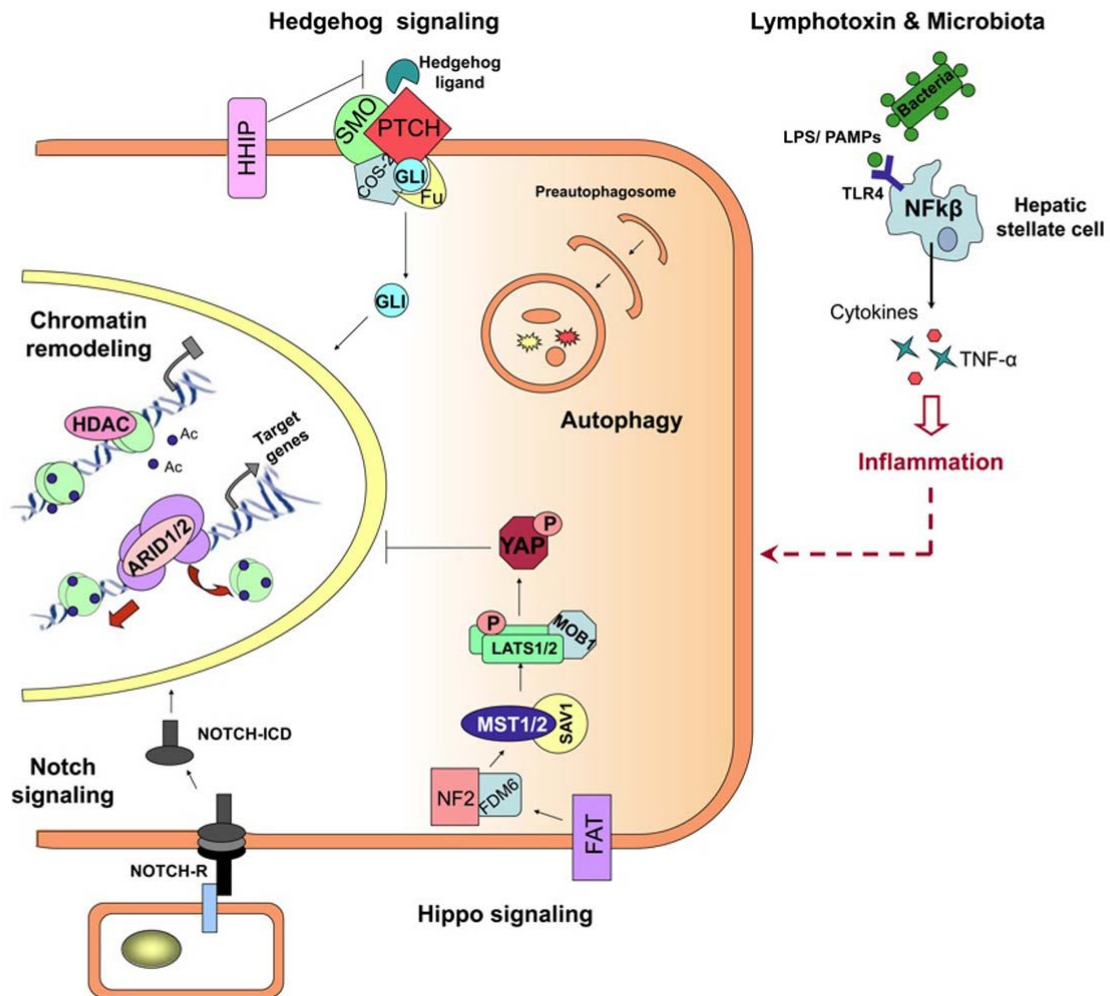


Tabella 1

Numerosi studi hanno dimostrato la sostanziale eterogeneità genetica degli HCC e l'alterazione di molte vie di segnalazione è già stata descritta nella proliferazione cellulare, nell'angiogenesi, nell'invasione e nella capacità metastatica del HCC.

Le informazioni attualmente disponibili su una possibile classificazione dell'HCC su base molecolare hanno fornito risultati contrastanti e non ancora utilizzabili nella pratica clinica.

Il motivo principale è probabilmente la eterogeneità delle caratteristiche molecolari dell'HCC (tipi diversi in base all'eziologia della malattia di fegato, e non solo).

Nonostante ciò, diversi gruppi hanno proposto classificazioni molecolari basate su differenti profili di espressione genica a livello del tessuto tumorale (o del tessuto del fegato cirrotico circostante), potenzialmente utili nella predizione del rischio di recidiva post-resezione epatica, di rapida progressione della malattia o della capacità di dare metastasi. Lo scenario è ulteriormente complicato dal fatto che negli ultimi anni la comunità scientifica ha elaborato (ed universalmente accettato) criteri di diagnosi e di prognosi dell'HCC esclusivamente basati su dati clinici.

Ciò ha comportato la possibilità di accedere al materiale istologico in genere solo all'interno di protocolli di studio.

Molti studi hanno mostrato l'importante ruolo che il fattore di trascrizione Yin Yang 1 (YY1) e la Raf-1 Kinase Inhibitor Protein (RKIP) hanno nella biologia neoplastica. YY1 agisce come attivatore o repressore di molti geni critici e quando up-regolato favorisce differenti aspetti della tumorigenesi. Il comportamento di YY1 come attivatore o repressore dipende dal contesto del promotore e dall'interazione con altre proteine regolatorie.

RKIP inibisce differenti chinasi nelle vie delle MAPK e di NF- κ B, antagonizzando così le loro attività oncogene. RKIP è un importante promotore dell'apoptosi farmaco-indotta.

Tra YY1 e RKIP possono esistere influenze reciproche. La sovra-espressione di YY1 può direttamente minimizzare la trascrizione di RKIP, che, a sua volta, tramite i suoi effetti su NF- κ B, può inibire la trascrizione di YY1 (31-32).

L'HCC si sviluppa in condizioni di epatite cronica e cirrosi epatica, caratterizzati da infiammazione cronica del fegato. Durante il processo infiammatorio, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono causare danni a importanti componenti cellulari, come DNA, RNA e proteine, che possono contribuire alla trasformazione maligna delle cellule. Sono stati identificati diversi mediatori pro-infiammatori, come le citochine, la cicloossigenasi-2 (COX-2), e molecole di segnalazione intracellulare tra le quali le chinasi

Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt/mTOR, e fattori di trascrizione quali NF- κ B, che facilitano la promozione e la progressione tumorale.

E' ampiamente dimostrato che la COX-2 è un importante target molecolare nella terapia antitumorale. COX-2 è cronicamente iper-espressa in diversi tumori incluso l'HCC (33).

In pazienti con HCC la presenza di una iper-espressione della COX-2 nel fegato cirrotico circostante i tumori è stata associata ad una ridotta sopravvivenza, ed alla comparsa di recidive dopo trattamento chirurgico. Il fattore di trascrizione NF κ B è stato ampiamente dimostrato essere un link tra infiammazione e cancro, ed è costitutivamente attivato in diversi tipi di tumore, incluso l'HCC. In vari tumori, tra cui l'HCC, si osserva l'attivazione del pathway PI3K/PTEN/Akt/mTOR, responsabile della sopravvivenza e della proliferazione cellulare, come conseguenza di mutazioni, inattivazioni o silenziamento di alcune sue componenti. La deregolazione di questo pathway ha un importante significato clinico nell'HCC (34).

E' stato dimostrato che il pathway MAPK/IKK è attivato dall'osteopontina (OPN). L'OPN è una fosfoproteina, coinvolta nella migrazione, delle cellule, nella sopravvivenza cellulare e nell'immunità. Essa contribuisce allo sviluppo di neoplasie attraverso l'inibizione dell'apoptosi e l'attivazione di diverse proteasi che degradano la matrice, quali le metalloproteinasi MMP-2, MMP-9 e l'attivatore del plasminogeno tipo urokinasico, promuovendo così la motilità delle cellule neoplastiche, la crescita del tumore e le metastasi. L'OPN migliora la motilità cellulare, la chemoinvasione e la crescita tumorale; induce inoltre la secrezione uPA NF κ B-mediata NIK-dipendente e l'attivazione di pro-MMP-9 uPA-regolata attraverso i pathways di trasduzione del segnale cellulare mediati da MAPK/IKK. NIK in presenza di OPN induce la fosforilazione di MEK-1/ERK1/2, che attiva a sua volta cNF κ B. OPN stimola la secrezione di uPA IKK/MAPK-mediata NIK-dipendente, che regola l'attivazione di pro-MMP-9, la motilità cellulare, l'invasione e la crescita del tumore (35).

Proteine oggetto di studio

-Chaperones molecolari

Un ruolo fondamentale è stato attribuito alle *chaperones molecolari* calcio-dipendenti, una classe funzionale di famiglie proteiche che si associano alle proteine neosintetizzate in modo da prevenirne l'aggregazione e consentire il loro corretto ripiegamento (folding) sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche (36). Il reticolo endoplasmatico è la sede della sintesi, del ripiegamento ("folding") e delle modificazioni post-traduzionali delle proteine di membrana e secrete (37). Rappresenta un preciso sistema di controllo di qualità atto ad assicurare che solo le proteine correttamente ripiegate e funzionanti possano essere rilasciate dall'ER e raggiungere la loro destinazione finale, mentre le proteine malripiegate o non funzionanti sono trattenute nel ER e, in seguito, traslocate nel citosol per la degradazione da parte del proteosoma 26S, processo mediato dall'attivazione del sistema **ER Associated Degradation (ERAD)**.

L'azione del ER sul folding delle proteine è altamente sensibile a stimoli che inducono modificazioni dei livelli di energia intracellulari, dello stato redox o della concentrazione del Ca²⁺. Tali stimoli sono in grado di modificare la capacità del *folding* del ER, la quale risulta nell'accumulo e nell'aggregazione di proteine non ripiegate o mal ripiegate nel lume del reticolo stesso, una condizione che viene definita come *stress del reticolo endoplasmatico*. Tale formazione di aggregati proteici è tossica per le cellule e rappresenta la base biochimica di numerose condizioni fisiopatologiche associate allo *stress del reticolo endoplasmatico (ER stress)* inclusa l'ischemia, le malattie neurodegenerative, il diabete e i tumori (38).

Allo scopo di combattere gli effetti deleteri associati allo stress del ER, le cellule hanno evoluto diverse strategie protettive, le quali sono state collettivamente incluse nel processo denominato **Unfolded Protein Response (UPR)**. Questa complessa risposta cellulare è mediata dall'attivazione di tre recettori trans membrana del reticolo (*Sensori di stress*) denominati rispettivamente: *Pancreatic ER Kinase (PERK)*, *Activating Transcription Factor 6 (ATF6)* e *Inositol-Requirng Enzyme 1 (IRE1)*. In assenza di stress del ER i tre recettori del ER vengono mantenuti in uno stato inattivo attraverso la loro associazione con la molecola chaperone, *Glucose Regulated Protein 78 (GRP78)*. Nei processi tumorali, le cellule tumorali si adattano a stress cronico nel microambiente tumorale inducendo l'iper espressione di GRP78 / BiP che sembra così promuovere la proliferazione cellulare, la sopravvivenza tumorale la capacità di metastizzare, e la resistenza ad un'ampia varietà di

terapie. L'iperpressione GRP78 potrebbe servire, pertanto, come biomarcatore per il comportamento del tumore e la risposta al trattamento. Un altro promettente bersaglio molecolare è la proteina heat-shock 90 (Hsp90), altro chaperone essenziale per l'attività di numerose oncoproteine, come Raf-1, NFB, ERK e Akt. La Hsp90, sembrerebbe risultare iperespressa nei tumori, e in particolare nell'HCC. L'iperpressione della Hsp90 è stata associata ad una prognosi sfavorevole

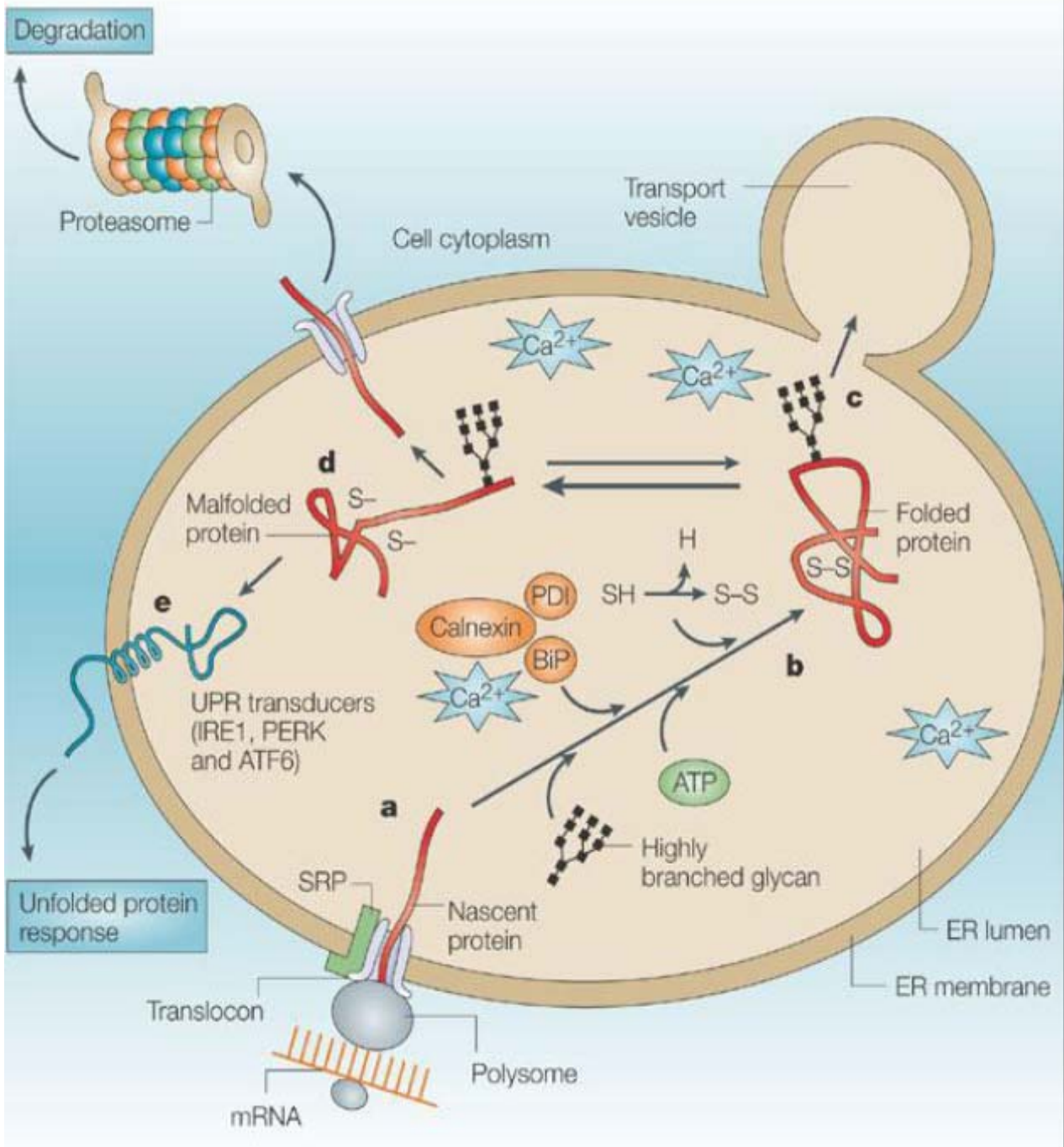


Figura2

Fattori di crescita

Come già ampiamente rivisto altrove, diverse vie di segnalazione risultano deregolate nei processi di epatocarcinogenesi ed influenzano la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, l'invasione, e la capacità metastatica del carcinoma epatocellulare (tabella 1). (39). Tra questi, i percorsi più frequentemente riportati coinvolgono fattori di crescita, quali il fattore di crescita insulino-simile (IGF), fattore di crescita epidermico (EGF), fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita degli epatociti (HGF), e fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF).

IGF è essenziale per la regolazione della crescita e sviluppo, ed è stato dimostrato essere coinvolto nella patogenesi di numerose neoplasie, tra cui HCC. Alterazioni di questo percorso comprendono perdite alleliche del recettore IGFR2 (80%) e sovraespressione del IGF2 ligando (16-40%) (40). Inoltre, un blocco selettivo di segnalazione di IGF sembra aver effetti antitumorali in modelli sperimentali di HCC. (41) Diversi componenti del pathway HGF / MET sembrano contribuire alla progressione HCC.(42).

La sovra-espressione di VEGF e dei suoi recettori è stata dimostrata in HCC, sottolineando così l'importanza dell'angiogenesi nel processo tumorale e nel carcinoma epatocellulare in particolare.(43-44). Inoltre, elevati livelli sierici di VEGF sono stati associati con comportamento cancro aggressivo e prognosi infausta (45).

Crescente interesse Infine, vi è stata in terapia anti-fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) in HCC, sulla base di prove che suggeriscono la importanza di questo sistema sia in HCC progressione e nella resistenza acquisita anti-VEGF terapia(46). Inoltre, una recente pubblicazione ha dimostrato che FGF19, che è amplificato e sovraespresso insieme al noto CCDN1 oncogene (47), agisce come un oncogene che induce formazione di HCC (48). Purtroppo, le esperienze iniziali di studi clinici con il Inibitore FGF brivanib come prima e seconda linea di terapie non hanno dato un miglioramento della sopravvivenza.

Trapianto come terapia radicale del carcinoma epatocellulare

Il trattamento dell'HCC con una terapia "radicale" come il trapianto consente di ottenere risultati soddisfacenti nei pazienti con "early HCC" (criteri di Milano). Anche in questo gruppo di pazienti, però, il rischio di ricorrenza dell'HCC post-trapianto va dal 7 al 20% a cinque anni (49).

I risultati sono significativamente inferiori nei pazienti sottoposti a resezione epatica (50% di ricorrenza a 3 anni).

Esperienze sempre più consistenti supportano peraltro l'ipotesi che pazienti con HCC in fase più avanzata, secondo l'attuale classificazione clinica, presentano una prognosi estremamente favorevole dopo il trapianto (50). Ed è proprio su queste esperienze che alcuni Centri hanno esteso i propri criteri di inclusione al trapianto (criteri "allargati"). Tali dati testimoniano una non ottimale capacità predittiva, in termini di prognosi, della attuale classificazione clinico-istologica dell'HCC che si basa su numero e dimensioni delle lesioni, classe funzionale della cirrosi, eventuale presenza di invasione vascolare, grading istologico.

Nella selezione dei pazienti affetti da HCC da sottoporre a trapianto di fegato, a tali parametri, si è ritenuto necessario associare marcatori sierologici, caratteristiche biologiche e molecolari del tumore che potessero correlare con il rischio di ricorrenza neoplastica post trapianto.

Tra i marcatori tumorali per HCC il più comune è l'Alfa-fetoproteina (AFP). Alcuni studi hanno evidenziato il valore predittivo dei livelli di AFP preoperatori, nel predire il risultato (51) in termini di ricorrenza del tumore, dopo trapianto di fegato eseguito su pazienti con epatocarcinoma (52-53). Un recente studio condotto da Toso et al. (54), ha suggerito che le dimensioni del tumore ed il livello di AFP preoperatorio potevano prevedere il tasso di sopravvivenza. Alcuni hanno inoltre ipotizzato che (55) ha anche indicato che concentrazioni di AFP in combinazione con criteri di imaging potrebbero essere utilizzati per prendere decisioni in merito alla trapiantabilità di un paziente. Analogamente, des-gamma-carbossi protrombina (DCP), anche nota come proteina indotta dalla assenza di vitamina K o antagonista II (PIVKA-II), è stata usata come un importante marcatore tumorale per l'HCC, in particolare in Giappone (56-57). Alcuni studi hanno riportato correlazioni tra i livelli di DCP e reperti istopatologici, come la presenza di invasione venosa portale (58-59) o l'alto grado di differenziazione HCC (60). Alto Livelli DCP sono

stati considerati come un fattore predittivo di recidiva in pazienti trattati con trattamenti convenzionali come la resezione chirurgica (61).

Ma nonostante questi marcatori hanno dimostrato essere indicatori utili e affidabili in molte esperienze cliniche, tuttavia vi è stato alcun accordo sui valori di cut-off da utilizzare come criteri di esclusione per pazienti ad alto rischio di recidiva di tumore post trapianto.

Obiettivi dello studio:

Identificare mediante lo studio dell' istologia tradizionale, studi di immunohistochimica per la valutazione dell'espressione di proteine oggetto di studio (VEGFR, GRP78, HSP90) a livello del tessuto tumorale di pazienti trapiantati di fegato per HCC, e correlare questi con:

-Prognosi della malattia

-Eventuale rischio di recidiva dopo trattamenti trapianto.

Pazienti :

Ogni anno nel nostro Centro (Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione) vengono valutati per il trapianto di fegato circa 200 pazienti.

Di questi, circa 150 vengono inseriti in lista d'attesa per il trapianto (100-110 per cirrosi, 40-50 per HCC). Ogni anno vengono trapiantati circa 80 pazienti, 30 dei quali per HCC.

In questi anni di lavoro abbiamo reclutato una coorte di paziente (42 pazienti sesso maschile n= 35 (83%) sesso femminile n =7 (17.7%)) sottoposti a trapianto di fegato presso il nostro Istituto dal Gennaio 2009 al Luglio 2010, per HCC su cirrosi epatica di diversa eziologia (HCV n=32 (76%), HBV n=3 (7.1%), alcool n=8 (19%), altro n=3 (7.1%). Pazienti con età media al momento del trapianto di anni 59.2 (mediana 60.5, deviazione standard 6.04).

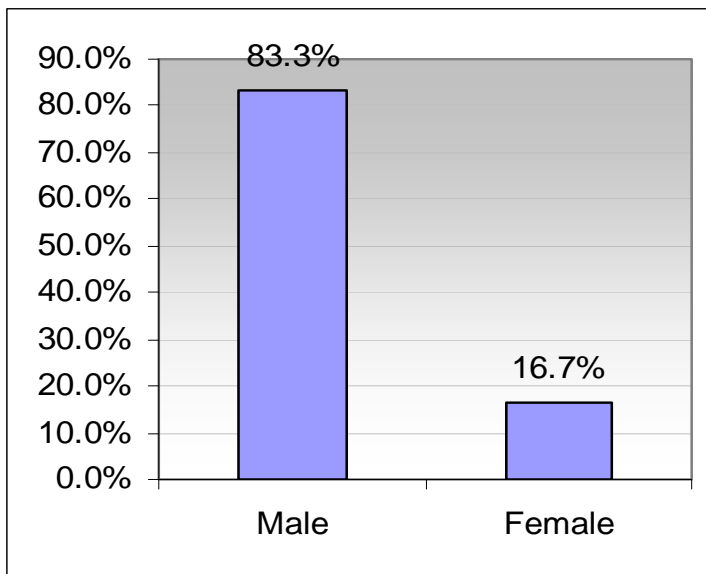


Tabella 1 Distribuzione in base al sesso

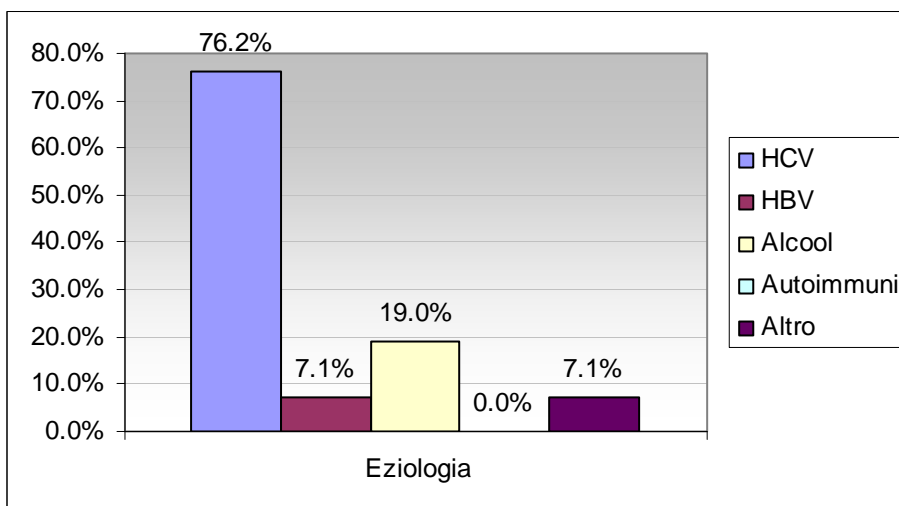


Tabella 2 Distribuzione in base all'eziologia

Come sistemi di stadiazione della malattia epatica al momento del trapianto sono stati utilizzati lo Score di Child-Pugh ed il Meld score.

Lo score di Child Pugh che non é un sistema di stadiazione per l'epatocarcinoma, ma un punteggio che descrive diversi gradi di compromissione della funzionalità epatica nei pazienti cirrotici (Pugh 1973).

Parametri Chimici e Biochimici

Score (punti) per la progressione dell'anomalia

	1	2	3
Encefalopatia	assente	1-2	3-4
Ascite	assente	live	moderato
Albumina (g/dL)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
PT (sec)	1-4	4-6	>6
Bilirubina (mg/dL)	1-2	2-3	>3

Classe A: 5-6 punti; Classe B: 7-9 punti; Classe C: 10-15 punti

La maggior parte dei pazienti del nostro studio presentavano una malattia di fegato in buona fase di compenso (paziente in Classe A di Child-Pugh n=22 (52.4%), Classe B n= 16 (38.1%), Classe C n=4 (4.5%)

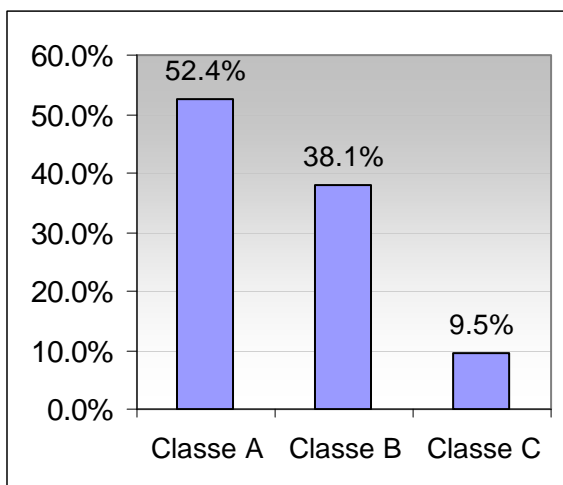


Tabella 3 distribuzione in base allo score Child-Pugh

Il nostro Centro utilizza come indicatore di severità clinica a breve termine (per la stima di morte a 3 mesi) e come strumento evidence-based per l'allocazione degli organi per tutti i potenziali candidati al trapianto di fegato il **Meld** score (Modello per End-Stage Liver Disease).

Questo punteggio è ora utilizzato dalla rete United for Organ Sharing (UNOS) e Eurotransplant per stabilire in pratica una priorità per l'assegnazione dei trapianti di fegato.

Come noto, il punteggio MELD considera solo 3 variabili oggettive:

-INR, bilirubina, creatinina.

Si calcola applicando la seguente formula:

$$R = (0.957 \times \text{Loge} [\text{creatinina mg/dL}] + 0.378 \times \text{Loge} [\text{bilirubina totale mg/dL}] + 1.120 \times \text{Loge} [\text{PT INR}] + 0.643) \times 10, \text{ arrotondato all'unità}$$

La rete United for Organ Sharing (UNOS) ha fatto le seguenti modifiche:

-se il paziente è stato dializzato per due volte negli ultimi 7 giorni.

Per quanto riguarda il punteggio da attribuire ai pazienti con epatocarcinoma i criteri adottati nel nostro Centro, seguono l'attuale raccomandazione dal Centro Nazionale Trapianti italiano e dell'UNOS che prevedono:

- Ai pazienti inseriti in lista per HCC con singolo HCC 2-5 cm o 2-3 lesioni di HCC con diametro massimo di 3 cm, viene attribuito un punteggio fisso di 22 punti, incrementato di un valore pari al 10% di rischio (circa 3 punti) ogni tre mesi.

-Non vengono invece attribuiti punti agli HCC con lesione singola (<2 cm) in quanto il rischio di morte o drop-out a breve termine legato al tumore viene considerato trascurabile.

L'analisi dei nostri dati ha mostrato che i pazienti valutati presentavano un valore medio del Meld score al momento del trapianto di 22.23 (mediana 22, deviazione standard 1.265).

Dei pazienti reclutati sono stati valutati il numero delle lesioni epatiche compatibili con epatocarcinoma, la sede, le dimensioni massime del tumore, la presenza o l'assenza di invasione angiolinfatica, l'esecuzione di precedenti terapia loco regionali, l'istotipo tumorale e la recidiva tumorale. Dall'analisi dei dati istologici si è evinto che 15 pazienti (35.7%) presentavano una lesione singola, 10 pazienti (23.8%) due lesioni, 5 pazienti (11.9%) 3 lesioni e 12 pazienti (28.6%) più di tre lesioni.

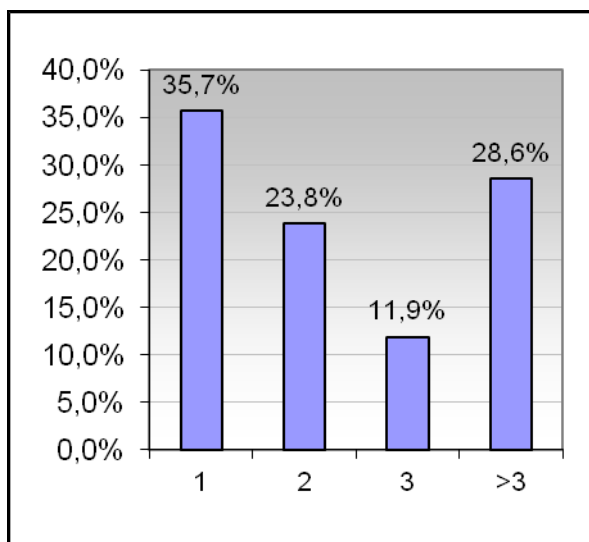


Tabella 4 distribuzione in base al numero di lesioni

La media delle dimensioni massime delle lesioni tumorali è stata di 27.40 mm (mediana 25, deviazione standard 11.43).

<i>tumor size lesione</i>	
Mean	27,40476
Median	25
Standard Deviation	11,43179
Range	54
Minimum	2
Maximum	56
Count	42

L'invasione vascolare microangiolingativa è stata osservata in 23 dei 42 pazienti analizzati (45.2%)

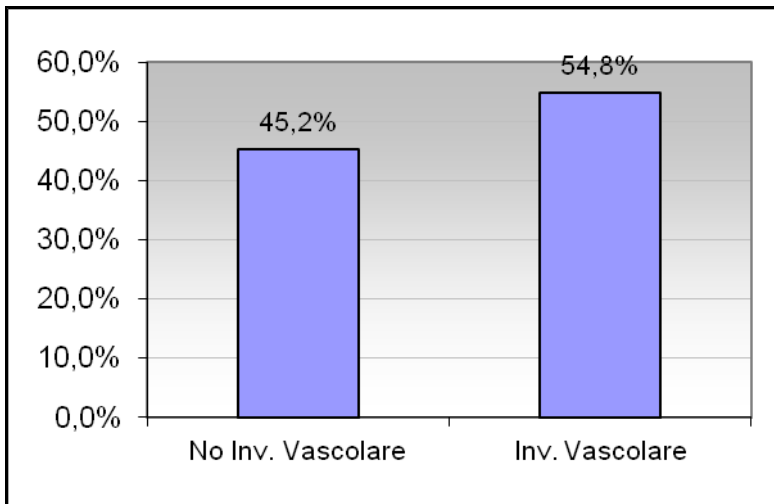


Tabella 5 distribuzione in base alla presenza o assenza di invasione microangiolinfatica

La quasi totalità della nostra coorte è stata sottoposta a precedenti terapie loco regionali (TAE/TACE) 37/42 pazienti (88.1%).

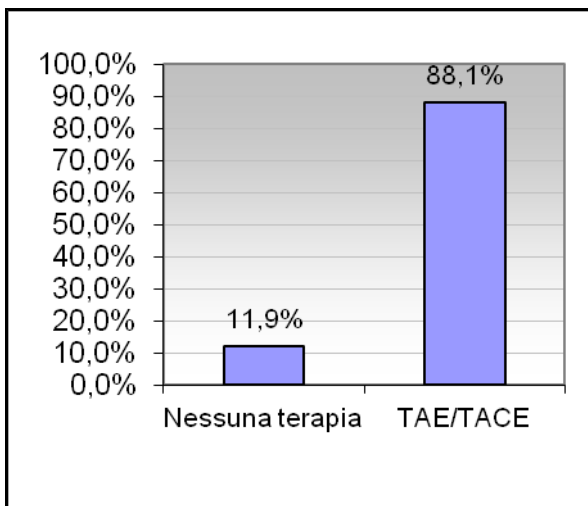


Tabella 6 distribuzione in base all'esecuzione di precedenti terapie locoregioali

Tra i parametri valutati è stato analizzato il grading istologico.

Il sistema raccomandato per la per la classificazione del grading istologico e da noi utilizzato è stato lo schema di **Edmonson e Steiner** (62), che utilizza quattro gradi di differenziazione del carcinoma epatocellulare:

G1: ben differenziato

G2: moderatamente differenziato

G3: scarsamente differenziato

G4: indifferenziato

10 /42 pazienti (23%) presentavano un HCC con moderatamente differenziato, 8 pazienti (19%) un tumore ben differenziato, 8 pazienti (19%) da ben a scarsamente differenziato. 7 pazienti indicati con il punteggio zero (0), presentavano un tumore completamente necrotico per il quale non è stato possibile valutare il grading istologico.

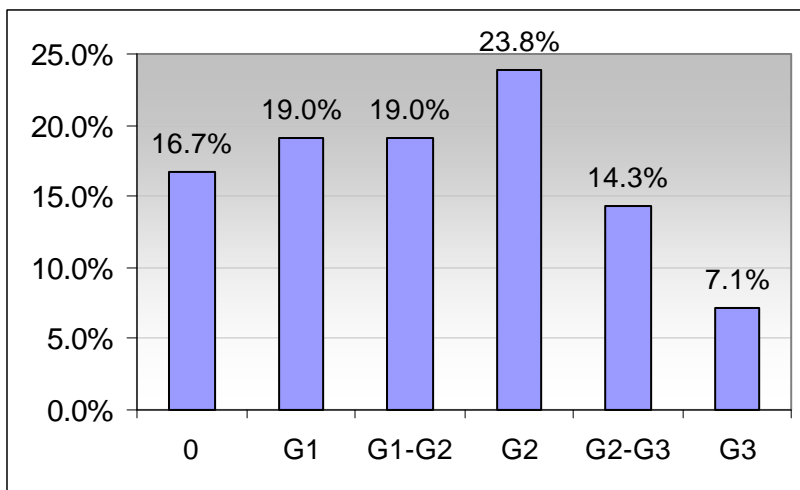


Tabella 7 distribuzione in base al grading istologico

In 9/ 42 (21.43%) pazienti si è assistito a recidiva tumorale post trapianto

Recidiva HCC

Recidiva	Freq.	Percent	Cum.
HCC			
NoRec	33	78.57	78.57
Rec	9	21.43	100.00
Total	42	100.00	

In realtà un sistema ideale di stadiazione per una data neoplasia deve fornire dati riguardanti la storia naturale del tumore (crescita tumorale locale, diffusione linfonodale regionale e metastasi) e dati relativi alla rilevanza prognostica che possa influire sul processo decisionale nell'ambito del trattamento di un gruppo di pazienti con le medesime caratteristiche.

Nel caso dell'epatocarcinoma, il sistema ufficiale di classificazione é il TNM della AJCC, che descrive accuratamente il carico tumorale (considerando invasione vascolare, numero di noduli neoplastici, dimensioni del tumore), ma non fornisce alcuna informazione circa la funzione epatica.

In questi casi, altri sistemi di stadiazione (lo score di Child-Pugh, la classificazione di Okuda, del Cancer of the Liver Italian Program Investigators [CLIP], del Barcelona-Clinic Liver Cancer [BCLC] o il Sistema di Stadiazione Semplificato per l'epatocarcinoma) possono costituire uno strumento più utile (Vauthey 2002).

Tuttavia, ad oggi, la classificazione TNM deve essere considerata l'opzione standard per la stadiazione di questo tumore , con un livello di evidenza di tipo C.

Di seguito viene riportata la classificazione **TNM** secondo l'ultima versione del Cancer Staging Manual dell'UICC/AJCC (UICC 2002) e da noi utilizzata.

Tumore primitivo (T)

TX tumore primitivo non definibile

T0 Tumore primitivo non evidenziabile

T1 Tumore unico senza invasione vascolare

T2 Tumore unico con invasione vascolare o tumori multipli nessuno superiore a 5 cm nella sua dimensione massima

T3 Tumori multipli superiori a 5 cm nella dimensione massima o tumore con interessamento di un ramo principale della vena porta o delle vene epatiche

T4 Tumore(i) con invasione diretta di organi adiacenti diversi dalla colecisti o tumore(i) che perfora il peritoneo viscerale

Linfonodi regionali (N)

NX Linfonodi regionali non valutabili

N0 Linfonodi regionali liberi da metastasi

N1 Metastasi nei linfonodi regionali

Metastasi a distanza (M)

MX Metastasi a distanza non accertabili

M0 Metastasi a distanza assenti

M1 Metastasi a distanza presenti

Nessuno dei nostri pazienti secondo la Classificazione TNM presentava metastasi a distanza (tale dato rappresenta infatti un criterio di esclusione durante la valutazione per l'inserimento in lista per il trapianto). Nessuno presentava invasione tumorale linfonodale. La maggior parte della nostra popolazione (n= 32 (76.2%) apparteneva alla classe T2 del sistema TNX, 3 pazienti (7.1%) alla classe T1 solo 1 paziente (2.4%) alla classe T3 ed i6 pazienti (14.3%) alla classe Tx nei quali il tumore primitivo non è definibile.

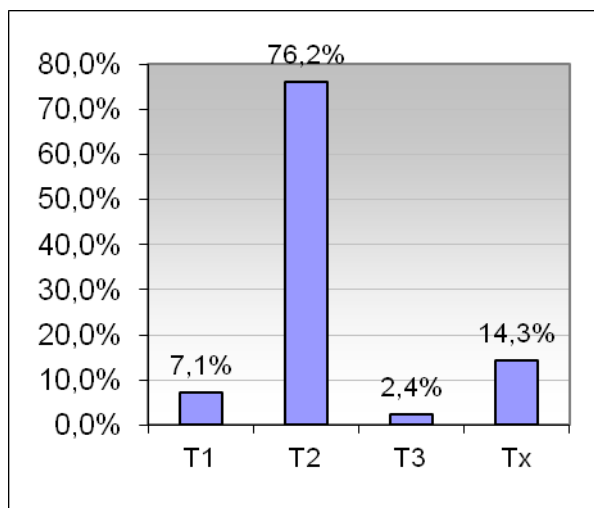


Tabella 8 distribuzione in base al la classificazione TNX

Altra classificazione utilizzata nel nostro studio è la classificazione **BCLC** (Barcelona-Clinic Liver Cancer).

Si tratta di una classificazione che combina diversi parametri, raccolti retrospettivamente, quali fattori tumorali (dimensione, nodularità), funzionalità epatica e modalità di trattamento. E' un sistema di stadiazione utile per selezionare le opzioni terapeutiche, in particolare per i pazienti con epatocarcinoma in stadio precoce (Stadio A). Il limite principale della classificazione BCLC risiede nella mancanza di validazione esterna (Llovet 1999a; Llovet 2002).

Stadio	Performance status	Stadio tumorale	Funzionalità epatica
Stage A: iniziale			
A1	0	Tumore singolo, < 5 cm	Assenza di ipertensione portale e bilirubina normale
A2	0	Tumore singolo, < 5 cm	Presenza di ipertensione portale e bilirubina normale
A3	0	Tumore singolo, < 5 cm	Presenza di ipertensione portale e bilirubina elevata
A4	0	3 tumori < 3 cm	Classe di Child-Pugh A-B
Stadio B: intermedio HCC	0	Esteso multinodulare	Classe di Child-Pugh A-B
Stadio C: avanzato	1-2	Invasione vascolare o diffusione extraepatica	Classe di Child-Pugh A-
Stage D: terminale	3-4	Tutti	Child C

Stadio iniziale

Stage A1: Tumori singoli e assenza di ipertensione portale importante e bilirubina normale.

Stage A2: Tumori singoli associati a ipertensione portale importante e bilirubina normale.

Stage A3: Tumori singoli con ipertensione portale importante e valori di bilirubina alterati.

Stage A4: Tre tumori di dimensione inferiore a 3 cm a prescindere dalla funzionalità epatica.

Stadio intermedio

Stadio B: pazienti asintomatici con tumori multinodulari, in assenza di invasione vascolare e diffusione extraepatica.

Stadio avanzato (minimo un criterio)

Stadio C: pazienti sintomatici (Performance Status 1-2) e/o con modalità di crescita invasiva riflessa da invasione vascolare e diffusione extraepatica.

Stadio terminale (minimo un criterio)

Stadio D: pazienti con severi sintomi correlati alla neoplasia (Performance Status 3-4) o con tumori originati in pazienti affetti da severa cirrosi scompensata (Stadio di Okuda III o Score di Child Pugh).

Materiali e metodi

Il materiale biologico è stato prelevato previo consenso informato (area tumorale ed area non tumorale circostante, fegato sano, biopsie da noduli epatici etc).

Sono stati analizzati prelievi su un nodulo di HCC e prelievo di tessuto cirrotico circostante. Il tessuto è stato fissato in formalina 10% e impregnato in paraffina secondo le tecniche di routine. Le sezioni di tessuto dello spessore di 3 μm sono state sottoposte a colorazione immunoistochimica con metodo indiretto, in automatico, con l'immunocolotatore Bechmark Ultra (Roche-Ventana).

Il tessuto è stato incubato per 30 minuti, in presenza del tampone commerciale Ultra CC1 (Roche-Ventana) a 95°C, per permettere il recupero antigenico. Sono stati utilizzati gli anticorpi monoclonali BiP clone C50B12 (1:100, Rabbit mAb, Cell Signaling), HSP90 clone C45G5 (1:100, Rabbit mAb, Cell Signaling) e VEGF Receptor 2 clone 55B11 (1:100 Rabbit mAb, Cell Signaling) sia sui casi di HCC che su delle sezioni di tessuto cirrotico.

È stato utilizzato il sistema di blocco dei siti aspecifici di legame per la biotina utilizzando il kit *Endogenous biotin blocking* (Roche –Ventana) ed è stato utilizzato il kit *iVIEW DAB* (Roche-Ventana) come sistema di rivelazione del legame antigene-anticorpo. Tutte le sezioni sono state controcolorate con l'ematossilina ed è stata valutata l'espressione di entrambe le proteine in base alla loro intensità e distribuzione come focale e diffuso 1+, 2+ ed a questa è stata attribuita uno score numerico da 1 a 4.

	Focale	Diffuso
1+	1	2
2+	3	4

Tabella 9

Eseguite inoltre colorazioni anche per VEGF, l'espressione di tali proteine è stata valutata come presenza o assenza.

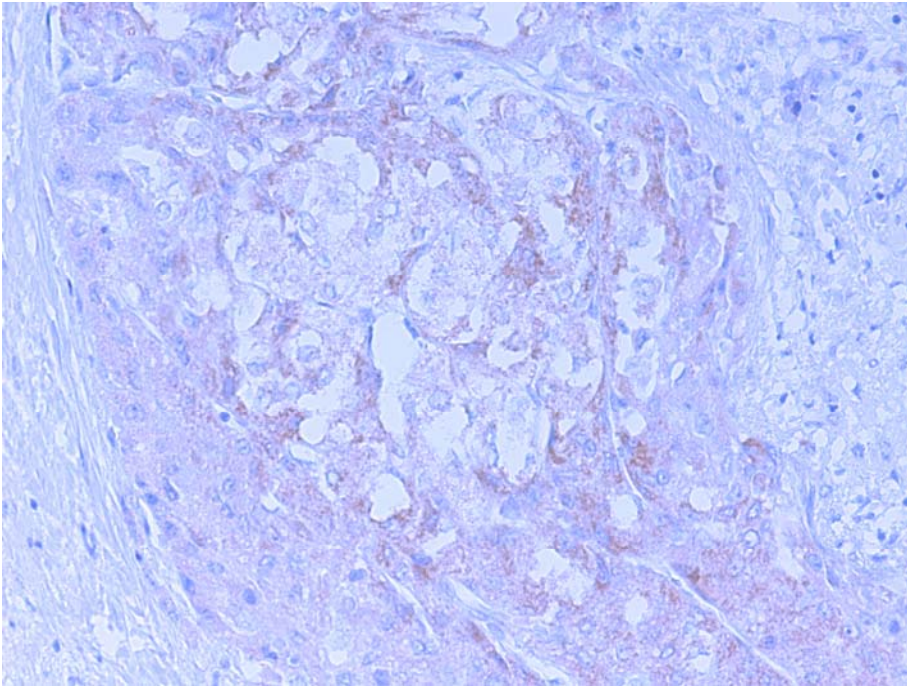


Foto 1 BIP (20X) positività 1 focale HCC

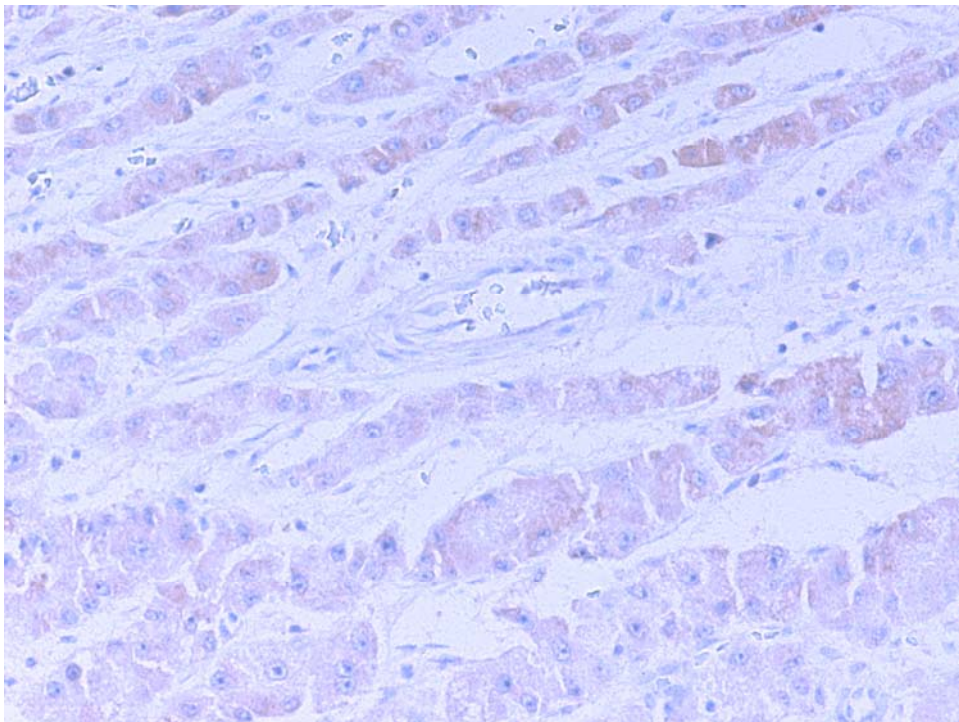


Foto 2 HSP90 (20x) positività 1 diffusa HCC

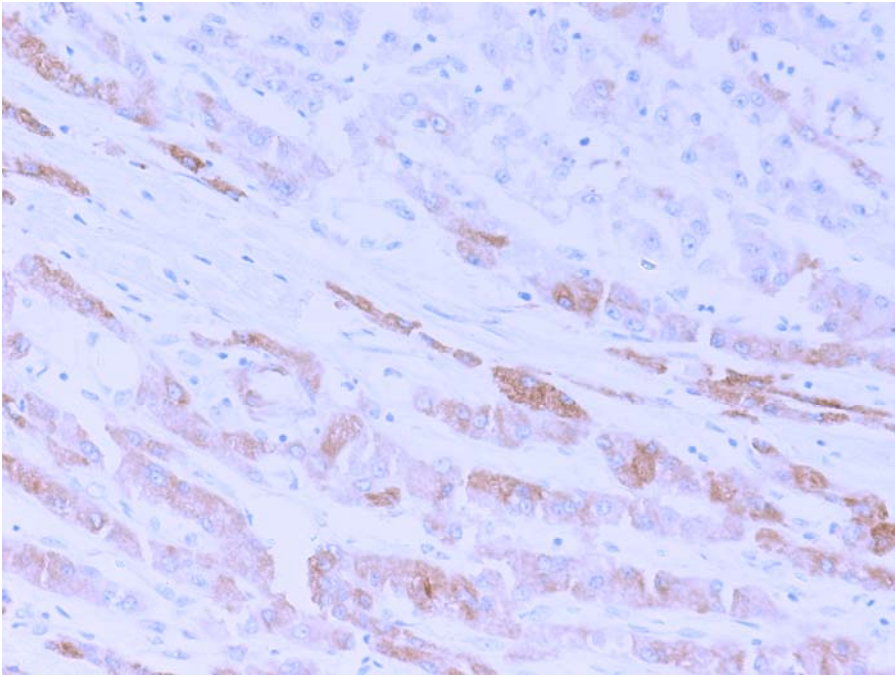


Foto 3 : BIP (20x) positività 2+ focale, HCC

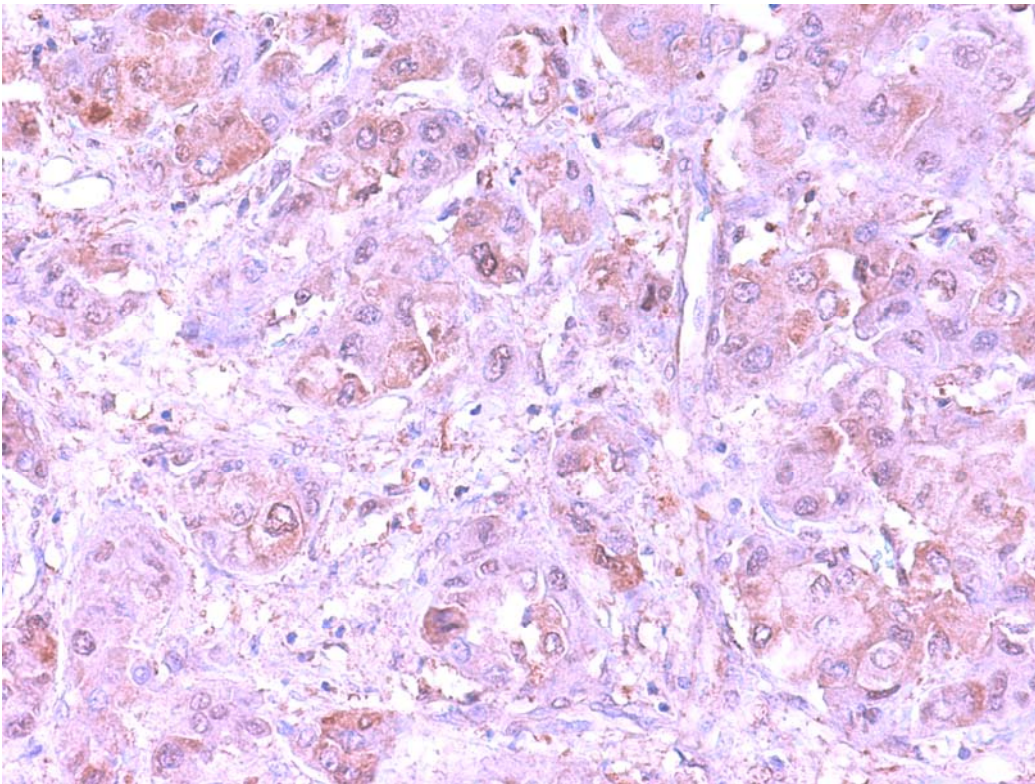
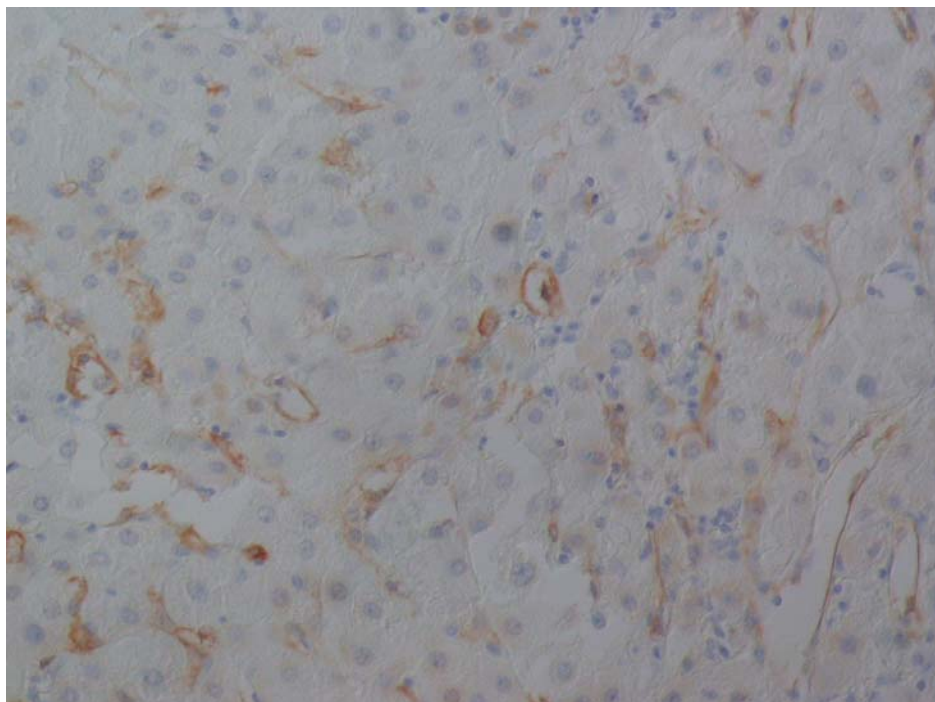
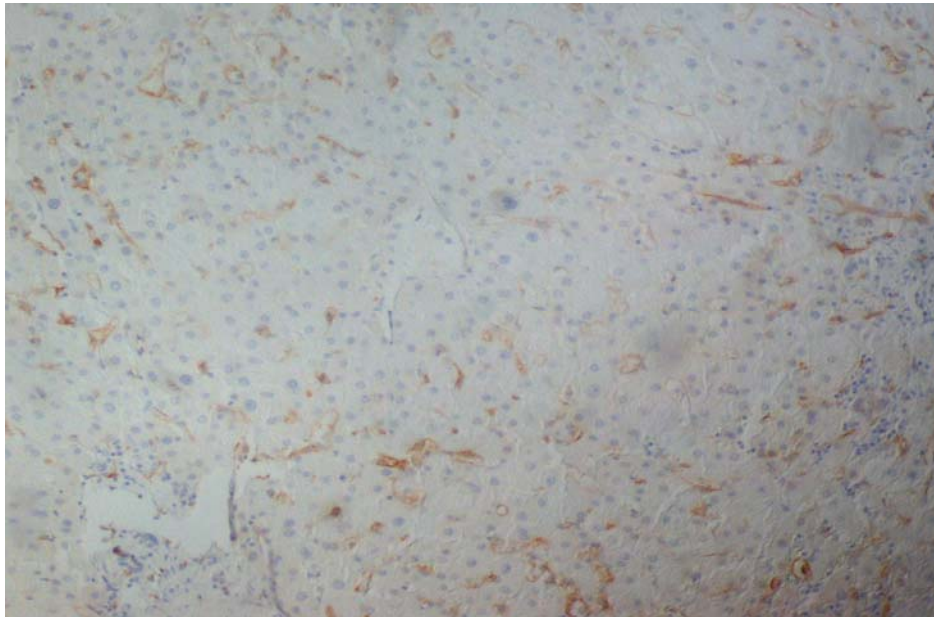


Foto 4: HSP90 (20x) positività 2+ diffusa, HCC



Risultati

Abbiamo valutato l'espressione delle molecole in studio, singolarmente, mediante l'analisi con il test del Wilcoxon, che ha rilevato dei valori significativamente più alti di espressione per BIP, HSP90, VEGF nel tessuto tumorale rispetto al tessuto non tumorale circostante.

	Tnt n=42	TT n=42	z=	P<
BIP	2 (1-3)	3 (2-3)	3,2	0.001
HSP90	2 (2-4)	4 (3-4)	3,6	0.0001
VEGF	1 (1-2)	1 (1-3)	3,3	0.001

Tabella 10: Mediana e range interquartile dei parametri in studio suddivisi in base alla presenza in tessuto non tumorale (Tnt) o HCC (TT)

Abbiamo cercato di studiare la correlazione tra l'espressione di tali molecole e attraverso una regressione logistica multipla, e la presenza di microinvasività.

Come si evince dalla tabella 11 la presenza di VEGF nei tessuti tumorali correla in maniera positiva con l'invasività mentre l'espressione di BIP, dosato sul tessuto non tumorale correla in maniera inversa con l'invasività.

	OR	IC	P<
BIP TnT	0.52	0.28-0.96	0.04
VEGF TT	1.2	1.05-4.7	0.03

Tabella 11 Regressione logistica multipla dei parametri istologici in relazione alla presenza di microinvasività

Infine ad una analisi univariata e multivariata dei vari parametri in studio, abbiamo trovato dati statisticamente significativi, di correlazione con possibile recidiva tumorale post trapianto, solo con dati clinici quali il MELD Score e la presenza istologica di invasività angiolinfatica.

12	HR (IC 95 %)	P<	HR	P<
Età	0.95 (0.82-1.05)	ns	-	
MELD	1.4 (1.07-1.95)	0,02	1.3 (1,002-67,3)	00.05.00
BCLC	1.8 (0.93-0.45)	Ns (0.06)	-	
BCLC ist	1.1 (0.6-2)	ns	-	
Prec terapie	0.9 (0.1-7)	ns	-	
AFP pre OLT	1 (1-1.01)	0,04	-	
BIP Tnt	1.1 (0.6-2)	ns	-	
BIP TT	1.5 (0.66-3.5)	ns	-	
HSP90 Tnt	0.86 (0.5-1.5)	ns	-	
HSP90 TT	0.65 (0.32-1.3)	ns	-	
VEGF Tnt	2.1 (0.87-5.3)	ns (0,09)	-	
VEGF TT	1.1 (0.56-2.1)	ns	-	
Invasiv angiolinef	9.0 (1.1-72.9)	0,04	8.2 (1.002-67.3)	00.05.00

Tabella 12:i valori di Hazard ratio all'univariata ed alla multivariata secondo il modello di Cox

Conclusioni e prospettive future

Come già precedentemente descritto, l'epatocarcinogenesi è un processo complesso e multi-step risultante da una combinazione di alterazioni epigenetiche e genetiche che influenzano diverse vie di segnale che riguardano la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, l'invasione metastatica. Nei pazienti trapiantati, inoltre, bisogna considerare:

Caratteristiche del graft

Eziopatogenesi della malattia del ricevente

Influenza della terapia immunosoppressiva nella carcinogenesi

Nel nostro studio abbiamo confermato l'importante ruolo svolto da VEGF, Bip/GRP78 nell'epatocarcinogenesi ed in particolare il ruolo di VEGF nei processi di angiogenesi neoplastica, tuttavia solo marcatori già noti come il Meld score e l'invasione microvascolare furono associati a ricorrenza di carcinoma epotocellulare post trapianto.

Gli obiettivi futuri saranno quelli di:

- Aumentare la casistica ed il numero di molecole oggetto di studio
- Studiare profili molecolari basati sulla espressione di RNA, micro-RNA e proteine a livello del tessuto tumorale (ed eventualmente, successivamente nel sangue periferico).

Bibliografia

- 1) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-2917
- 2) El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745-750
- 3) Tanaka H, Imai Y, Hiramatsu N, Ito Y, Imanaka K, Oshita M, et al. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan from 1990 to 2003. *Ann Intern Med* 2008;148:820-826
- 4) Tanaka Y, Kurbanov F, Mano S, et al. Molecular tracing of the global hepatitis C virus epidemic predicts regional patterns of hepatocellular carcinoma mortality. *Gastroenterology* 2006;130:703-14.
- 5) Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 28 (2014) 753e770
- 6) Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96
- 7) Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lee CM, Lin SM, et al. Taiwan Hepatoma Study Group. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 1348-1355
- 8) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
- 9) Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907-1917.
- 10) Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: a 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology* 2006;43:1303-1310.
- 11) Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127:Suppl 1:S35-S50.
- 12) Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, Di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology* 2009;136:138-148.

- 13) Flemming JA, Dong Yang J, Vittinghoff E, Ray Kim W, Terrault NA. Risk Prediction of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: The ADDRESS-HCC Risk Model *Cancer* 2014;120:3485-93
- 14) Cho LY, Yang JJ, Ko KP, et al. Coinfection of hepatitis B and C viruses and risk of hepatocellular carcinoma: systematic review and metaanalysis. *Int J Cancer* 2011; 128: 176e84.
- 15) Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65–73.
- 16) Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, et al. Taiwan Community-Based Cancer Screening Project Group. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002;347:168–174.
- 17) El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:1118–1127.
- 18) Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625-38.
- 19) Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol* 2009;50:1142–1154.
- 20) Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991;350:429-31.
- 21) El-Serag HB, Richardson PA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2462–2467.
- 22) Marrero J, Fontana R, Fu S, Conjeevaram H, Su G, Lok A. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005;42:218–224.
- 23) El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:369-80.
- 24) Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-19

- 25)Veronica Wendy Setiawan, Lynne R Wilkens, Shelly C Lu, Brenda Y. Hernandez, Loic Le Marchand, Brian E Henderson. Association of coffee intake with reduced incidence of liver cancer and death from chronic liver disease in the US multiethnic cohort. *Gastroenterology* 2015; 48: 118-25
- 26)Christina Bamia, Pagona Lagiou, Mazda Jenab, Antonia Trichopoulou, Veronika Fedirko, Krasimira Aleksandrova, Tobias Pischon et al. Coffee, tea and decaffeinated coffee in relation to hepatocellular carcinoma in a European population: Multicentre, prospective cohort study. *Int. J. Cancer*: 00, 00–00 (2014)
VC 2014 UICC
- 27)EASL, 2012
- 28)Trichopoulos D, Bamia C, Lagiou P, Fedirko V, Trepo E, Jenab M, et al. Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case–control study. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1686–1695.
- 29)Lee YC, Cohet C, Yang YC, Stayner L, Hashibe M, Straif K. Meta-analysis of epidemiologic studies on cigarette smoking and liver cancer. *Int J Epidemiol* 2009;38:1497e511
- 30)Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A,Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of smallhepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl JMed*. 1996;334:693–9.
- 31)Pilarsky C et al. *Neoplasia* 6, 744-750, 2004.
- 32)Al Mulla F et al. *J. Clin. Oncol.* 24, 5672-5691, 2006.
- 33)Giannitrapani L. et al. *Ann N Y Acad Sci.* 1155: 293-9, 2009.
- 34)Calvisi DF. et al. *J.Clin. Invest.* 117: 2713-22, 2007.
- 35)Rangaswami H et al. *J Biol Chem.* 10; 279(37): 38921-35, 2004
- 36)Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999; 13(10):1211-1233

- 37)Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem neuroanat* 2004; 28(1-2):51-65
- 38)Rutishauser J, Spiess M. Endoplasmic reticulum storage diseases. *Smitt Med Wkly* 2002; 132(17-18):211-222
- 39) Farazi PA, DePinho RA: Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006;6:674–687.
- 40)Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM: Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007;27:55–76.
- 41)Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, et al: IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *J Hepatol* 2010;52:550–559.
- 42)Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E: Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;25:862–866.
- 43)Miura H, Miyazaki T, Kuroda M, et al: Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997;27:854–861.
- 44)Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al: Halting the interaction between vascular endothelial growth factor and its receptors attenuates liver carcinogenesis in mice. *Hepatology* 2004;39:1517–1524.
- 45)Poon RT, Ho JW, Tong CS, Lau C, Ng IO, Fan ST: Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2004;91:1354–1360.
- 46)Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D: Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 2005;8:299–309.
- 47)Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, et al: Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:6779–6788.
- 48)Sawey ET, Chanrion M, Cai C, et al: Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. *Cancer Cell* 2011;19:347–358.

- 49)Duffy JP, Vardanian A, Benjamin E, Watson M, Farmer DG, Ghobrial RM, et al. Liver transplantation criteria for hepatocellular carcinoma should be expanded: a 22-year experience with 467 patients at UCLA. *Ann Surg.* 2007;246:502–11.
- 50)Ng KK, Lo CM, Chan SC, Chok KS, Cheung TT, Fan ST. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: the Hong Kong experience. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010;17:548–54.
- 51)Takada Y, Ueda M, Ito T, Sakamoto S, Haga H, Maetani Y, et al. Living donor liver transplantation as a second-line therapeutic strategy for patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2006;12:912–19.
- 52)Yang SH, Suh KS, Lee HW, Cho EH, Cho JY, Cho YB, et al. A revised scoring system utilizing serum alphafetoprotein levels to expand candidates for living donor liver transplantation in hepatocellular carcinoma. *Surgery.* 2007;141:598–609.
- 53)Duvoux C, Roudot-Thoraval F, Decaens T, Pessione F, Badran H, Piardi T, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a model including α -fetoprotein improves the performance of Milan criteria. *Gastroenterology.* 2012;143:986–94.
- 54)Toso C, Asthana S, Bigam DL, Shapiro AMJ, Kneteman NM. Reassessing selection criteria prior to liver transplantation for hepatocellular carcinoma utilizing the scientific registry of transplant recipients database. *Hepatology.* 2009;49:832–8.
- 55)Clavien PA, Lesurtel M, Bossuyt PMM, Gore GJ, Langer B, Perrera A, on behalf of the OLT for HCC Consensus Group. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol.* 2012
- 56)Suehiro T, Sugimachi K, Matsumata T, Itasaka H, Taketomi A, Maeda T. Protein induced by vitamin K absence or antagonist II as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. Comparison with alpha-fetoprotein. *Cancer.* 1994;73:2464–71.
- 57)Fujiyama S, Morishita T, Hashiguchi O, Sato T. Plasma abnormal prothrombin (des-gamma-carboxy prothrombin) as a marker of hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 1988;61:1621–8.
- 58)Suehiro T, Matsumata T, Itasaka H, Taketomi A, Yamamoto K, Sugimachi K. Des-gamma-carboxy prothrombin and proliferative activity of hepatocellular carcinoma. *Surgery.* 1995;117:682–91.

- 59) Koike YSY, Sato S, Obi S, Teratani T, Imamura M, Yoshida H, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer*. 2001;91:561–9.
- 60) Shimada M, Takenaka K, Fujiwara Y, Gion T, Kajiyama K, Maeda T, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin and alphafetoprotein positive status as a new prognostic indicator after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1996;78: 2094–100.
- 61) Hakamada K, Kimura N, Miura T, Morohashi H, Ishido K, Nara M, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin as an important prognostic indicator in patients with small hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2008;14:1370–7.
- 62) Edmonson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among UICC (International Union Against Cancer). TNM classification of malignant tumours. Sobin LH, Wittekind Ch, editors. 6th ed. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-Liss. 2002; 131-138
- 63) CLIP. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31
- 64) Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999a; 19: 329-338
- 65) Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-1917
- 66) Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* 1999b; 30: 1434-1440