



Università degli Studi di Padova

Corso di laurea magistrale in medicina e chirurgia

Dipartimento di Medicina (DIMED)

Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

U.O.C. Clinicizzata Anatomia Patologica ULSS2

Direttrice: Ch.ma Prof.ssa Maria Guido

Tesi di Laurea

LA FERROPTOSI NELL'EPATOCARCINOMA: STUDIO IMMUNOISTOCHIMICO

Relatrice: Chiar.ma Prof.ssa Maria Guido

Correlatrice: Dott.ssa Valeria Maffei

Laureanda: Laura Spigariol

Matricola: 1151595

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

ABSTRACT.....	1
1. INTRODUZIONE.....	4
1.1. EPATOCARCINOMA.....	4
1.1.1.Generalità.....	4
1.1.2.Epidemiologia e fattori di rischio.....	4
1.1.3.Carcinogenesi	7
1.1.4.Sottotipi di HCC.....	8
1.1.5.Presentazione clinica.....	12
1.1.6.Anatomia patologica	14
1.1.7.Diagnosi e stadiazione	18
1.1.8.Trattamento HCC	28
1.2. MECCANISMI DI MORTE CELLULARE E PATOLOGIE EPATICHE.....	32
1.2.1. Generalità.....	32
1.2.2. Morte cellulare ed HCC.....	39
1.3. FERROPTOSI.....	43
1.3.1. Generalità.....	43
1.3.2. Morfologia.....	43
1.3.3. Assi regolatori ed elementi della ferroptosi	44
1.3.4. Vie d’iniziazione e molecole coinvolte	48
1.3.5. Ferroptosi e immunogenicità	56
1.4. RUOLO DELLA FERROPTOSI NELLE PATOLOGIE EPATICHE.....	57
1.4.1. Fibrosi epatica.....	57
1.4.2. Neoplasie	59
1.4.3. Colangiocarcinoma.....	61
1.4.4. HCC	62
1.5. FERROPTOSI E TERAPIA ANTITUMORALE.....	67
2. SCOPI DELLO STUDIO	71
3. MATERIALI E METODI.....	72
3.1. Selezione dei casi.....	72
3.2. Dati clinici.....	72
3.3. Analisi istologica	72
3.4. Analisi immunoistochimica	73
3.5. Analisi statistica	79
4. RISULTATI.....	80
5. DISCUSSIONE.....	90
6. CONCLUSIONI.....	95
BIBLIOGRAFIA.....	96

ABSTRACT

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) is usually diagnosed in an advanced stage and has become the second deadliest type of cancer worldwide. The systemic treatment of advanced HCC has been a challenge, and for decades was limited to treatment with tyrosine kinase inhibitors, until the application of immune checkpoint inhibitors became available. Due to drug resistance, new therapeutic approaches are highly desirable. Ferroptosis is a novel type of highly regulated iron-dependent cell death with a well-known role in carcinogenesis. Triggering ferroptosis in cancer therapy is a promising option. Few studies have been performed on ferroptosis in human HCC.

Aim of the study: The aim of this study was to investigate tissue expression of ferroptosis effectors in HCC, and any correlation with prognostic and histological features.

Materials and methods: A series of 65 cases of hepatocellular carcinoma were enrolled and histologically reviewed; the main histological features were recorded. None of the patients received any neoadjuvant therapy before surgery. Immunostaining was performed on tissue microarrays, by using the following antibodies: TFR1 (Transferrin-Receptor 1), GPX4 (the main ferroptosis inhibitor), STAT3 (as a marker of an anti-apoptotic milieu), TP53 (as a tumor suppressor). Intracytoplasmic iron deposits were investigated by Perls' stain.

Results: TFR1 was observed in ten cases of HCC. None of the patients showed intracytoplasmic iron deposits in neoplastic cells. In 77% of cases GPX4 expression was absent. In 23% of cases a low GPX4 expression was found; however, there was no correlation with prognosis. A high STAT3 expression in neoplastic cells was observed in 84% of cases, and it was associated with a worse prognosis [$p=0.001$]. P53 resulted in an overexpressed mutated pattern in 5% of cases of HCC.

Conclusions: Our study confirms that HCC is a very heterogeneous tumor. In a minority of cases GPX4 expression suggests that ferroptosis is inhibited in such cases, drugs with GPX4 as molecular target could be effective. In the remaining cases, ferroptosis does not seem to be inhibited nor activated. In such cases, ferroptosis could be induced by drugs such as Xc^- inhibitors and iron-overload drugs, acting upstream or downstream of GPX4.

Background: Il carcinoma epatocellulare (HCC) viene solitamente diagnosticato in stadio avanzato, ed è diventato il secondo cancro più mortale al mondo. La terapia sistemica dell'HCC avanzato è stata una sfida, e per decenni si è limitata al trattamento con inibitori della tirosin-chinasi, fino a quando non è diventata disponibile l'applicazione degli inibitori del checkpoint immunitario. A causa della resistenza ai farmaci, sono in fase di ricerca nuovi approcci terapeutici. La ferroptosi è un tipo di morte cellulare dipendente dal ferro scoperto recentemente, è altamente regolata e ha un ruolo ben compreso nella cancerogenesi. L'attivazione della ferroptosi nella terapia del cancro è un'opzione promettente. Pochi studi sono stati condotti sulla ferroptosi nell'HCC umano.

Scopo dello studio: Lo scopo di questo studio è quello d'indagare l'espressione tissutale dei marcatori della ferroptosi nell'HCC, cercando delle correlazioni con le caratteristiche prognostiche e istologiche.

Materiali e metodi: Una serie di 65 casi di carcinoma epatocellulare sono stati arruolati e rivisti istologicamente; sono state registrate le principali caratteristiche istologiche. Nessuno dei pazienti ha ricevuto una terapia neoadiuvante prima dell'intervento chirurgico. L'immunocolorazione è stata eseguita su microarrays tissutali, utilizzando i seguenti anticorpi: TFR1 (recettore della transferrina 1), GPX4 (il principale inibitore della ferroptosi), STAT3 (come marker di un ambiente anti-apoptotico), TP53 (come oncosoppressore). I depositi di ferro intracitoplasmatici sono stati studiati dalla colorazione di Perls.

Risultati: TFR1 è stato osservato in dieci casi di carcinoma epatocellulare. Nessuno dei pazienti ha mostrato depositi di ferro intracitoplasmatici nelle cellule neoplastiche. Nel 77% dei casi l'espressione GPX4 era assente. Nel 23% dei casi è stata trovata una bassa espressione di GPX4; tuttavia, non c'era alcuna correlazione con la prognosi. È stata osservata nell'84% dei casi un'elevata espressione di STAT3 nelle cellule neoplastiche, che è risultata correlata ad una prognosi peggiore [$p=0,001$]. L'espressione di p53 con pattern mutato sovra espresso è stata trovata nel 5% dei casi di HCC.

Conclusioni: Il nostro studio conferma che l'HCC è un tumore molto eterogeneo. In una minoranza di casi l'espressione di GPX4 suggerisce che la ferroptosi è inibita in questi casi, i farmaci con GPX4 come bersaglio molecolare potrebbero essere efficaci. Nei restanti casi la ferroptosi non sembra essere inibita né attivata. In questi casi, la ferroptosi potrebbe essere indotta da farmaci come gli inibitori dell' Xc^- e i farmaci per il sovraccarico di ferro, che agiscono a monte o a valle di GPX4.

1. INTRODUZIONE

1.1 EPATOCARCINOMA

1.1.1 Generalità

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è una neoplasia maligna primitiva del fegato composta da cellule epiteliali, con differenziazione epatocellulare (36). È il più frequente tumore epiteliale maligno del fegato (75-85%), seguito dal colangiocarcinoma.

1.1.2 Epidemiologia, fattori di rischio

Le principali neoplasie epatocellulari includono il carcinoma epatocellulare (HCC), il colangiocarcinoma intraepatico (iCCA), l'epatoblastoma e l'adenoma epatocellulare. L'HCC è il più comune e l'iCCA è il secondo tumore epatico primario più comune (1).

Il carcinoma epatocellulare rappresenta oltre l'80% dei tumori epatici primitivi, ed è stimato essere la quarta causa più comune di morte per cancro in tutto il mondo. L'età d'insorgenza dell'HCC varia in diverse parti del mondo, tende a manifestarsi in età più avanzata in Giappone, Nord America e paesi europei, dove l'età mediana di insorgenza è superiore a 60 anni. Al contrario, in alcune parti dell'Asia e nella maggior parte dei paesi africani, l'HCC viene comunemente diagnosticato nella fascia di età 30–60 anni (2). L'epatocarcinoma rappresenta la causa più frequente di morte nel paziente con cirrosi compensata. Il tasso d'incidenza standardizzato per età è elevato in aree geografiche dell'estremo Oriente, nel Sud Est Asiatico e nell'Africa sub-sahariana, basso in Europa settentrionale, negli Stati Uniti e nell'America meridionale, intermedio in Nord America e in Europa meridionale. L'incidenza e la mortalità del carcinoma epatocellulare sono aumentate in Nord America e in diverse regioni europee, e sono diminuite nelle regioni tradizionalmente ad alto rischio, tra cui il Giappone e parti della Cina (3).

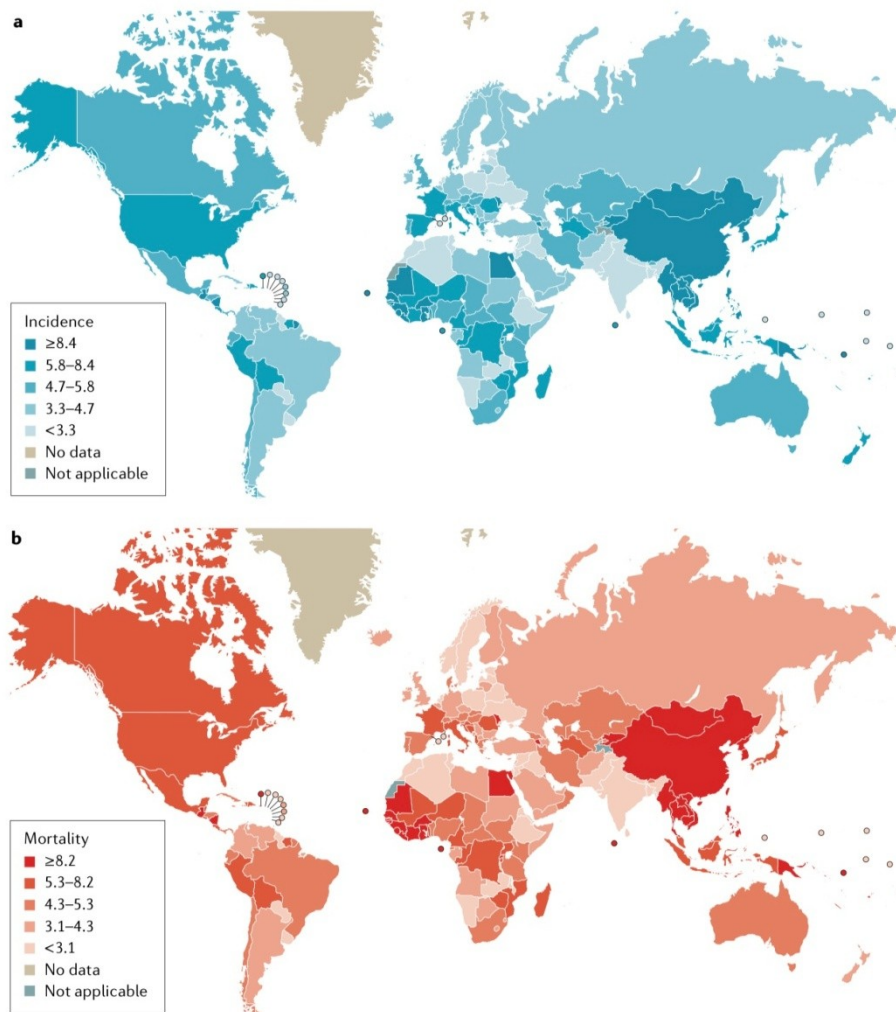


Figura 1: Carico di malattia globale del carcinoma epatico primario. Tratto da (2)

L'Italia presenta un'incidenza di HCC di 12.000 casi per anno (5), circa il 3% di tutti i nuovi casi di tumore. Dal rapporto AIRTUM 2018 risulta che in Italia risiedono 33.000 persone con diagnosi di carcinoma epatocellulare, con un rapporto tra maschi e femmine di 2,2:1 (4). Il Sud Italia si caratterizza per una più elevata incidenza e mortalità di HCC. La differenza fra Nord e Sud può essere spiegata con la differente incidenza d'infezione da virus epatotropi, ed in particolare da HCV. Sebbene, infatti, il virus HBV sia un noto fattore patogenetico dell'HCC, il suo ruolo in Italia è mitigato dalla disponibilità di un vaccino efficace, sistematicamente somministrato a tutti i soggetti nati dal 1978 in poi. La mortalità complessiva da HCC nel nostro Paese è in decremento, con un tasso di decremento annuo nei maschi dell'1.6% e nelle femmine dell'1.3% (4). Il sesso

maschile tende ad essere maggiormente colpito (rapporto maschi:femmine=3:1) sia a causa della maggiore prevalenza dei fattori di rischio negli uomini, sia per un possibile effetto protettivo degli estrogeni sulla proliferazione e il danno cellulare. In Italia il picco d'incidenza è tra i 70 e 74 anni (4).

Nella maggior parte dei casi l'HCC si sviluppa in seguito a un'epatite cronica prolungata, dopo che i pazienti sviluppano cirrosi (2). Tra i fattori di rischio per HCC, l'infezione cronica da HBV e HCV sono le cause più importanti e rappresentano l'80% dei casi di HCC a livello globale (6). L'infezione cronica da HBV è la principale causa di HCC nei paesi dell'Asia orientale e nella maggior parte dei paesi africani, ad eccezione dell'Africa settentrionale, dove la prevalenza di HCV è più alta. HCV è la principale causa di HCC correlata al virus in Nord America, Europa, Giappone, regioni dell'Asia centrale tra cui la Mongolia, Africa settentrionale e medio oriente, in particolare in Egitto (7).

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è diventata negli ultimi anni la malattia epatica non neoplastica più comune, e rappresenta un importante fattore di rischio per l'HCC nella maggior parte dei paesi sviluppati (8). Tra il 10 ed il 20% dei casi di HCC negli Stati Uniti sono ora attribuiti a NAFLD (9). L'HCC associato a NAFLD rispetto a quello associato ai virus è più comune nei pazienti anziani rispetto ai giovani. Sembra inoltre che più frequentemente in questo contesto l'HCC insorga in assenza di cirrosi, secondo gli studi della Veterans Health Administration e del Minnesota (2).

Il diabete mellito è associato a un rischio da due a tre volte maggiore di HCC. Si ritiene che l'insulino resistenza e la conseguente produzione di specie reattive dell'ossigeno che scatenano l'infiammazione epatica, abbiano un ruolo nell'epatocarcinogenesi (10,11).

La cirrosi alcolica è il secondo fattore di rischio più comune per l'HCC negli Stati Uniti ed in Europa, tuttavia il rischio assoluto di sviluppare HCC nei pazienti con cirrosi correlata all'alcol sembra essere inferiore a quello dei pazienti con cirrosi da epatite virale cronica (2).

Le aflatossine sono micotossine con forti effetti epatocancerogeni che contaminano molti cereali e semi oleosi. La contaminazione da aflatossine è diffusa nelle aree con un'alta incidenza di HCC. La forma principale di aflatossina coinvolta nella carcinogenesi epatica è l'aflatoxina B1 prodotta da *Aspergillus sp* (2). Cause meno comuni sono l'epatite autoimmune, l'emocromatosi ereditaria, il deficit di alpha 1 antitripsina e il morbo di Wilson (5).

L'HCC viene solitamente diagnosticato in una fase avanzata non resecabile, e in questo stadio vengono impiegate terapie palliative che permettono una sopravvivenza mediana di 6-12 mesi dopo la diagnosi (12). La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti con HCC è del 20%, mentre dopo 10 anni dalla diagnosi è circa il 10% (4). Ad oggi solamente il 30-40% dei pazienti viene identificato in stadio precoce (31).

1.1.3 Carcinogenesi

Similmente ad altre neoplasie, lo sviluppo dell'HCC è un processo complesso che si svolge in più fasi, e deriva da una combinazione di fattori genetici e ambientali. Indipendentemente dall'eziologia, la cirrosi precede la neoplasia nella maggior parte dei pazienti. I noduli di rigenerazione forniscono un microambiente favorevole alla trasformazione dei normali epatociti in epatociti displastici, poi in lesioni neoplastiche culminanti in HCC, attraverso il sequenziale accumulo di mutazioni genetiche ed epigenetiche (13). Ad oggi, lo sviluppo sequenziale dell'epatocarcinogenesi non è completamente compreso. Si presume che l'intero processo di epatocarcinogenesi implichi l'azione di diversi meccanismi cellulari come il cambiamento del microambiente tumorale, la necroinfiammazione, lo stress ossidativo e l'ipossia, insieme a meccanismi molecolari come la trascrizione e l'attivazione di citochine, chemochine e fattori di crescita, danni e metilazione del DNA. La carcinogenesi dell'HCC è una delle più ricercate tra quelle correlate all'infiammazione, dato che più del 90% degli HCC si sviluppa in un contesto di danno epatico ed infiammazione. Nello sviluppo dell'HCC c'è un'interazione complessa tra fattori pro-infiammatori (come ad esempio IL-6, TNF- α), citochine antinfiammatorie (TGF- β e α), fattori di trascrizione (NF- κ B,

STAT3) e le loro vie di trasduzione del segnale (14). Recentemente sono stati compiuti progressi significativi nella scoperta di alterazioni genomiche nell'HCC. Le anomalie molecolari più comuni in questa neoplasia coinvolgono i geni *TERT promoter*, *TP53*, *CTNNB1*, *AXIN1*, *ARID1A*, *ARID2*, *CDKN2A*, *RPS6KA3*, *FGF3*, *FGF4* o *FGF19* e *CCND1*. Anche la perdita di PTEN è frequente. Inoltre, l'82% dei pazienti esprime PD-L1 e i tassi di risposta al trattamento con immune checkpoint inhibitors anti-PDL1 sono del 19% (15).

NF-kB, IL-6, STAT3 ed HCC

È stato dimostrato che la via di segnale di NF-kB promuove la sopravvivenza degli epatociti, sia nel fegato in via di sviluppo che nel fegato adulto. Inoltre, svolge un ruolo cruciale nelle risposte infiammatorie del fegato controllando l'espressione di fattori di crescita e citochine. Una di queste è l'IL-6, meglio conosciuta per il suo ruolo nella risposta della fase acuta del fegato. L'IL-6 svolge molte delle sue funzioni tramite l'attivazione di STAT3, che è un fattore di trascrizione ritenuto importante nello sviluppo dell'HCC. STAT3 appartiene alla famiglia dei trasduttori di segnale e attivatori di trascrizione (STAT). L'attivazione di STAT3 richiede la fosforilazione mediata dalle Janus chinasi, in particolare JAK2 (133). In termini di significato prognostico, bassi livelli di IL-6 nei tessuti di HCC indicano una prognosi più favorevole, con sopravvivenza globale e tempo di insorgenza della recidiva più lunghi. STAT3 regola molti geni dell'immunosoppressione e della progressione del tumore, prendendo di mira i macrofagi associati al tumore. Inoltre, STAT3 funge da fattore di trascrizione oncogenico e promuove la tumorigenesi proteggendo le cellule tumorali dall'apoptosi. L'inibizione della pathway IL-6/STAT3 potrebbe essere un potenziale trattamento per l'HCC (134).

1.1.4 Sottotipi di HCC

I sottotipi di HCC sono: fibrolamellare, scirroso, a cellule chiare, steatoepatitico, macrotrabecolare-massivo, cromofobo, ricco in neutrofili e ricco in linfociti (36).

L'epatocarcinoma può essere diviso schematicamente in due sottogruppi molecolari principali (Figura 2). Il primo gruppo mantiene l'espressione di

marcatori di differenziazione epatocellulare (classe a bassa proliferazione) e mostra stabilità cromosomica; questi tumori sono associati a un fenotipo ben differenziato. Tra questa classe, gli HCC con attivazione della via Wnt/ β -catenina (sottotipo CTNNB1 mutato) definiscono un sottogruppo omogeneo di tumori con un modello di crescita microtrabecolare e pseudoghiandolare. I tumori rimanenti di questa classe a bassa proliferazione mostrano un profilo di espressione genica che assomiglia molto a quello del fegato sano: di solito sono piccoli, senza noduli satelliti e invasione vascolare (16).

La seconda classe di HCC mostra l'attivazione delle vie di segnale coinvolte nella progressione del ciclo cellulare ed è associata a un fenotipo più aggressivo (classe ad alta proliferazione). Le principali caratteristiche molecolari di questa classe sono l'instabilità cromosomica, le mutazioni TP53, la sovraespressione dei geni coinvolti nel ciclo cellulare e l'attivazione delle vie di segnalazione PI3K (fosfatidilinositolo-3-chinasi)/AKT e/o MAPK (chinasi proteica attivata dal metogeno). I pazienti con HCC proliferativo di solito hanno livelli sierici di alfa-fetoproteina più elevati e un esito clinico avverso. Questi tumori sono anche più spesso scarsamente differenziati (16).

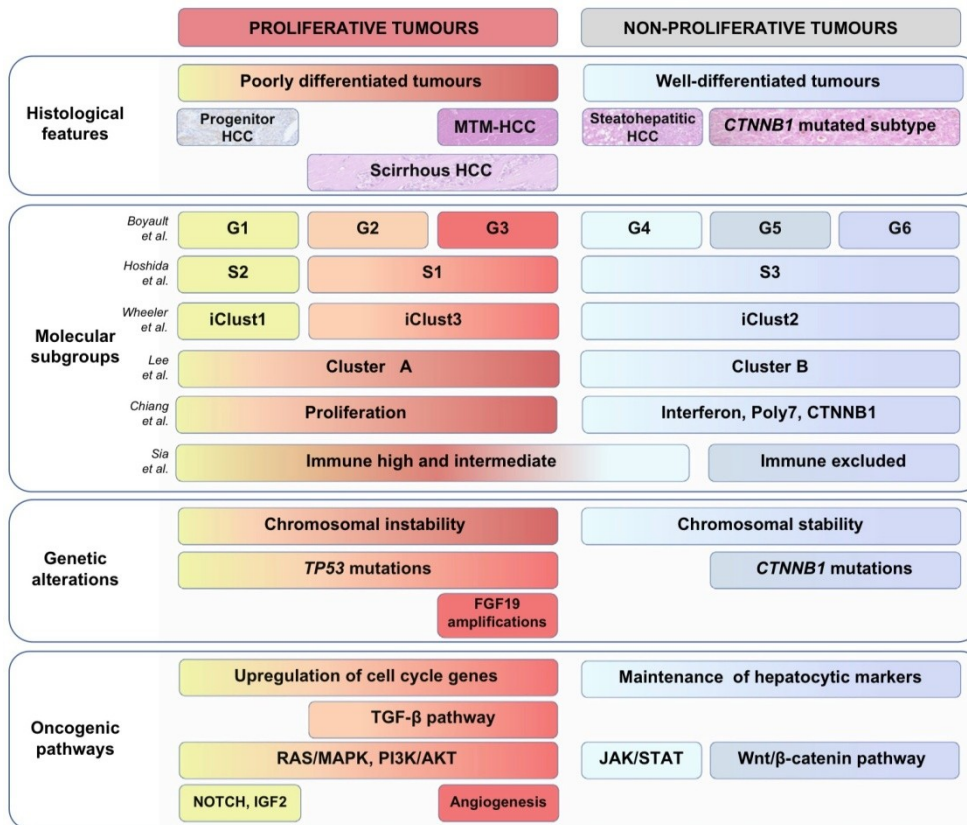


Figura 2: integrazione delle caratteristiche istologiche dell'HCC, della classificazione trascrittomico e delle alterazioni genetiche. Tratto da (16)

Varianti morfologiche/molecolari di HCC

1) HCC CTNNB1 mutato

CTNNB1 codifica per la β -catenina, un trasduttore intracellulare chiave nella via di segnalazione Wnt, che regola la fisiologia e la zonazione del fegato (17). La mutazione di CTNNB1 provoca la stabilizzazione della β -catenina ed il suo successivo accumulo nucleare, dove interagisce con vari fattori di trascrizione che migliorano la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule. Diversi studi hanno dimostrato che gli HCC con mutazioni in CTNNB1 mostrano un fenotipo particolare con tumori ben differenziati, pseudoghiandolari, colestasi intratumorale e mancanza di infiltrazione immunitaria. Coerentemente, questi tumori mostrano un'espressione mantenuta di vari geni coinvolti nella differenziazione e nella funzione epatocellulare, come APOB, ALB, HNF1A o HNF4A (18). In questo sottotipo di HCC è stata osservata anche una grave

disregolazione nell'espressione dei trasportatori dei sali biliari che può, almeno in parte, contribuire al loro fenotipo colestatico.

2) MTM HCC

Il sottotipo macrotrabecolare-massivo (MTM-HCC) rappresenta il 10-20% di tutti i casi di HCC, è definito su campioni chirurgici da un modello architettonico macrotrabecolare predominante (> 50% dell'area tumorale). S'identifica più frequentemente in pazienti con infezione da HBV e con alti livelli sierici di alfa-fetoproteina. Presenta un fenotipo molto aggressivo, con frequenti noduli satelliti e invasioni macrovascolari e/o microvascolari. L'attivazione dell'angiogenesi è una caratteristica distintiva del sottotipo MTM-HCC, con sovraespressione sia dell'angiopoietina 2 che del fattore di crescita endoteliale vascolare A (VEGFA). A livello genetico, MTM-HCC esprime spesso mutazioni TP53 e/o amplificazioni FGF19 (16).

3) Scirrhous HCC

Il sottotipo scirroso è caratterizzato da uno stroma fibroso abbondante e denso in cui sono incorporati cluster di cellule neoplastiche. In questa variante prevale l'espressione di vari geni delle cellule staminali progenitrici o tumorali, tra cui CK7 (KRT7), CK19 (KRT19), THY1 o CD133 (PROM1), e s'ipotizza che gli HCC scirrosi esprimano tratti molecolari intermedi tra HCC e colangiocarcinoma (16).

4) HCC steatoepatitico

Questo sottotipo distintivo è definito dalle caratteristiche istologiche della steatoepatite alcolica o analcolica, vale a dire infiltrati infiammatori, degenerazione balloniforme, fibrosi pericellulare e corpi di Mallory-Denk (12). Questi tumori sono più spesso ben differenziati e condividono un profilo di espressione genica simile a quello del fegato non tumorale. Nel microambiente dell'HCC steatoepatitico, rispetto all'HCC classico, i fibroblasti associati al cancro sono caratterizzati da una sovraregolazione dell'interleuchina-6, un regolatore chiave della via JAK/STAT. In questo contesto, è stata identificata la

sovraespressione della proteina C-reattiva – un gene bersaglio della segnalazione JAK/STAT – da parte delle cellule neoplastiche (14).

5) Lymphoepithelioma-like HCC

Questa rara variante (<5%) dell'HCC è stata associata a una migliore sopravvivenza globale rispetto ad altri sottotipi, sostenendo l'ipotesi che l'infiltrato linfocitico rifletta un'efficace immunità antitumorale. Attualmente manca una definizione consensuale di LEL-HCC. L'associazione con il virus di Epstein-Barr è stata identificata in una frazione significativa di LEL-HCC (16).

6) HCC con cellule progenitrici

Il cosiddetto sottotipo progenitore di HCC non è di per sé una variante morfologica, è definito dall'espressione immunoistochimica della citocheratina 19 (marcatore di linea biliare) in oltre il 5% delle cellule neoplastiche. Questo particolare fenotipo può essere il risultato di una dedifferenziazione degli epatociti neoplastici, o riflettere la trasformazione maligna delle cellule progenitrici epatiche. In effetti, ci sono prove crescenti che le cellule progenitrici, attivate durante le malattie epatiche acute e croniche, possano dare origine direttamente all'HCC. Questo fenotipo è associato a mutazioni TP53 (16).

1.1.5 Presentazione clinica

La presentazione clinica del carcinoma epatocellulare può variare da pazienti completamente asintomatici a pazienti con sintomi debilitanti come dolore, letargia, ittero, encefalopatia epatica, anasarca, ascite, sanguinamento da varici, diarrea e manifestazioni cutanee (19). Attualmente i programmi di screening dei pazienti a rischio consentono di riconoscere una buona parte dei casi di HCC in fase iniziale, in assenza di qualsiasi sintomatologia specifica. Fanno eccezione le forme che insorgono su fegato normale e la variante fibrolamellare, che rimangono al di fuori dei programmi di sorveglianza. Talora i pazienti lamentano una sensazione di tensione o di vago dolore all'ipocondrio destro. Quando la sostituzione di parenchima epatico con tessuto tumorale è critica, la funzionalità epatica già compromessa dalla cirrosi coesistente mostra un progressivo

peggioramento con i segni clinico-laboratoristici correlati: alterazione della coagulazione plasmatica, riduzione della sintesi di albumina, riduzione della capacità di captazione e dismissione della bilirubina, aumentata sensibilità ai farmaci. I segni legati ad una sindrome paraneoplastica, osservabile in circa il 20% dei soggetti, comprendono diarrea, eritrocitosi, febbre, ipoglicemia (9). Inoltre il paziente può manifestare dolore osseo associato all'ipercalcemia, causato da metastasi osteolitiche (19). La sintomatologia collegata all'HCC è quanto mai variabile e facilmente confondibile con quella dovuta ad un aggravamento della cirrosi (20). Nel 90-95% dei pazienti con carcinoma epatocellulare si manifesta una triade composta da dolore al quadrante superiore destro, massa palpabile e perdita di peso. Nei pazienti non cirrotici, all'esame obiettivo si possono valutare distensione addominale, anoressia, epatomegalia, deperimento e dolore al quadrante superiore destro. Una complicanza fatale dell'HCC è la *"tumour rupture"*, in cui il paziente manifesta ipotensione, irritazione del peritoneo e forte dolore addominale (19). Le manifestazioni cutanee dell'HCC includono la pitiriasi rotonda, segno di Leser-Trélat, dermatomiosite e pemfigo foliaceo. La porfiria cutanea tarda è stata associata a pazienti con carcinoma epatocellulare da HCV (19). L'HCC può diffondersi per via linfatica ed ematogena. La diffusione intraepatica attraverso la vena porta è la via più comune e la frequenza aumenta con le dimensioni del tumore. La diffusione extraepatica è comune nello stadio di malattia avanzata, con diffusione ai polmoni, ai linfonodi, alle ossa e alle ghiandole surrenali (36).

1.1.6 Anatomia Patologica

Lesioni precursore

1) Adenoma epatocellulare

Sebbene la sequenza adenoma-carcinoma non rappresenti una via frequente nella carcinogenesi epatica, l'adenoma epatocellulare può agire come una lesione precursore dell'HCC (21). Si sviluppa prevalentemente in pazienti di sesso femminile che usano contraccettivi orali, ma è stata anche descritta in pazienti di sesso femminile con diabete di tipo giovanile 3 (22). Nei maschi l'adenoma epatocellulare è stato descritto principalmente in pazienti con malattia da accumulo di glicogeno o in corso di trattamento con androgeni, presenta mutazioni della beta-catenina ed ha un rischio maggiore di trasformazione maligna (23). La diagnosi differenziale tra adenoma e HCC ben differenziato insorto nel fegato non cirrotico può essere difficile.

2) Focolai displastici

I focolai displastici sono lesioni uniformi e la loro morfologia, colorazione citoplasmatica, dimensione nucleare e atipia cellulare le discrimina dal tessuto epatico circostante. Per definizione, questi *clusters* sono di dimensioni < 1 mm e non soddisfano i criteri per la malignità, come la crescita invasiva. Una lesione simile difficile da distinguere è la displasia a piccole cellule. Questi sono focolai rotondi di piccole cellule displastiche con un aumentato rapporto nucleo/citoplasma. Di solito si osservano nei fegati cirrotici e sono anche considerate lesioni premaligne, a causa del loro aumento dell'indice di proliferazione e del basso tasso di apoptosi (24).

3) Noduli displastici

Contrariamente ai focolai displastici, i noduli displastici sono definiti di dimensione maggiore di 1 mm. Queste lesioni si trovano solitamente nel contesto della cirrosi, e sono generalmente suddivise in lesioni di basso grado e di alto grado. Entrambi i sottotipi sono stati descritti come possibili lesioni

precursore dell'HCC, ma in letteratura ne è stata descritta anche la regressione (24).

Anatomia macroscopica

All'esame macroscopico l'epatocarcinoma appare come un nodulo avvolto da una capsula, di colorito giallo/ marrone chiaro o verdastro, nel caso in cui gli epatociti neoplastici conservino la capacità di produrre la bile (25). L'HCC avanzato può essere classificato grossolanamente nei seguenti gruppi macroscopici: nodulare, massivo e diffuso. Il tipo nodulare può essere costituito da uno o più noduli. I singoli noduli sono generalmente incapsulati e possono mostrare una crescita extracapsulare in prossimità del nodulo primario. Il tipo multinodulare è un raggruppamento di una quantità variabile di piccoli noduli. Il tipo massivo è definito come un grande tumore con demarcazione irregolare. Questo aspetto morfologico può essere visto anche nell'HCC nodulare in stadio avanzato. Il tipo diffuso è caratterizzato da molti piccoli noduli in un lobo del fegato o nell'intero organo (26).

Caratteristiche istologiche

Le caratteristiche isto-morfologiche classiche dell'HCC sono le seguenti: tumore con differenziazione epatocitaria morfologica e/o immunohistochimica (talora è necessaria la dimostrazione) con perdita della normale architettura del fegato che si estrinseca in perdita della trama reticolinica, mancanza della triade portale, aumento della vascolarizzazione arteriosa (arterializzazione con arterie o arteriole spaiate), assenza di cellule di Kupffer, trabecole larghe di elementi neoplastici (> 3 cellule), alterazioni a piccole cellule, atipia citologica variabile, incremento della attività mitotica (27). È possibile osservare frequentemente la produzione di bile. All'interno delle cellule tumorali possono essere presenti anche inclusioni come i corpi di Mallory, corpi ialini e i corpi pallidi (28). L'epatocarcinoma può avere diversi pattern di crescita: trabecolare, pseudoghiandolare, solido, macrotrabecolare (quest'ultimo associato a prognosi peggiore) (25). Circa la metà dei casi presenta pattern di crescita misto.

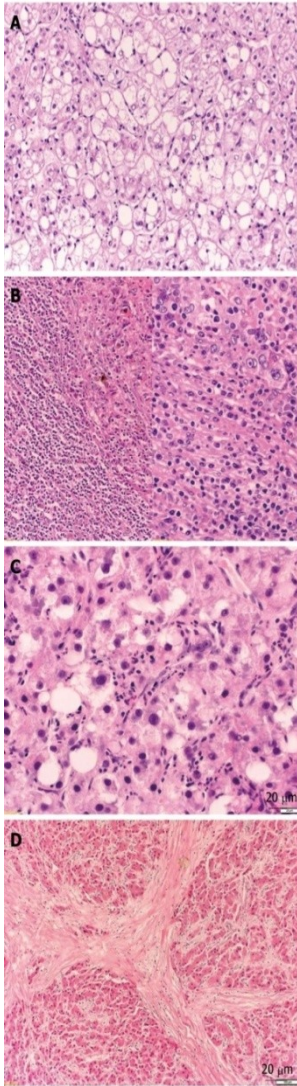


Figura 3: Varianti istologiche dell'epatocarcinoma: A) variante a cellule chiare, B) HCC con stroma linfoide, C) HCC steatoepatitico, D) HCC fibrolamellare. Tratto da (24)

Caratteristiche citologiche

Le cellule neoplastiche nell'HCC sono poligonali, con elevato rapporto nucleo/citoplasma, membrana nucleare irregolare, atipia nucleare, sono spesso multinucleate. Il citoplasma varia da limpido a eosinofilo, a seconda del contenuto di grassi e di glicogeno. Le alterazioni citoplasmatiche includono i corpi di Mallory-Denk, i corpi ialini e i corpi pallidi (29). Esistono inoltre alcune varianti citologiche; accanto alla tipica variante in cui le cellule neoplastiche sono molto simili agli epatociti normali, esistono la variante a cellule chiare e a grandi cellule pleomorfe (25).

Per quanto riguarda il grado di differenziazione del carcinoma epatocellulare, vengono presi in considerazione due principali sistemi in base alla somiglianza o meno all'epatocita normale (29):

1. Sistema della WHO (3 livelli) (36)

- Ben differenziato: le cellule tumorali assomigliano agli epatociti maturi; atipia nucleare da minima a lieve.
- Moderatamente differenziato: le cellule tumorali appaiono maligne e la morfologia suggerisce una differenziazione epatocellulare; atipia nucleare moderata.
- Scarsamente differenziato: le cellule tumorali appaiono maligne e spesso non possono essere distinte da altre neoplasie scarsamente differenziate; marcata atipia nucleare.

2. Sistema di Edmondson-Steiner modificato (4 livelli) (30)

- Grado I: le cellule tumorali sono difficili da differenziare dalle cellule epatiche iperplastiche.
- Grado II: le cellule tumorali assomigliano a epatociti maturi con nuclei leggermente più grandi e ipercromatici; bordi cellulari netti; frequente formazione di acini.
- Grado III: le cellule tumorali sono più grandi e hanno nuclei ipercromatici con citoplasma meno acidofilo; distorsione trabecolare; numerose cellule giganti tumorali.
- Grado IV: le cellule tumorali sono intensamente ipercromatiche, con citoplasma scarso e meno granulare; le cellule tumorali appaiono meno coese e possono apparire giganti, fuse o corte e carnose; pattern di crescita midollare con perdita di trabecolazione; meno acini.

1.1.7 Diagnosi e stadiazione

Come anticipato, l'incidenza dell'HCC sta aumentando in tutto il mondo: tra il 1990 e il 2015 i nuovi casi di diagnosi di HCC sono cresciuti del 75% . Per questo, l'identificazione e la sorveglianza delle popolazioni a rischio di HCC sono una questione di grande importanza in tutto il mondo (31).

La sorveglianza consiste nell'esecuzione dell'ecografia addome ogni 6 mesi. Vengono sottoposti a sorveglianza per HCC i pazienti cirrotici con Child Pugh A e B, Child Pugh C in lista per trapianto, pazienti non-cirrotici con infezione da HBV a rischio intermedio o alto di HCC e pazienti non cirrotici con fibrosi F3, a prescindere dall'eziologia (31).

Per l'iter diagnostico dell'epatocarcinoma le linee guida più recenti prevedono una distinzione iniziale in base al diametro della lesione focale epatica identificata (32):

- Per un nodulo ≤ 1 cm si consiglia una sorveglianza ecografica ogni 3 mesi per un anno: in assenza di variazioni dopo un anno si può tornare ai controlli semestrali standard; in caso di incremento dimensionale e/o modificazioni delle caratteristiche della lesione, è necessario un approfondimento diagnostico con esame di secondo livello (TC multifasica o RM multifasica o RM con acido gadoxetico).
- Per un nodulo > 1 cm, è necessario eseguire un esame di secondo livello (TC multifasica o RM multifasica o RM con acido gadoxetico): se viene evidenziato il tipico pattern vascolare contrastografico si conferma la diagnosi di HCC , se l'esame scelto non è dirimente bisogna passare a quello complementare (TC o RM). Se gli esami strumentali effettuati non sono dirimenti, sarà necessario effettuare una biopsia per la valutazione istologica.

Markers tumorali

- **α -fetoproteina:** L' α -fetoproteina (AFP) è una glicoproteina normalmente prodotta durante la vita fetale dal fegato e dal sacco vitellino, e i pazienti con HCC spesso mostrano un aumento della sua concentrazione (19). Un'elevata AFP può essere correlata anche all'infezione da HCV (33). L'AFP ha tre glicoforme, e AFP-L3 è l'isoforma principale nel siero dei pazienti con HCC. Tuttavia, ci sono diversi svantaggi nell'utilizzo della AFP per quanto riguarda la diagnosi precoce. In primo luogo, il tasso di positività di AFP nell'HCC è di circa il 60-80%, il che non è sufficiente per renderlo un biomarcatore sensibile. In secondo luogo, si possono registrare falsi positivi durante la gravidanza o in caso di altre malattie epatiche o gastrointestinali. In terzo luogo, possono verificarsi risultati falsi negativi (34). Sebbene altri biomarcatori possano mostrare sensibilità e specificità simili o migliori, l'AFP è ancora il biomarcatore di screening più comunemente utilizzato. I valori di AFP aumentano nel siero della donna durante la gravidanza; esistono peraltro casi di incremento familiare di AFP sierica in assenza di qualsiasi condizione patologica. L'AFP aumenta inoltre nel siero di pazienti con epatite acuta o in corso di esacerbazione di un'epatite cronica, così come in corso di cirrosi epatica o di attiva rigenerazione epatica (dopo resezione). L'AFP aumenta costantemente nel siero di pazienti con tumori germinali del testicolo, mentre vengono riferiti isolati casi di elevazione dell'AFP in pazienti con tumori del tratto gastroenterico e del pancreas. L'importanza di questo antigene per la diagnosi di HCC fu suggerita per la prima volta nel 1964. La sua applicazione ha contribuito all'identificazione del tumore; la sua specificità è molto elevata, assumendo come limite diagnostico 200-400 ng/ml. La sua sensibilità è tuttavia piuttosto bassa perché i pazienti che presentano simili valori non superano il 30-40% dei casi. Il dosaggio di AFP è comunemente utilizzato nei programmi di screening dei pazienti a rischio, per il riconoscimento precoce dell'HCC (20).

- **Antigeni proteici**

HSP: Le heat shock proteins (HSP) sono molecole che si formano nelle cellule esposte allo stress, inclusa la cancerogenesi. HSP 70 e HSP 27 sono state trovate nei tessuti di epatocarcinoma; l'HSP 70 è correlata all'invasione della vena porta, allo stadio e alle dimensioni del tumore, l'HSP 27 è stata osservata in pazienti con HCC da epatite B (34,35).

SCCA: L'antigene del carcinoma a cellule squamose (SCCA) è un inibitore della proteasi della serina che può essere trovato ad alti livelli nei pazienti con HCC, e aiuta le cellule tumorali ad eludere l'apoptosi (37). I livelli di SCCA possono alzarsi durante le fasi iniziali dell'HCC. Questo risultato rende SCCA un marker complementare per l'AFP.

- **Citochine**

È stato indicato che il fattore di crescita trasformante- β 1 (**TGF- β 1**) è un buon marker supplementare nella diagnosi di carcinoma epatocellulare, poiché ha una sensibilità maggiore dell'AFP. Il TGF- β 1 ha un ruolo nella regolazione cellulare, inclusa l'angiogenesi, la differenziazione, l'invasione e la proliferazione cellulare (34,38). Ha un effetto immunosoppressivo, inibendo la proliferazione delle cellule natural killer e delle cellule T citotossiche, che consente alle cellule tumorali di crescere.

Il fattore di crescita endoteliale vascolare (**VEGF**) regola la migrazione endoteliale, la formazione di nuovi vasi, l'invasione e le metastasi. L'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare nei pazienti con carcinoma epatocellulare è sovraregolata e correlata alla prognosi e alla recidiva del tumore (34).

L'interleuchina (**IL-8**) è una chemochina che ha proprietà prognostiche e diagnostiche nei pazienti con carcinoma epatocellulare. IL-8 svolge un ruolo nella chemiotassi, nel rilascio di enzimi e nell'espressione delle molecole di adesione nei neutrofili, nonché nella proliferazione e metastasi del tumore. Rispetto agli adulti sani, i livelli di IL-8 nei pazienti con carcinoma epatocellulare risultano più alti. È stato dimostrato che la sovraespressione di IL-8 è un indicatore delle dimensioni del tumore, dell'assenza della capsula e dell'invasione vascolare (19).

- **Biomarker genetici**

I microRNA (miRNA) sono nuovi biomarcatori per la diagnosi dell'HCC. I miRNA sono piccoli RNA non codificanti che bloccano efficacemente la traduzione, promuovendo la degradazione degli mRNA target. miR-29, miR-199a/b-3p e miR-122 sono down regolati nelle cellule HCC. miR-21 è l'unico upregolato nelle cellule HCC (34).

Metodiche d'imaging

Si può fare diagnosi di HCC se i risultati di almeno due tecniche d'imaging sono suggestivi, oppure se la positività di una sola tecnica si accompagna a valori di AFP > 200-400 ng/ml (20).

Ecografia

L'ecografia è una tecnica non invasiva esente da radiazioni, e ha un ruolo importante nella sorveglianza dell'HCC nei pazienti cirrotici. Tuttavia presenta degli svantaggi, in particolare la difficoltà nel differenziare tra tumori benigni e maligni. La combinazione di ecografia e livelli di AFP, aiuta nella diagnosi di carcinoma epatocellulare (39). Le lesioni di epatocarcinoma < 3 cm sono generalmente ipoecogene rispetto ai tessuti circostanti, mentre le lesioni > 3 cm sono iperecogene con un pattern a mosaico o infiltrativo e possono avere una capsula sottile (19). L'ecografia senza contrasto non è il metodo di scelta per rilevare l'HCC, ed è stato sostituito con la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (MRI) a causa della loro maggiore sensibilità e valore predittivo positivo. L'utilizzo di apparecchiature moderne dotate di Doppler pulsato, color- e power- Doppler, consentono di dimostrare la vascolarizzazione dell'HCC, molto ricca nella maggior parte dei casi e costituita da vasi irregolari con flusso arterioso ad alta velocità sistolica con bassa componente diastolica (20).

Tomografia computerizzata

La TC è una tecnica radiologica ampiamente utilizzata per la diagnosi dell'HCC. Il carcinoma epatocellulare è una lesione tumorale ipervascolarizzata, durante il suo sviluppo vi è una perdita di afflusso di sangue venoso portale con formazione di arterializzazione collaterale. Il mezzo di contrasto endovenoso viene utilizzato per ottenere una migliore diagnosi, e può essere suddiviso in una fase arteriosa, una fase portale e una fase ritardata (40). Quando viene introdotto il mezzo di contrasto per via endovenosa, si verifica un aumento dell'enhancement arterioso, seguito da un ritardo nella fase di "washout" venoso. Questo pattern è un segno caratteristico per la diagnosi di HCC. La TC ha dimostrato una sensibilità migliore rispetto all'ecografia ma inferiore rispetto alla risonanza magnetica (19). La TC è scarsamente efficace nell'identificare noduli di rigenerazione o nodi displastici, l'impiego del contrasto non evidenzia questo tipo di lesioni perché la loro vascolarizzazione è prevalentemente portale, come per il circostante parenchima (20).

Risonanza magnetica

La tecnica consente di identificare lesioni tumorali nel fegato in rapporto alla differente risonanza magnetica del tessuto normale e di quello patologico. La RM può essere eseguita in condizioni basali o utilizzando mezzi di contrasto, tra i quali il più noto è il gadolinio che rende maggiormente evidenti le lesioni più vascolarizzate. L'HCC appare più spesso isointenso o ipointenso nelle immagini pesate in T1, iperintenso nelle immagini pesate in T2. La sensibilità diagnostica della RM con gadolinio per l'identificazione di piccoli HCC è buona (20). La risonanza magnetica consente la caratterizzazione dei noduli rigenerativi (che non hanno tendenza alla trasformazione maligna), evitando il rischio di negare il trapianto ad un paziente con HCC e macronodi rigenerativi nella erronea presunzione di una sua multifocalità, o viceversa di intraprendere terapie invasive ancorché inappropriate (41).

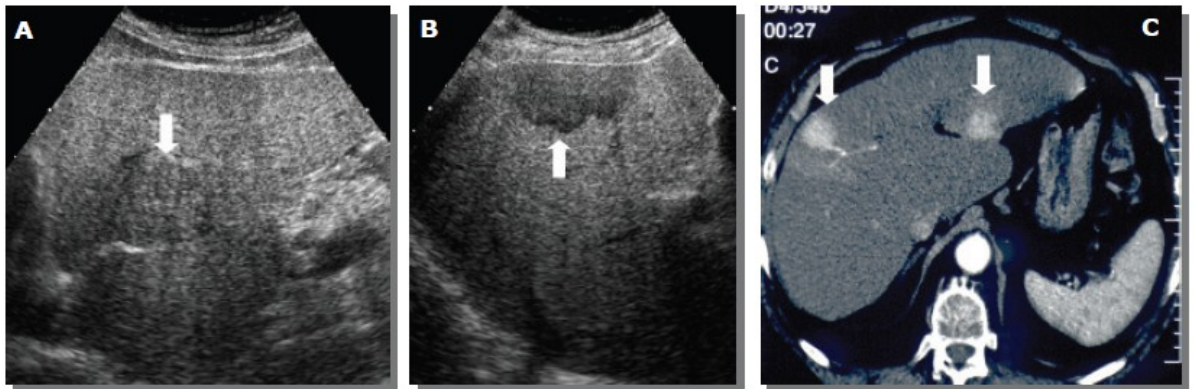


Figura 4: HCC a doppio nodo in cirrosi epatica: A) L'esame ecografico dimostra in scansione longitudinale sul lobo sinistro una lesione focale ipoecogena (freccia) e, B) lesione ipoecogena di 4 cm (freccia) del V segmento a margini irregolari. C) la TAC dimostra intenso enhancement in fase arteriosa precoce di entrambe le lesioni (freccie). Tratto da (20)

Angiografia

L'angiografia è importante nella stadiazione della malattia, in previsione di trattamenti chirurgici. Dal punto di vista diagnostico è stata invece pressoché completamente sostituita da ecografia, TC e RM (20).

PET

La tomografia a emissione di positroni (PET) ha un uso limitato come strumento diagnostico nell'HCC. Viene invece utilizzata per valutare la diffusione dell'HCC nei tessuti al di fuori del fegato. L'imaging PET si basa sul glucosio radiomarcato (fludeossiglucosio [18F-FDG]), che si lega alle cellule neoplastiche dimostrandone una maggiore attività metabolica (19).

Biopsia epatica

La conferma dell'HCC può essere effettuata con la biopsia percutanea mediante fine needle aspiration biopsy, core biopsy, o biopsia transgiugulare. Ha una maggiore sensibilità e specificità rispetto alle tecniche non invasive e può essere utilizzata per rilevare l'epatocarcinoma con caratteristiche che non soddisfano i parametri radiologici o di laboratorio (42). Le complicazioni non sono comuni durante la biopsia, ma possono verificarsi infezioni, emorragie, o il rischio di diffusione di cellule tumorali dall'ago della biopsia. Le controindicazioni alla

biopsia sono la conta piastrinica $< 50.000 \text{ mm}^3$ o il rapporto INR > 2 . I tassi di mortalità per le procedure della biopsia sono bassi e variano tra lo 0,006% e lo 0,3%, sebbene gli errori di campionamento e la biopsia ripetuta siano problemi clinici frequenti (43). La sensibilità diagnostica del prelievo citologico è attorno al 90%. Mentre la diagnosi è per lo più chiara nei casi in stadio avanzato, lesioni piccole, precoci e quindi per lo più ben differenziate possono essere problematiche. A causa dei programmi di screening stabiliti nei pazienti cirrotici, le biopsie di queste lesioni problematiche sono aumentate di numero (24). Per ovviare alla difficoltà diagnostica presentata dai tumori a cellule ben differenziate, può essere utile eseguire un doppio prelievo citologico e istologico (20).

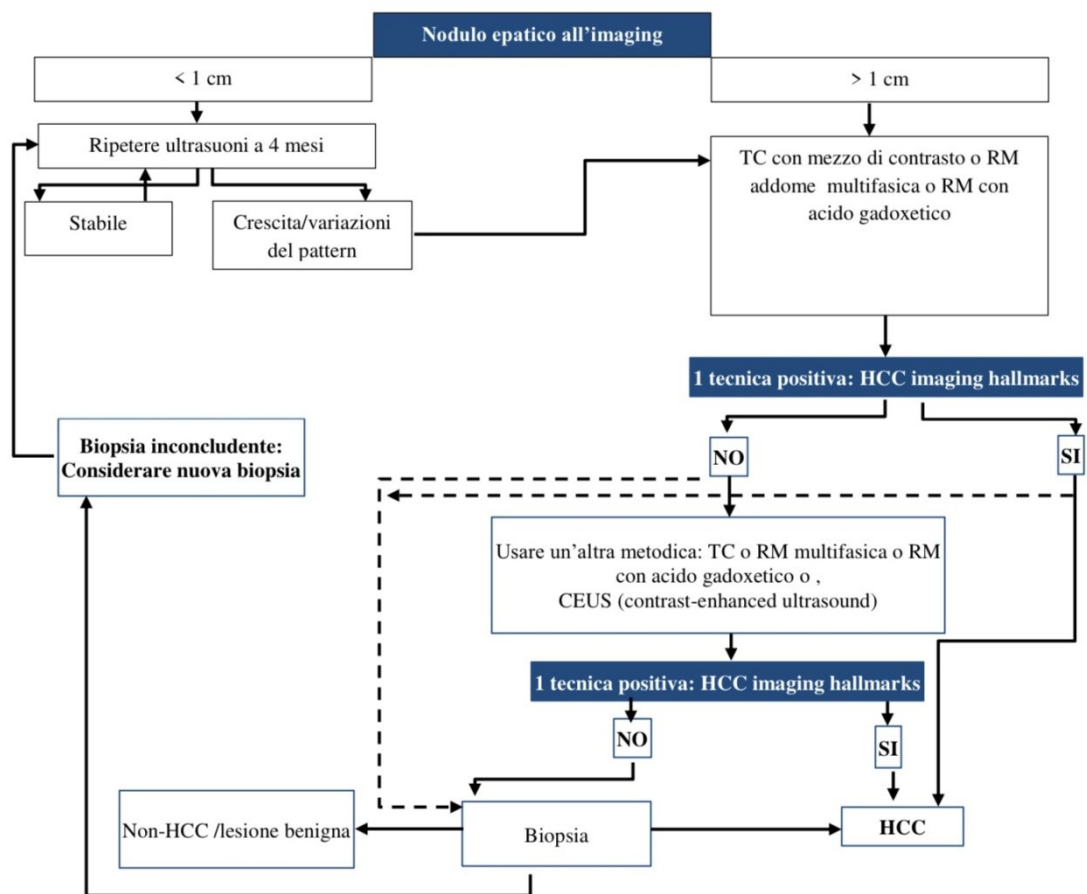


Figura 5: iter diagnostico dell'epatocarcinoma. Tratto da (32)

Diagnosi differenziale

Oltre alla diagnosi differenziale con i noduli di rigenerazione ed i noduli displastici, l'HCC deve essere differenziato sia da lesioni benigne che maligne di altra natura. Tra le lesioni benigne, l'HCC di piccole dimensioni può apparire all'esame ecografico simile all'angioma (nodulo ipercogeno). La presenza di metastasi nel fegato cirrotico è un'evenienza piuttosto infrequente, in ogni caso i segni del tumore primitivo e le stesse caratteristiche d'imaging possono condurre alla diagnosi corretta, anche se in alcuni casi è indispensabile ricorrere alla biopsia (20).

Stadiazione

Generalità

In Italia, la maggior parte dei casi di HCC insorge in pazienti affetti da cirrosi epatica, che presentano un grado variabile d'insufficienza epatica. Pertanto, la prognosi dei pazienti con HCC è condizionata non solo dall'estensione della neoplasia, ma anche dalla residua funzione epatica. Questo spiega perché i sistemi di stadiazione che prendono in considerazione solo la funzione epatica (Child-Pugh) o solo l'estensione della neoplasia (TNM) non permettano di ottenere indicazioni prognostiche soddisfacenti nei pazienti con HCC (4).

Sistemi di stadiazione

Per quanto riguarda l'epatocarcinoma sviluppatosi su fegato cirrotico, non esiste un unico sistema di stadiazione universalmente applicato, come accade invece con il TNM per la maggior parte dei tumori solidi. La stadiazione TNM non considera il grado di funzione epatica residua, che rappresenta un parametro indispensabile ai fini prognostici e di scelta del trattamento (4). Pertanto, sono stati proposti numerosi sistemi di stadiazione; la maggior parte di questi sistemi hanno solo una valenza prognostica e, tra questi, il CLIP (Cancer of the Liver Italian Program) score (44) è quello maggiormente studiato e validato in diverse popolazioni.

L'algoritmo BCLC (Barcelona Clinic for Liver Cancer) invece, fornisce anche un'indicazione terapeutica di prima scelta per ogni stadio, ed è il più utilizzato nel mondo occidentale (45). Recentemente, è stato generato il sistema ITA.LI.CA (46,47) che ha dimostrato di possedere la migliore accuratezza prognostica fra i sistemi più usati. Oltre al sistema BCLC e a quello ITA.LI.CA, anche il sistema dell'Honk Kong Liver Cancer (HKLC), sempre più diffuso nel mondo orientale (48), fornisce indicazioni terapeutiche in funzione dello stadio.

Sebbene ci siano alcuni nuovi sistemi di stadiazione per l'HCC sviluppati in diverse parti del mondo, non esiste un sistema di stadiazione accettato a livello globale che consenta il confronto degli attuali protocolli di gestione tra popolazioni eterogenee. I diversi sistemi di stadiazione dell'HCC attuali sono l'Okuda, il punteggio CLIP (Cancer of the Liver Italian Program), il punteggio MESIAH (Model to Estimate Survival In Ambulatorio HCC), ITA.LI.CA (Italian Liver Cancer), la stadiazione BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer), la stadiazione HKLC (Hong Kong Liver Cancer) e l'algoritmo Alberta. Nonostante i limiti del sistema di stadiazione BCLC, esso rimane il sistema più validato e affidabile per la prognosi (49).

PARAMETRO	PUNTEGGIO		
	0	1	2
Child-Pugh	A	B	C
Morfologia del tumore	Uninodulare e ≤50% di fegato coinvolto della neoplasia	Multinodulare e ≤50% di fegato coinvolto della neoplasia	Massivo o > 50% di fegato coinvolto della neoplasia
Trombosi portale	Assente	Presente	
Valore di Alfafetoproteina	< 400 ng/ml	≥400 ng/ml	

Tabella I: CLIP score. Adattato da (4)

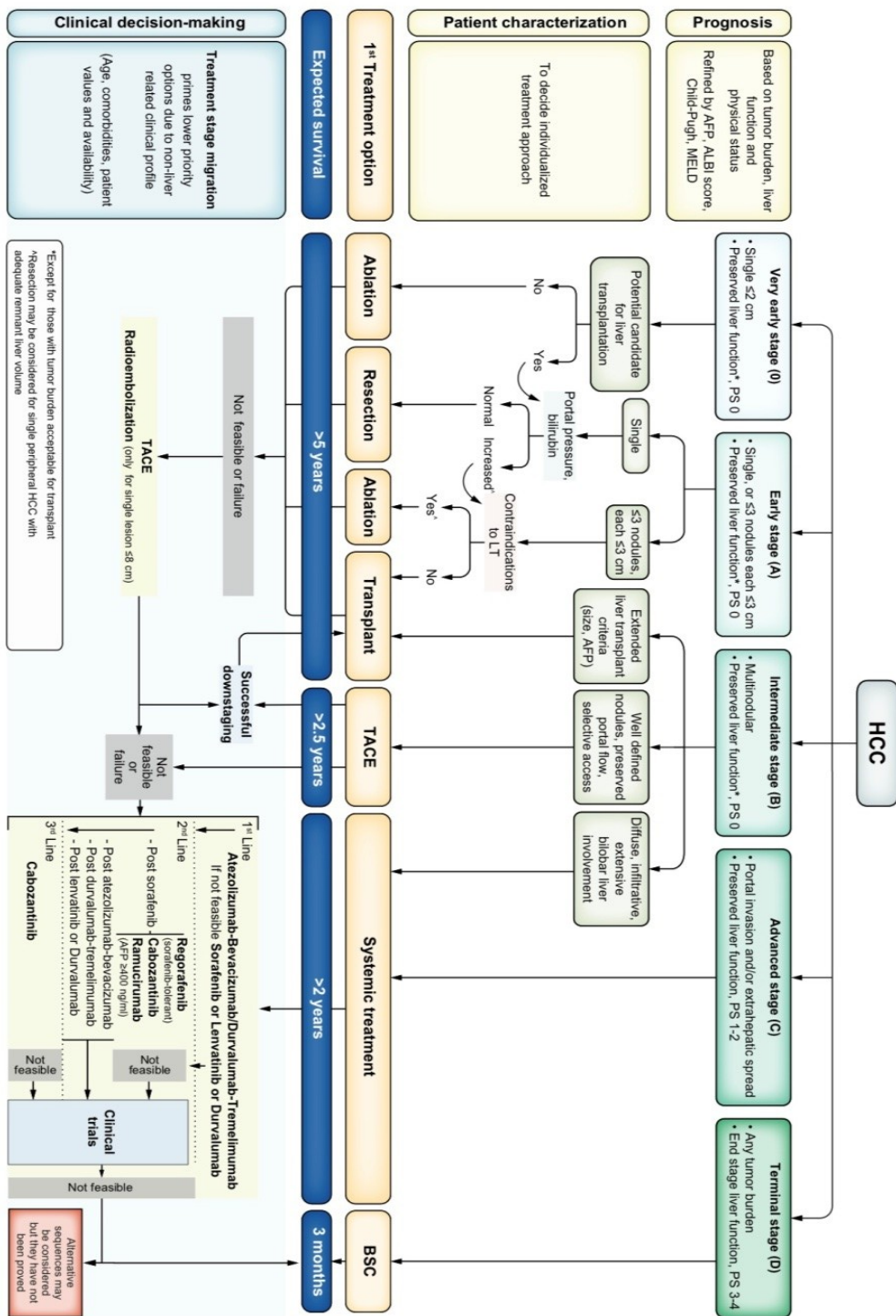


Figura 6: stadiazione BCLC e strategie di trattamento. Tratto da (50)

Fattori prognostici HCC

La prognosi dei pazienti con carcinoma epatocellulare è generalmente sfavorevole, in particolare con carcinoma epatocellulare in stadio avanzato. La maggior parte degli studi riporta un tasso di sopravvivenza a 5 anni < 5% nei pazienti con carcinoma epatocellulare sintomatico non resecabile. La sopravvivenza a lungo termine è probabile solo nei pazienti con carcinoma epatocellulare di piccole dimensioni e asintomatico, trattabili mediante resezione completa, trapianto di fegato o trattamento locoregionale. I fattori clinici, morfologici e molecolari vengono utilizzati per predire la prognosi del paziente (Tabella II) (36).

Caratteristiche cliniche/imaging	Caratteristiche morfologiche	Caratteristiche molecolari
<ul style="list-style-type: none"> • AFP, DCP • Dimensioni e numerosità tumorale • Invasione dei grossi vasi all'imaging • Comorbidità, condizioni di salute 	<ul style="list-style-type: none"> • Grado tumore • Invasione vascolare e metastasi intraepatiche • Stadio • Sottotipo • Presenza/assenza di cirrosi • Espressione immunoistochimica di CK19 	<ul style="list-style-type: none"> • Amplificazione di FGF19 • Profilo di espressione genetica: sottoclasse proliferativa/ non proliferativa

Tabella II: Fattori prognostici nel carcinoma epatocellulare. Tratto da (36)

1.1.8 Trattamento HCC

Attualmente, le opzioni di trattamento disponibili per l'HCC includono la resezione chirurgica, il trapianto di fegato, le terapie locoregionali minimamente invasive tra cui l'ablazione percutanea, la chemioembolizzazione transarteriosa (TACE) e la radioembolizzazione transarteriosa (TARE) (49).

L'ablazione con radiofrequenza (RFA), l'ablazione a microonde e la crioablazione eliminano le cellule tumorali grazie alle temperature estreme utilizzando elettrodi ad ago (51). Poiché il maggior apporto di sangue dell'HCC deriva dall'arteria epatica, l'iniezione transarteriosa con una miscela di lipiodol, farmaci

chemioterapici e gelfoam o microsferi (TACE convenzionale) o sfere a rilascio di farmaco (DEB TACE) o Itrio 99 (TARE), porta alla necrosi tumorale. La radioterapia interna selettiva (SIRT) induce la morte delle cellule tumorali mediante emissione di raggi beta (52). Le terapie mediche quali chemioterapie, antiestrogeni, antiandrogeni, interferone, somatostatina non hanno fornito risultati apprezzabili (20).

I criteri di Milano guidano la decisione per eseguire il trapianto di fegato (20). In passato venivano ammessi al trapianto pazienti con tumore estremamente avanzato, ma i risultati insoddisfacenti hanno portato a rivedere questo atteggiamento. Ad oggi i pazienti vengono messi in lista per il trapianto secondo criteri più restrittivi: pazienti con cirrosi epatica in fase avanzata (classi B e C di Child) tali da non consentire un trattamento chirurgico di resezione; tumore singolo <5 cm oppure tumore multiplo (in questo caso sono accettati anche pazienti in classe A di Child) ma con non più di tre noduli, ciascuno con diametro <3 cm. L'età dei pazienti deve essere inferiore a 65 anni. Seguendo questi criteri si ottiene una sopravvivenza a 4 anni pari al 75% con sopravvivenza libera da malattia dell'83% (53) (Tabella III).

Sebbene i nuovi farmaci antivirali per il virus dell'epatite B (HBV) come Tenofovir ed Entecavir abbiano riportato benefici per la soppressione della replicazione dell'HBV, non è noto che prevengano il rischio di HCC nei pazienti cirrotici (54). Nel frattempo, i regimi antivirali contro l'HCV, inclusi Sofosbuvir, Ledipasvir, Daclatasvir e Ribavirina, si sono dimostrati efficaci nel prevenire lo scompenso del fegato e possono ridurre la recidiva del tumore dopo la terapia curativa. La crescente incidenza di HCC causato dalla NASH, spiega la necessità di una sorveglianza attiva per lo sviluppo di HCC nei pazienti con NAFLD, promuovendo l'uso di farmaci ipolipemizzanti come le statine, e modifiche dello stile di vita per controllare la sindrome metabolica. Diversi nuovi farmaci emergenti tra cui l'acido obeticolico, la Liraglutide, l'Elafibranor, il Cenicriviroc e l'Aramcholare potrebbero essere utilizzati per trattare la NASH e prevenire ulteriormente lo sviluppo di HCC. Tuttavia, la loro efficacia dovrà essere studiata in futuri studi clinici (49).

In assenza di studi randomizzati fra i diversi tipi di trattamento, un giudizio sull'efficacia delle singole terapie è difficile. La scelta del paziente da trattare e la scelta del trattamento sono ancora oggetto di discussione. Esiste accordo sull'astensione da ogni trattamento per i pazienti in stadio C e D della classificazione BCLC e che i pazienti allo stadio A vadano trattati con terapia potenzialmente radicale: resezione chirurgica, trapianto epatico o trattamenti ablativi percutanei. Non esistono atteggiamenti univoci nei confronti dei pazienti con tumore multi nodulare (20).

I principali inconvenienti nel trattamento curativo dell'epatocarcinoma sono la recidiva (incidenza superiore al 70% a cinque anni) e l'indisponibilità di donatori adeguati per il trapianto di fegato. La terapia molecolare "target therapy", basata sulle vie molecolari che portano ai meccanismi cancerogeni dell'HCC, è un approccio terapeutico nuovo e promettente (1). La terapia sistemica dell'HCC con Sorafenib, un inibitore della tirosin-chinasi orale che blocca la via Raf/MEK/ERK e i recettori per il fattore di crescita endoteliale vascolare, è raccomandata nei pazienti con carcinoma epatocellulare in stadio avanzato (49). Sorafenib è stato il primo farmaco approvato nel 2007 dalla Food and Drug Administration per il trattamento dell'HCC avanzato (55) e ha dimostrato di migliorare la sopravvivenza in questo gruppo di pazienti. Da allora sono state studiate diverse altre *target therapy* come Lenvatinib, Regorafenib, Cabozantinib e Ramucirumab (56,57,58,59). Negli studi di fase 3 è stata riportata la durata mediana della sopravvivenza globale fino a 12,3 e 13,6 mesi con l'uso di Sorafenib e Lenvatinib, rispettivamente. Sopravvivenze complessive di 10,6, 10,2 e 9,2 mesi sono state raggiunte con l'uso di Regorafenib, Cabozantinib e Ramucirumab come terapia di seconda linea dopo Sorafenib (55). Tra le terapie di seconda linea vengono riconosciuti anche due immune checkpoints inhibitors, Nivolumab e Pembrolizumab, tuttavia negli studi di fase III, gli endpoint primari del miglioramento della OS con questi due farmaci non sono stati statisticamente significativi. Pertanto, la terapia con immune PD-1/PD-L1 checkpoint therapy deve essere ulteriormente studiata. Anche i chemioterapici antiangiogenetici sono

diventati un'importante strategia per il trattamento dell'HCC, che è un tipico tumore *blood-rich* che esprime vari fattori angiogenetici. Sono in corso di studio per l'epatocarcinoma i farmaci antiangiogenetici Bevacizumab, Brivanib, Linifanib, Sunitinib (60).

Indicazioni al trapianto di fegato	Controindicazioni al trapianto di fegato
<ul style="list-style-type: none"> • Insufficienza epatica acuta • Trombosi dell'arteria epatica entro 14 giorni dal trapianto di fegato • Cirrosi con: Scompenso (varici sanguinanti, encefalopatia epatica, o ascite) MELD score ≥ 15 Sindrome epatopolmonare o ipertensione portale • Neoplasie epatiche primitive: Colangiocarcinoma ilare (altamente selezionati, dopo protocollo di terapia neoadiuvante) Carcinoma epatocellulare secondo i criteri di Milano. • Condizioni metaboliche congenite: Fibrosi cistica con concomitante malattia epatica e polmonare Iperossaluria primitiva di tipo I con significativa insufficienza renale Polineuropatia amiloide familiare 	<p>Controindicazioni assolute</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neoplasia extraepatica attiva • Colangiocarcinoma intraepatico • Carcinoma epatocellulare che non soddisfa i criteri di Milano o metastatico • Severa malattia cardiopolmonare • Sepsi • Potus attivo o abuso di sostanza stupefacenti • AIDS • Mancata compliance del paziente o mancato supporto sociale • Barriere tecniche/anatomiche per il trapianto di fegato <p>Controindicazioni relative</p> <ul style="list-style-type: none"> • Età avanzata • Trombosi venosa portale • Infezione da HIV • MELD score < 15 • Obesità (body mass index [BMI] ≥ 40) • Scarse compliance e support sociale • Comorbidità psichiatriche attive

Tabella III: Indicazioni e controindicazioni al trapianto. Adattato da (61)

1.2 MECCANISMI DI MORTE CELLULARE E PATOLOGIE EPATICHE

1.2.1 Generalità

Negli organismi multicellulari, c'è uno sforzo costante per mantenere un equilibrio omeostatico tra il numero di nuove cellule generate tramite mitosi, ed il numero di cellule danneggiate o senescenti che vengono rimosse dal corpo tramite meccanismi di morte cellulare (62). La morte cellulare è un meccanismo d'importanza critica nello sviluppo di una malattia epatica. Sebbene avvenga fondamentalmente come risposta adattativa alle perturbazioni interne o esterne per ottenere un'eliminazione mirata delle cellule danneggiate o dannose, si verifica anche a causa di un fallimento nella risposta a insulti o stress eccessivi e comporta conseguenze patologiche come infiammazione, fibrosi e persino trasformazione neoplastica. Esistono diversi tipi di morte cellulare: apoptosi, necrosi, necroptosi, piroptosi, ferroptosi, parthanatos ed entosi (figura 7). Questi diversi tipi di morte possono manifestarsi negli epatociti, nei colangiociti o nelle cellule epatiche non parenchimali in modo dipendente dall'eziologia, dalla natura e dall'entità delle comorbilità e dallo stadio della malattia (63).

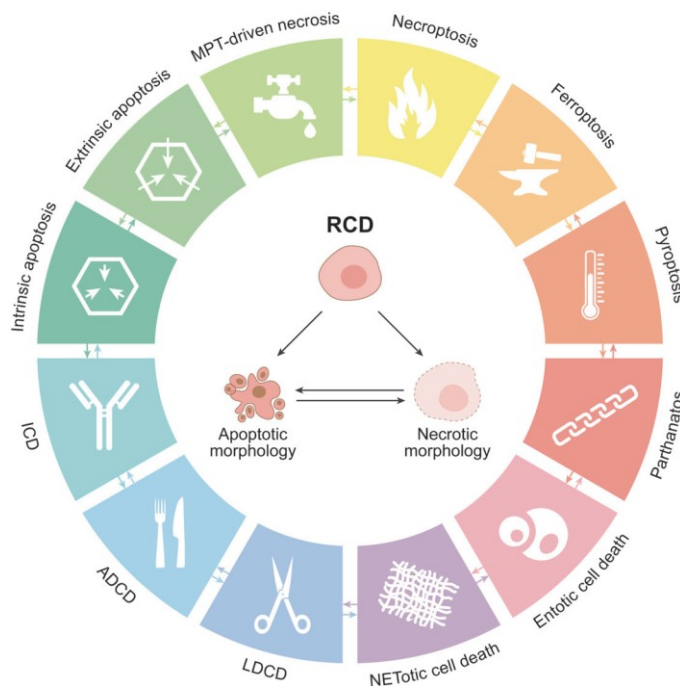


Figura 7: principali meccanismi di morte cellulare. Tratto da (64)

Necrosi

La necrosi è caratterizzata morfologicamente da rigonfiamento cellulare, rottura di membrana e rilascio del contenuto cellulare, che porta ad una successiva risposta infiammatoria. La necrosi è principalmente mediata dall'MPT, che caratterizza la formazione di pori di transizione della permeabilità nelle membrane esterna ed interna dei mitocondri, causando una rapida dissipazione del gradiente di potenziale di membrana, perdita della sintesi di ATP, rottura osmotica delle membrane e morte cellulare (63). I costituenti cellulari si riversano nell'ambiente extracellulare e scatenano risposte infiammatorie significative, rendendo la necrosi una forma immunogenica di morte cellulare (65).

Apoptosi

L'apoptosi è una morte cellulare programmata caratterizzata da frammentazione nucleare, condensazione della cromatina e restringimento cellulare (63), senza fuoriuscita del suo contenuto nell'ambiente circostante. L'inizio dell'apoptosi dipende dall'attivazione di una serie di proteasi, note come caspasi. L'apoptosi può essere avviata dalla cellula stessa quando rileva dei danni attraverso sensori intracellulari (via intrinseca), oppure può derivare dall'interazione tra una cellula del sistema immunitario e una cellula danneggiata (via estrinseca) (66,67). Entrambe le vie lavorano sinergicamente per garantire che gli organismi multicellulari rimangano sani e che le cellule difettose (come le cellule tumorali) vengano rimosse dal corpo. Infatti, uno degli *hallmarks of cancer* è proprio la capacità di evadere l'apoptosi (68).

La via intrinseca, nota anche come via mitocondriale dell'apoptosi (69), dipende da fattori rilasciati dai mitocondri. In assenza di segnali pro sopravvivenza quali citochine, ormoni, fattori di crescita nell'ambiente della cellula, le molecole pro-apoptotiche all'interno della cellula come Puma, Noxa e Bax normalmente inibite, diventano attive e avviano l'apoptosi. La caspasi 9 iniziatrice controlla la via intrinseca dell'apoptosi, ed è in grado di legarsi al fattore APAF 1 (apoptotic protease activating factor-1) in seguito

all'esposizione del suo dominio di reclutamento della caspasi (dominio CARD). Quando l'apoptosi è indotta da condizioni anomale quali l'assenza del fattore di crescita, il danno al DNA, lo stress del reticolo endoplasmatico, il sovraccarico di specie reattive dell'ossigeno, lo stress da replicazione, le alterazioni micro tubulari o i difetti mitotici (63), s'innescano modificazioni della membrana mitocondriale il cui risultato è l'apertura del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (MPT). Un volta aperto, le proteine pro apoptotiche (citocromo c, Smac/Diablo e HtrA2/Omi) sono in grado di fuoriuscire dai mitocondri nel citoplasma e attivare l'apoptosi (62). P53 è un altro regolatore della via di morte intrinseca e attraverso la regolazione principalmente trascrizionale di geni bersaglio specifici come Bax, induce l'apoptosi. Quando il danno è meno grave, p53 induce l'arresto del ciclo cellulare attraverso p21, consentendo la riparazione cellulare. Gli HCC comunemente sfuggono a questo sistema di controllo acquisendo mutazione di p53 (65).

La via estrinseca dell'apoptosi, anche conosciuta come via del recettore di morte (69), viene attivata quando le cellule NK o i macrofagi producono ligandi di morte (TNF, FAS ligando, TRAIL (65)), che grazie al legame con i loro death receptor (TNFR1 e FAS) nella membrana cellulare bersaglio inducono la via estrinseca, attivando la caspasi 8 tramite FADD e TRADD (63). Nel cancro, la cellula non riesce ad avviare l'apoptosi a causa di mutazioni dei meccanismi d'iniziazione oppure per mancata risposta ai segnali esterni, questo fa sì che la cellula si divida in modo incontrollabile con conseguente formazione del tumore benigno/cancro. Sia l'apoptosi intrinseca che estrinseca sono coinvolte nel danno epatico colestatico, nella steatoepatite alcolica e non alcolica, e nelle lesioni epatotossiche più lievi (63).

La famiglia dei *dependence receptors* comprende circa 20 membri, tra cui netrin 1 receptors (DCC e UNC5A-D), neutrophin receptors (NTRK3) e i recettori sonic hedgehog. Se l'attivazione ligando mediata di questi recettori promuove la proliferazione cellulare, la differenziazione e la sopravvivenza, al contrario la deplezione dei loro ligandi fa scattare l'attivazione di CASP9 –

CASP3 o un meccanismo di morte cellulare p53-dipendente. Il recettore UNC5A negli epatociti contrasta la persistenza del virus dell'epatite C (HCV), ma l'infezione stessa ne deregola l'espressione. UNC5A dunque è deficitario nella cirrosi da HCV e nel carcinoma epatocellulare e sembra avere un ruolo nella regolazione della tumorigenesi epatica. Le cellule stellate epatiche esprimono il recettore delle neurotrofine p75, e la sua perdita provoca l'apoptosi di queste cellule, compromettendo la rigenerazione del fegato. La proteina HBx del virus HBV sopprime l'apoptosi indotta da p53 sequestrando questa proteina pro-apoptotica nel citoplasma e inibisce l'apoptosi mediata da Fas, che coinvolge la via apoptotica intrinseca MEKK1-JNK. HBx promuove anche la degradazione autofagica e lisosomiale dei recettori di morte TNFSF10/TRAIL sostenendo la sopravvivenza delle cellule infette da HBV ed eludendo l'immunità antivirale. Infine, HBx stimola la mitofagia mediata da Parkin e sopprime l'apoptosi mitocondriale, un meccanismo che può contribuire all'epatocarcinogenesi indotta dall'HBV (63) (70).

Necroptosi

Nel 2005 è stata identificata una nuova forma di morte cellulare che mostrava caratteristiche della necrosi, ma che sembrava essere strettamente regolata. Il processo di necroptosi è controllato dalle proteine RIPK1 e RIPK3, in un ambiente carente di segnali apoptotici. La via più compresa di attivazione della necroptosi è mediata dal recettore 1 del fattore di necrosi tumorale (TNFR1), sebbene anche il legante che induce l'apoptosi correlato al fattore di necrosi tumorale (TRAIL) e i recettori di Fas possano indurre necroptosi (71).

La necroptosi è il tipo di morte cellulare prevalente nella maggior parte delle malattie epatiche croniche tra cui epatite virale, epatite autoimmune, NASH e ALD (63). Ci sono notevoli regolazioni crosstalk tra apoptosi e necroptosi (64,72). La caspasi-8 attivata inattiva RIPK3, sopprimendo quindi la necroptosi. La necroptosi è inibita anche da c-IAP, inibitori dell'apoptosi, a causa della loro capacità di ubiquitinare RIPK1. Vengono rilasciati alti livelli di DAMP durante la necroptosi rispetto all'apoptosi, attivando l'inflammosoma e i TLR, stimolando

l'infiammazione. L'inflammosoma NLRP viene inibito dalla caspasi-8 mentre RIPK3 lo attiva. L'equilibrio tra questi due tipi di morte cellulare non solo determina l'entità dell'infiammazione, ma sembra anche dettare il tipo di cancro al fegato sviluppato. Un microambiente necroptotico con espressione infiammatoria delle citochine promuove lo sviluppo del colangiocarcinoma intraepatico, mentre un ambiente apoptotico favorisce lo sviluppo di HCC (73). Inoltre, studi in un modello di topi con delezione di Tak1 specifica per il fegato (un modello di danno epatico cronico), hanno dimostrato ruoli opposti della necroptosi mediata da RIPK3 e dell'apoptosi mediata dalla caspasi-8. In questo studio la necroptosi era associata a una bassa proliferazione di epatociti e colangiociti, portando a ridotta epatocarcinogenesi e sviluppo di colestasi. Al contrario, l'apoptosi era associata a un'elevata proliferazione degli epatociti ed epatocarcinogenesi, ma colestasi assente (65).

La morte degli epatociti è testimoniata dall'aumento dei livelli di ALT e AST. Il livello delle transaminasi è il parametro più utilizzato per lo screening e monitoraggio dei pazienti con malattia epatica. Nonostante la maggior parte delle cellule epatiche riposi in fase G0 del ciclo cellulare, il fegato è dotato di una sorprendente capacità di rigenerarsi in risposta alla morte epatocellulare o alla perdita di massa epatica funzionale. Questa capacità rigenerativa non solo riflette le funzioni metaboliche essenziali del fegato, ma è anche direttamente correlata alla sua elevata vulnerabilità agli insulti come tossine alimentari, virus, batteri e parassiti epatotropi. L'ampia gamma di funzioni metaboliche e disintossicanti predispone gli epatociti a lesioni indotte da xenobiotici e tossine. La rigenerazione rapida è un meccanismo efficiente per evitare la perdita delle funzioni epatiche. La maggior parte delle moderne malattie del fegato deriva da processi patologici cronici come l'epatite virale cronica, la steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e la malattia epatica alcolica (ALD). In questi contesti, la risposta epatica alla morte cellulare risulta arrestata ed è promosso lo sviluppo di fibrosi (65).

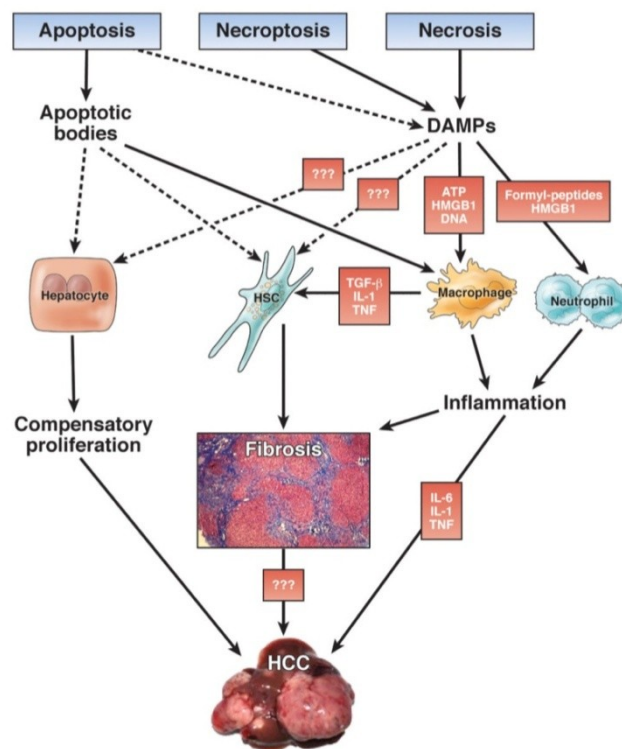


Figura 8: Legame fra morte cellulare ed epatocarcinogenesi. Tratto da (65)

Piroptosi

La piroptosi è un tipo di morte cellulare regolamentata, che si verifica principalmente in risposta a patogeni intracellulari o PAMP, in particolare LPS (63). È stata identificata come una forma alternativa di apoptosi che, sebbene si attivi a seguito di eventi dipendenti dalla caspasi, è pro-infiammatoria (74). Una volta attivata da un agente patogeno, la caspasi 1 trasforma le proforme delle citochine infiammatorie IL-1 β e IL-18 nelle loro forme attive, con conseguente apoptosi della cellula ma rilascio concomitante di citochine infiammatorie nell'ambiente circostante (75). La scissione della procaspasi-1 in caspasi-1 attivata, provoca la formazione di pori della membrana plasmatica. Nella piroptosi, a differenza dell'apoptosi, viene mantenuta l'integrità nucleare sebbene si osservi la condensazione del nucleo (75). Tuttavia, è stata recentemente descritta la via indipendente dalla caspasi-1, innescata dall'attivazione di CASP4/5 (63).

Autofagia

L'autofagia è un meccanismo di morte cellulare che permette di proteggere e uccidere le cellule stressate. Componenti cellulari come macroproteine oppure organelli interi, vengono sequestrati nei lisosomi per essere degradati (76,77). I componenti di questi substrati possono essere riciclati per creare nuove strutture cellulari e/o organelli o in alternativa elaborati ed utilizzati come fonte di energia. Sebbene l'autofagia sia spesso utilizzata per riciclare i componenti cellulari, può causare la distruzione della cellula e per questo è stata collegata alla rimozione delle cellule senescenti dai tessuti invecchiati e alla distruzione delle lesioni neoplastiche. Ad oggi, sono state identificate tre forme distinte di autofagia: macro autofagia, micro autofagia e autofagia selettiva (78). L'autofagia è considerata una via prevalentemente citoprotettiva che protegge dall'ALD, dal danno epatico indotto da TNF, dal danno epatico indotto da paracetamolo, dal danno da ischemia-riperfusion e dall'accumulo di lipidi indotto da una dieta ricca di grassi (65).

Biomarker epatici di morte cellulare

AST e ALT: L'ALT sierica è il biomarcatore più comune e meglio consolidato per la diagnosi ed il monitoraggio della malattia epatica acuta e cronica. Contrariamente all'ALT, l'AST è espresso in una gamma più ampia di tessuti, inclusi il muscolo cardiaco e scheletrico, i reni e il sangue. Quindi, livelli sierici elevati di AST sono meno specifici dei livelli sierici elevati di ALT (65). Numerosi studi clinici hanno mostrato correlazioni tra i biomarcatori della morte delle cellule epatiche come l'ALT, e il rischio di sviluppo del cancro. Ad esempio, i pazienti con infezione da HBV e HCV con livelli di ALT persistenti > 45 U/L hanno rispettivamente un rischio 10 volte e 7 volte maggiore di sviluppare il carcinoma epatocellulare rispetto ai pazienti con epatite e livelli di ALT persistentemente normali (79,80).

K18 è una proteina altamente espressa nelle cellule epiteliali e quando viene rilasciata nello spazio extracellulare, può essere utilizzata come marcatore sierico per la morte delle cellule epiteliali. L'evidenza più forte per K18 come biomarcatore proviene da studi sulla NAFLD, dove ha un'elevata sensibilità e specificità nella diagnosi della NASH tra i pazienti con NAFLD (81). I corpi di Mallory-Denk, un segno distintivo di malattia epatica alcolica, sono in gran parte costituiti da aggregati K8 e K18 ubiquitinati; di conseguenza, i frammenti K18 sono correlati alla presenza di corpi di Mallory-Denk, *hepatocyte ballooning* e fibrosi epatica nei pazienti affetti da malattia epatica alcolica (82).

La **carbamoilfosfato sintetasi-1** è la proteina più abbondante nei mitocondri epatici, ed è più specifica per il fegato dell'ALT. Uno studio recente ha analizzato la carbamoilfosfato sintetasi-1 nel danno epatico acuto innescato da intossicazione da paracetamolo, malattia di Wilson e danno epatico ischemico. A causa della sua emivita molto breve, la carbamoilfosfato sintetasi-1 può predire con maggiore precisione la fine del danno epatico, rispetto all'ALT (83).

1.2.2 Morte cellulare ed epatocarcinoma

L'epatocarcinogenesi è strettamente collegata alla morte cellulare. L'apoptosi promuove lo sviluppo tumorale negli epatociti sani, e questo è stato chiaramente dimostrato in laboratorio con la delezione epatocitaria delle proteine anti apoptotiche Mcl-1 o Bcl-xl, che ha portato allo sviluppo spontaneo di HCC (84,85). Al contrario, la morte cellulare negli epatociti trasformati limita lo sviluppo di HCC. Di conseguenza, le cellule tumorali spesso subiscono un processo di selezione che consente loro di eludere l'apoptosi, grazie alle mutazioni di p53, down regulation di Bax e Bcl-X S 30 e up regulation di proteine antiapoptotiche come Bcl-XL, Mcl-1, survivin e XIAP. Oltre a questi meccanismi, l'infezione da virus epatotropi stessa può portare a una maggiore resistenza all'apoptosi. Le prove da modelli murini suggeriscono fortemente che l'apoptosi è il motore principale dello sviluppo di HCC. È possibile che la fagocitosi dei corpi apoptotici inneschi la proliferazione

compensatoria o la fibrosi, che promuovono l'HCC in modo più efficiente della necrosi, oppure che la necrosi secondaria associata all'apoptosi promuova l'HCC. In alternativa, si potrebbe ipotizzare che gli esecutori apoptotici, comprese le DNAsi, inducano danni collaterali nelle cellule vicine o che alcune cellule sopravvivano all'attacco apoptotico, ma mostrino alterazioni genetiche che portano al cancro (65).

L'epatocarcinogenesi è multifattoriale e il contributo relativo della morte cellulare allo sviluppo dell'HCC dipende dalla malattia sottostante. Ad esempio, l'HCC può svilupparsi in pazienti con infezione da HBV o NAFLD in assenza di danno epatico cronico e/o fibrosi, suggerendo che segnali indipendenti dalla morte cellulare possono essere sufficienti per innescare la cancerogenesi (86). Tuttavia, l'80% degli HCC si sviluppa su fegato cirrotico, che a sua volta si sviluppa nel contesto di morte epatocellulare cronica.

La morte cellulare è un driver fondamentale dell'epatocarcinogenesi. Durante la trasformazione maligna dell'HCC avviene l'evasione della necroptosi; infatti il ripristino dell'espressione di RIPK3 mediante la demetilazione del suo promotore, può sensibilizzare nuovamente le linee cellulari tumorali alla chemioterapia. Questo approccio è un concetto interessante per aumentare la chemiosensibilità dell'HCC, che normalmente non risponde alla chemioterapia convenzionale. Sebbene dunque l'evasione della morte cellulare sia un passaggio fondamentale nel processo di trasformazione maligna, l'induzione della morte cellulare è anche un importante fattore di avvio che alimenta le prime fasi dell'epatocarcinogenesi (72). In modelli murini sperimentali di cancro al fegato, l'eliminazione di un singolo gene di sopravvivenza come Nemo o Tak1 dalle cellule del fegato è stata sufficiente per avviare una sequenza fatale di apoptosi spontanea degli epatociti, attivazione delle cellule immunitarie, proliferazione compensativa degli epatociti, generazione di stress ossidativo e infine sviluppo del cancro (87,88). Questa relazione unica tra morte cellulare e cancro non si riscontra in nessun altro organo e corrisponde al fatto che nei pazienti umani il cancro del fegato si manifesta quasi esclusivamente in un fegato cronicamente danneggiato e

infiammato. Uno studio del 2017 ha identificato un nuovo checkpoint dell'apoptosi controllato dalle molecole RIPK1 e TRAF2 in un modello sperimentale murino, e ha scoperto che la bassa espressione di RIPK1 e TRAF2 in pazienti con carcinoma epatocellulare sottoposti a resezione o trapianto di fegato era predittiva di prognosi sfavorevole, confermando ulteriormente il ruolo fondamentale dell'apoptosi nell'epatocarcinogenesi umana (72). Il ruolo della necroptosi nel contesto dell'epatocarcinogenesi è meno chiaro. Sebbene l'evidenza clinica per una funzione iniziatrice della necroptosi non esista, il suo ruolo è stato studiato in un modello murino di delezione di Tak1 nelle cellule del fegato parenchimali. In questo modello, l'apoptosi promuoveva fortemente risposte di morte cellulare come l'infiammazione, la proliferazione compensativa degli epatociti e la cancerogenesi, mentre l'attivazione della sola necroptosi sopprimeva l'infiammazione, la proliferazione e la cancerogenesi (89).

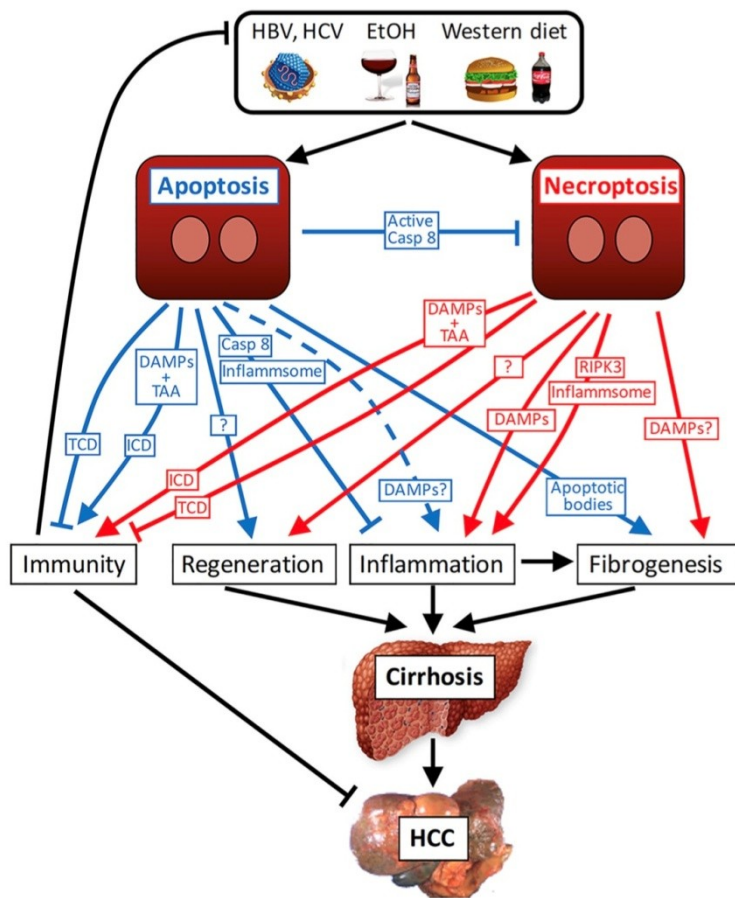


Figura 9: Apoptosi e necroptosi nello sviluppo della cirrosi epatica e dell'HCC.
Tratto da (72)

1.3 FERROPTOSI

1.3.1 Generalità

La ferroptosi deriva dalla parola greca “ptosis” che significa “caduta” e da “ferrum” che significa ferro. È stata descritta per la prima volta nel 2012 ed è definita come un tipo di morte cellulare ferro-dipendente non apoptotica, caratterizzata dall’aumento delle specie reattive dell’ossigeno (ROS) e dalla perossidazione lipidica (93). La ferroptosi può essere farmacologicamente inibita con chelanti del ferro, come la deferrossamina, ed inibitori della perossidazione lipidica come la ferrostatina (63). La ferroptosi è stata inizialmente definita nelle cellule tumorali con mutazione di RAS; l’attivazione di RAS può infatti indurre la ferroptosi aumentando il ferro intracellulare, attraverso l’attivazione del recettore 1 della transferrina (TFR1) e sopprimendo le proteine di deposito del ferro (94).

1.3.2 Morfologia

La ferroptosi è morfologicamente distinguibile da altri tipi di morte cellulare (93). A seguito della ferroptosi, i mitocondri risultano di dimensioni ridotte e condensati con perdita delle creste e rottura della membrana esterna (63). Ci sono inoltre caratteristiche morfologiche e bioenergetiche uniche tra cui mitocondri rimpiccioliti, l’interruzione dell’integrità di membrana, l’aumento della densità della membrana mitocondriale e l’esaurimento del NADH intracellulare (94). Le cellule ferroptotiche non presentano picnosi, frammentazione o dissoluzione nucleare. Queste cellule non mostrano necrosi, restringimento, agglutinazione della cromatina, formazione di corpi apoptotici o disintegrazione del citoscheletro durante la morte cellulare. Piuttosto, sono caratterizzate da rottura della membrana cellulare e formazione di vescicole, atrofia mitocondriale e agglutinazione della cromatina nel nucleo (95).

Morfologia	Biochimica	Immunologia	Triggers
<ul style="list-style-type: none"> • Membrana plasmatica: Nessuna alterazione (rottura o formazione di blebs); • Arrotondamento della cellula; • Mitochondri: rimpicciolimento, aumento di densità delle membrane, riduzione o scomparsa delle creste, rottura della membrana esterna • Nucleo: normali dimensioni e assenza di condensazione della cromatina 	<ul style="list-style-type: none"> • Accumulo di ferro e di ROS • Attivazione della via delle MAP chinasi; • Inibizione del sistema di trasporto X_c^- con riduzione uptake di cisteina • Deplezione GSH; • Aumentata ossidazione NADPH; • Rilascio di intermedi dell'acido arachidonico (es: 11-HETE e 15-HETE) 	<ul style="list-style-type: none"> • Pro-infiammatorio (rilascio di DAMPS) 	<ul style="list-style-type: none"> • Glutammato; • Farmaci (erastina, sulfasalazina, sorafenib)

Tabella IV: caratteristiche principali della ferroptosi. Adattato da (96) (97).

1.3.3 Assi regolatori ed elementi della ferroptosi

La ferroptosi è data dalla somma di molte vie biologiche, che agiscono simultaneamente. I tre assi principali che la regolano sono (93):

1. Via glutatione/glutatione perossidasi 4 (GSH/GPX4), inibizione del sistema X_c^- , via di trasferimento dello zolfo e asse regolatorio p53;
2. Metabolismo del ferro con la regolazione della pathway ATG5/7-NCOA4 e di IREB2 correlata al metabolismo della ferritina, e delle pathways regolatorie p62-Keap1-NRF2.
3. Vie del metabolismo lipidico regolate da p53, arachidonato lipossigenasi 15 (ALOX15), acil-CoA sintetasi membro della famiglia a catena lunga 4 (ACSL4), lisofosfatidilcolina aciltransferasi 3 (LPCAT3).

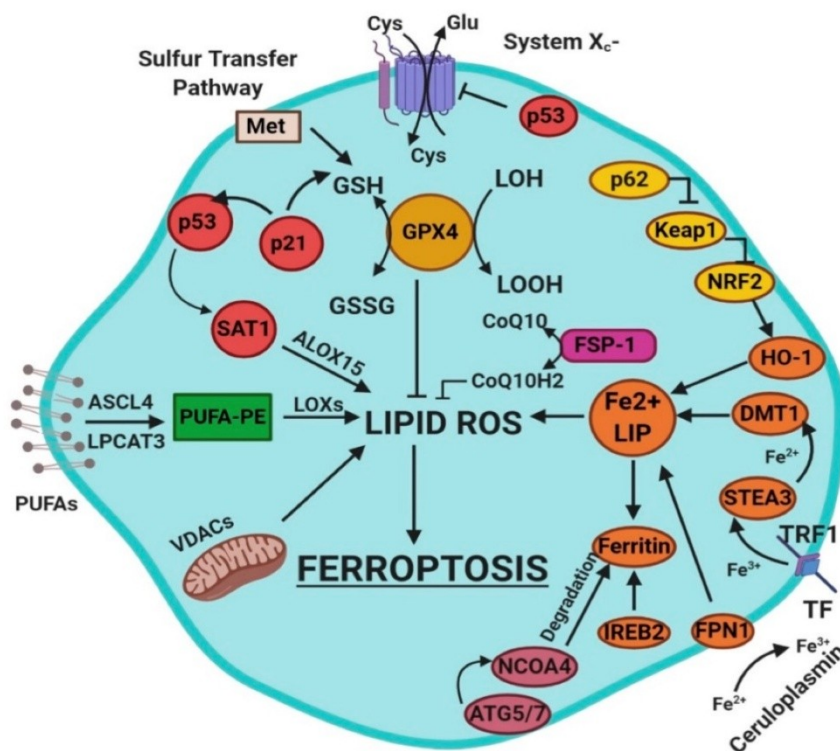


Figura 10: I tre principali assi regolatori della ferroptosi. Tratto da (93)

Elementi principali della ferroptosi: ROS, ferro, metabolismo lipidico

1) ROS: specie reattive dell'ossigeno

In chimica, un radicale è un atomo, una molecola o uno ione con un elettrone di valenza altamente reattivo e spaiato. Un radicale subisce spontaneamente reazioni di dimerizzazione. Durante il processo ferroptotico vengono generati diversi tipi di ROS, che possono essere suddivisi in quattro gruppi principali: superossido, perossido di idrogeno, radicale perossile (che è il ROS più reattivo) e perossidi lipidici, ottenuti dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) (93). Durante la ferroptosi la reazione di Fenton è la fonte primaria di ROS. La reazione di Fenton descrive la formazione di radicali idrossido e idrossile mediante la reazione tra Fe^{2+} e perossido di idrogeno (H_2O_2). Nel 1934 Haber e Weiss proposero una versione modificata della reazione di Fenton, con una reazione a due stadi in cui Fe^{3+} viene ridotto a

Fe²⁺ tramite la reazione con il superossido, che a sua volta reagisce con H₂O₂ per formare OH⁻ e OH•, rigenerando lo ione ferrico (93).

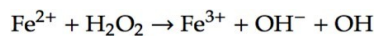
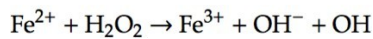
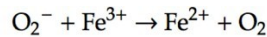


Figura 11: Reazione di Fenton e di Haber-Weiss Tratto da (78).

2) Metabolismo lipidico e ferroptosi

Il danno ossidativo dei lipidi di membrana è un elemento fondamentale per l'esecuzione della ferroptosi. La perossidazione può avvenire sia sui PUFAs liberi che sui fosfolipidi di membrana contenenti PUFAs (acidi grassi polinsaturi) (93). In particolare l'acido arachidonico e l'acido adrenico sono i più suscettibili alla perossidazione, che può causare la distruzione del doppio strato fosfolipidico e influenzare le funzioni della membrana (98). L'acil-coA sintetasi ACSL4, la lisofosfatidilcolina aciltransferasi 3 LPCAT3 e l'arachidonato 15-lipossigenasi ALOX15 sono noti come importanti enzimi nel metabolismo lipidico, in grado di regolare la ferroptosi (99), la biosintesi ed il rimodellamento dei PUFA nelle membrane cellulari. ACSL4 e LPCAT3 promuovono l'incorporazione dei PUFAs nei fosfolipidi per formare PUFA-PL (fosfolipidi contenenti acidi grassi polinsaturi), che sono vulnerabili all'ossidazione *free-radical initiated* mediata dalle lipossigenasi (ALOX) (98).

3) Metabolismo del ferro e ferroptosi

Il fabbisogno giornaliero di ferro del corpo umano è di circa 20-25 mg, e viene utilizzato principalmente per l'eritropoiesi. Una dieta equilibrata fornisce circa 14 mg di ferro e in un adulto standard, vengono assorbiti 1-2 mg di ferro giornalmente nell'intestino. Poiché viene assorbita una quantità insufficiente di ferro, la maggior parte viene riciclata dalla fagocitosi dei globuli rossi senescenti da parte dei macrofagi. Nel nostro corpo, il ferro si trova sia in forma ferrosa (Fe²⁺) che ferrica (Fe³⁺). L'eccesso di ferro cellulare promuove

la perossidazione lipidica attraverso la reazione di Fenton e la produzione di ROS, che quindi innesca la ferroptosi. Diversi studi hanno dimostrato la connessione tra i geni del metabolismo del ferro e una maggiore sensibilità alla ferroptosi. Il silenziamento del TRFC, il gene che codifica per TFR1, può inibire la ferroptosi indotta dall'erastina, prevenendo l'accumulo di ferro, mentre HO-1 accelera il processo ferroptotico integrando il ferro (93). TFR-1 è la proteina principale nel processo di assorbimento del ferro e il suo livello di espressione aumenta nelle cellule tumorali con mutazione RAS, mentre la ferritina diminuisce, aumentando a sua volta il livello di ferro libero nelle cellule (99). Quando la transferrina si lega al ferro, può essere riconosciuta dal TFR1. Una volta che il complesso ferro-transferrina si lega con il TFR1, il ferro viene ridotto a ferro ferroso. Quindi, con la mediazione del trasportatore di metallo bivalente 1, il ferro ferroso può entrare nelle cellule. La maggior parte del ferro può essere immagazzinata in ferritina o eme che possono reagire con l'eme ossigenasi-1 (HO-1) per rilasciare ferro. Poiché la maggior parte delle cellule non dispone di meccanismi efficaci per esportare il ferro, quando la quantità di ferro supera la capacità di stoccaggio, il livello di LIP (*labile iron pool*) aumenta. Il ferro ferroso nella matrice può partecipare alla reazione di Fenton e alla perossidazione lipidica con perossido d'idrogeno (H₂O₂), idroperossido di fosfolipidi di diverse classi (PLOOH), idroperossido di colesterolo (ChOOH), idroperossido di estere di colesterolo (CEOOH), idroperossido lipidico (LOOH) e piccoli idroperossidi sintetici (ROOH) per produrre le specie reattive dell'ossigeno (ROS) (99).

TFR-1 e HCC

È stato ben evidenziato che i pazienti con sovraccarico di ferro sono a maggior rischio di sviluppare il carcinoma epatocellulare. Gli epatociti neoplastici hanno la capacità di evitare l'accumulo di ferro in eccesso nel citoplasma ai fini della sopravvivenza cellulare. In uno studio (135) è stato dimostrato che il TFR-1 è significativamente sovraespresso nelle cellule tumorali di HCC. Inoltre, la sovra espressione di TFR-1 era associata ad un livello di AFP più elevato, OS e DFS più breve, ed è risultata un indicatore prognostico negativo per i

proteine e alla membrana, con conseguente morte cellulare (94). Il sistema X_c^- consiste di due subunità: SLC7A11 ed SLC3A2.

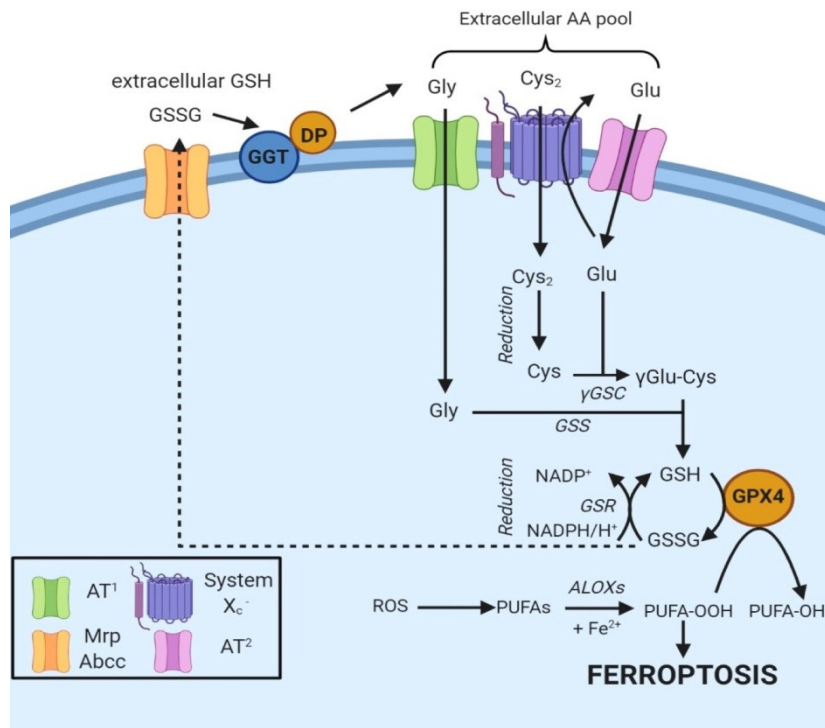


Figura 13: Uptake della cisteina e sintesi del GSH. Tratto da (93)

2) Inattivazione di GPX4: GPX4 è un bersaglio diretto di RSL3. Per garantire l'integrità della membrana e ridurre al minimo i danni causati dai ROS, la GPX4 converte gli idroperossidi lipidici (R-OOH) in alcoli lipidici (R-OH) utilizzando GSH ridotto come cofattore. L'inibizione di GPX4 con RSL3 (per esempio) innesca il processo ferroptotico mediante l'accumulo di perossidi lipidici (93). Il GSH è il cofattore di GPX4 per la catalizzazione dei perossidi lipidici in alcoli; il suo esaurimento inattiva direttamente GPX4 ed innesca la ferroptosi (94).

3) VDACS (canali voltaggio dipendenti) mitocondriali: questi canali attivati inibiscono la permeabilità di membrana ai substrati endogeni come il NADH, di conseguenza diminuisce l'ossidazione del NADH nelle cellule tumorali. Questo induce la disfunzione mitocondriale ed il rilascio di specie ossidative (94).

4) Glutamminolisi: La glutammina viene degradata attraverso la glutamminolisi ed il ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA). I metaboliti della glutamminolisi (αKG e metaboliti a valle) e alcuni suoi enzimi, sono necessari per l'induzione della ferroptosi. La transaminasi converte il glutammato in αKG, ed è stato scoperto che l'inibitore della transaminasi inibisce la ferroptosi. La glutammato deidrogenasi (GLUD1) converte il glutammato in αKG attraverso la deaminazione, tuttavia il knockdown di GLUD1 non ha dimostrato l'inibizione dell'inizio della ferroptosi. Le glutaminasi GLS1 e GLS2 catalizzano la conversione della glutammina in glutammato. Gli studi hanno dimostrato che solo GLS2 è coinvolta nella regolazione della ferroptosi, ed è un'obiettivo trascrizionale di p53. Nella maggior parte delle cellule tumorali è stata osservata un'elevata glutamminolisi, per soddisfare i loro requisiti energetici. Tuttavia, l'alto tasso di glutamminolisi ha aumentato la vulnerabilità delle cellule tumorali alla ferroptosi (94).

5) Acidi grassi polinsaturi (PUFAs): gli acidi grassi polinsaturi aumentano la fluidità della membrana. Tuttavia, i PUFAs possono essere ossidati dai ROS intracellulari, e come conseguenza vengono prodotti i perossidi lipidici che promuovono l'induzione della ferroptosi (94).

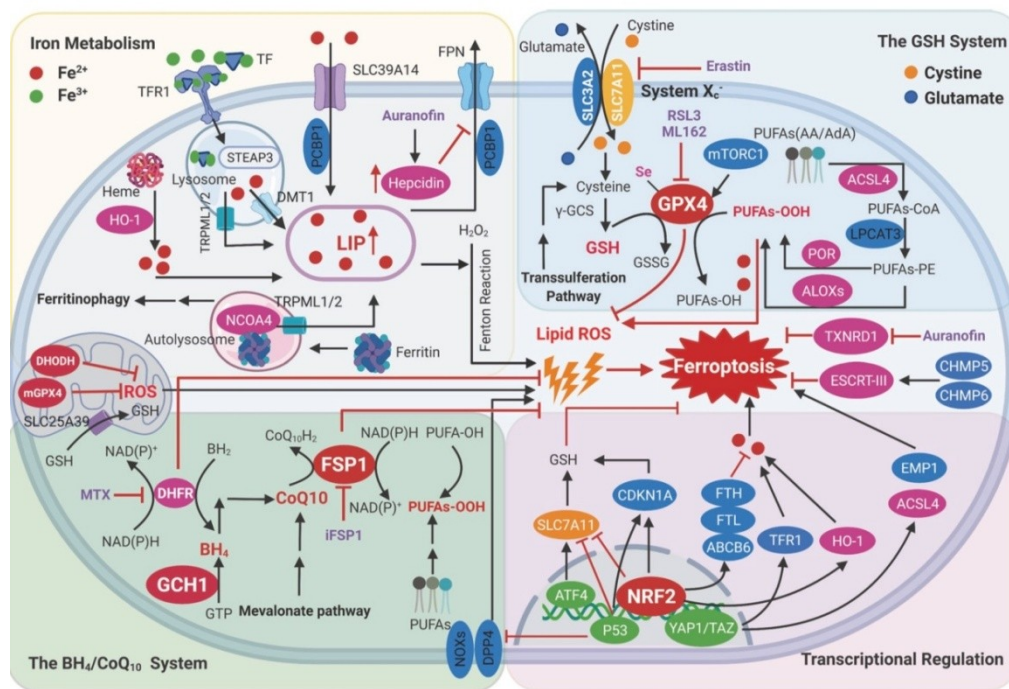


Figura 14: Vie molecolari della ferroptosi. Tratto da (100)

Molecole coinvolte nella ferroptosi

Molte vie sono coinvolte nella regolazione della ferroptosi, e sono associate anche alla progressione della crescita tumorale. Per questo, vengono considerate target potenziali per la terapia tumorale (94).

1) Nrf2: è un fattore di trascrizione che regola i geni del metabolismo del ferro in risposta allo stress ossidativo ed elettrofilo, promuove lo storage del ferro, ne riduce l'assorbimento e limita la produzione di ROS. Pertanto Nrf2 regola negativamente la ferroptosi e favorisce la tumorigenesi. Nelle linee cellulari di HCC, p62 si lega con Keap1 e interrompe l'interazione Keap1-Nrf2 dopo l'esposizione a fattori che inducono la ferroptosi (93). Nel 2016, Sun et al. hanno dimostrato che la via p62-Keap1-Nrf2 inibisce la ferroptosi nel carcinoma epatocellulare (HCC) (101). SLC7A11, un componente chiave del sistema X_c, è un target di Nrf2 e viene upregolato quando Nrf2 è attivato. ARF è un gene oncosoppressore che attiva p53 nelle cellule tumorali. Tuttavia, ARF può direttamente inibire il ruolo trascrizionale di Nrf2 e sopprimere i suoi

geni target, inclusi SLC7A11, in maniera indipendente da p53. La perdita di ARF quindi, attivando Nrf2, promuove la progressione del tumore (94).

2) P53 è un gene oncosoppressore coinvolto nella ferroptosi come repressore trascrizionale di SLC7A11, compromettendo quindi l'importazione di cisteina e promuovendo l'inizio della ferroptosi. Tuttavia, ci sono anche prove che dimostrano che p53 potrebbe inibire la ferroptosi attraverso l'inibizione dell'attività di DPP4 o mediante l'attivazione trascrizionale di CDKN1A/p21 (94). In che modo p53 può sia promuovere che sopprimere la ferroptosi? La prima spiegazione sta nei diversi tipi cellulari usati negli studi, che hanno strutture genomiche, profili di espressione genica e vie di segnalazione distinte, che insieme determinano il comportamento cellulare dopo l'induzione di p53. Inoltre, l'effetto di p53 è fortemente dipendente dal contesto, spiegando così potenzialmente perché p53 promuove l'espressione di SLC7A11 nelle VSMC (vascular smooth muscles cells) ma lo sopprime nella maggior parte delle altre cellule. P21 è regolato in maniera diversa tra i tipi cellulari e può essere il meccanismo alla base delle differenze di sensibilità di queste cellule alla ferroptosi. La seconda spiegazione sta nella dualità delle funzioni di p53, ad esempio può sia promuovere che inibire l'autofagia. La terza possibile spiegazione sono i diversi interventi utilizzati per indurre la ferroptosi negli esperimenti. Nella maggior parte degli studi, i ricercatori hanno utilizzato piccole molecole come erastin e RSL3 per innescare la ferroptosi, ma è stato riportato che p53 svolge ruoli essenziali in alcuni percorsi di ferroptosi non canonici in cui i FIN (ferroptosis inducers) classici hanno solo effetti minimi. L'utilizzo dei FIN classici potrebbe non essere appropriato e potrebbe causare risultati fuorvianti (102).

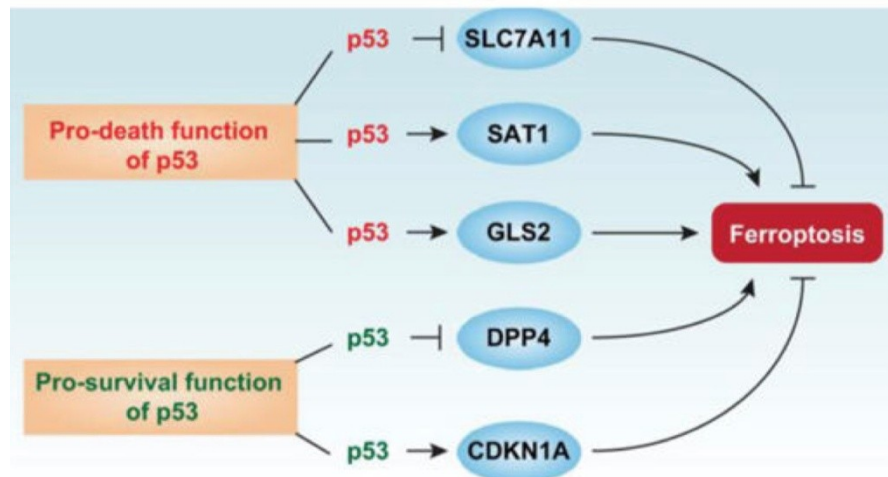


Figura 15: Ruolo duale di p53 nella ferroptosi. Tratto da (103)

3) Eme ossigenasi-1: una maggiore attività di HO1 aumenta i livelli di ferro intracellulare, e può quindi innescare la cascata ferroptotica (94).

4) FANCD2 (Fanconi anemia group D2 protein): FANCD2 è una proteina nucleare coinvolta nei meccanismi di riparazione del DNA e protegge le cellule dalla ferroptosi. Si è visto che nelle cellule trattate con erastina un aumento dei livelli di FANCD2; la molecola inoltre può regolare l'espressione di diversi geni correlati con la ferroptosi, come GPX4 o regolatori del metabolismo ferrico (94).

5) BECN1: è un regolatore chiave della macroautofagia, ma recenti scoperte hanno rivelato un suo nuovo ruolo nell'indurre la ferroptosi. L'interazione fra BECN1 ed SLC7A11 inibisce l'attività del sistema Xc^- , e quindi attiva la ferroptosi (94).

6) NUPR1 è un fattore di trascrizione inducibile dallo stress, driver della resistenza alla ferroptosi. L'espressione di LCN2 mediata da NUPR1 blocca la morte delle cellule ferroptotiche attraverso la diminuzione dell'accumulo di ferro. Il blocco farmacologico o genetico della via NUPR1-LCN2, infatti, aumenta l'attività d'induzione della ferroptosi da parte di erastin. (104)

7) La ferrostatina-1 ha un'attività anti-ferroptotica. In particolare, la ferrostatina-1 agisce in modo para-catalitico non venendo consumata mentre inibisce la perossidazione lipidica ferro-dipendente. La ferrostatina-1, in presenza di ferro ridotto, elimina gli idroperossidi lipidici (105).

8) L'espressione di **enolase 3 (ENO3)** è up regolata nei pazienti con steatosi epatica non alcolica NAFLD, tuttavia il meccanismo rimane poco chiaro. Nei modelli murini di NASH l'espressione di ENO3 e di GPX4 erano significativamente elevate, mentre la ferroptosi era inibita. In uno studio (106) è stato dimostrato che ENO3 promuove la progressione della NASH regolando negativamente la ferroptosi, grazie all'aumentata espressione di GPX4 e all'accumulo lipidico. ENO3 potrebbe quindi essere un potenziale target terapeutico per contrastare lo sviluppo di NASH.

Induttori della ferroptosi

La prima categoria d'induttori comprende Erastina, Sulfasalazina e Sorafenib: queste molecole agiscono inibendo il sistema Xc^- . La seconda categoria comprende RSL3, RSL5 (Ras-selective lethal small molecules) e ML162 (100), che agiscono tramite inibizione diretta di GPX4. La terza categoria include FIN56 che agisce in primo luogo degradando il GPX4, ed inoltre si lega e supporta l'attivazione dell'enzima squalene sintetasi, che porta alla deplezione dell'antiossidante endogeno Q10, essenziale per prevenire l'accumulo di perossidi lipidici. L'ultima categoria comprende FINO2, che induce la ferroptosi tramite ossidazione diretta del LIP (*labile iron pool*) e inattivazione di GPX4 (107).

Classe	Meccanismo d'azione	Impatto Ferro ptosi	Esempi
Classe 1	Inibizione del sistema Xc ⁻	Prevenzione dell'antiporto di cisteina; deplezione del GSH; riduzione attività GPX4	Erastina, sulfasalazina, sorafenib
Classe 2	Inibizione diretta di GPX4	Interazione covalente con GPX4 e inibizione dell'enzima	RSL3, RSL5
Classe 3	Deplezione di GPX4 e del CoQ10	Deplezione di GPX4 e CoQ10	FIN56
Classe 4a	Overload di ferro	Aumento della concentrazione di ferro e aumento dei ROS	Emoglobina, FeCl ₂ , emina, salinomicina, deprivazione aminoacidica, deprivazione cistina + olo- transferrina
Classe 4b	Induzione della perossidazione lipidica	L'ossidazione del ferro porta alla perossidazione lipidica e inattivazione indiretta di GPX4	FINO2

Tabella V: Principali induttori della ferroptosi. Tratto da (93).

Inibitori della ferroptosi

Gli inibitori della ferroptosi possono essere suddivisi in due gruppi principali: inibitori dell'autossidazione lipidica e inibitori della lipossigenasi. Nel gruppo degli inibitori della lipossigenasi rientrano l' α -tocoferolo, la vitamina E, le ferrostatine e le lipoxstatine. Tra quest'ultime, i due inibitori più potenti sono la ferrostatina-1 (Fer-1) e la lipoxstatina-1 (Lip-1) (93). La ferroptosi può essere inibita utilizzando altri tre approcci principali: chelazione del ferro, prevenzione della perossidazione lipidica e scavenging dei perossidi lipidici. I chelanti del ferro come la Deferoxamina (DFO), il Deferiprone e il Ciclopirox chelano il ferro e prevengono la propagazione della perossidazione lipidica, limitando la reazione di Fenton. Ad oggi, una piccola parte dei chelanti del

ferro sono stati approvati dalla FDA o sono stati sottoposti a studi clinici per il trattamento di malattie legate al sovraccarico di ferro, trapianti, lesioni d'organo e per la terapia dell'HCC (100).

1.3.5 Ferroptosi e immunogenicità

Diversi mediatori vengono rilasciati durante i processi di morte cellulare, e permettono l'attivazione del sistema immunitario. Le cellule più coinvolte sono i linfociti T CD8+. Gli elementi che derivano dalle cellule andate incontro a morte vengono fagocitati dalle antigen presenting cells (APC), e gli antigeni presentati sul complesso MHC-1 (complesso maggiore di istocompatibilità di tipo 1). Il microambiente tumorale possiede un elevato potenziale immunogenico a causa dell'elevato tasso di mutazioni presente nelle cellule tumorali: la presentazione di neo-antigeni determina un'attivazione estesa del sistema immunitario, il quale cerca di combattere la neoplasia. Uno degli *hallmarks* del cancro è proprio la capacità di evadere questo sistema di riconoscimento (108). Nel 1994, però, nacque una teoria secondo la quale il sistema immunitario adattativo rispondeva principalmente al danno tissutale, più che alle molecole riconosciute come non self ("danger model" vs "self versus non-self recognition model") (109). Le molecole endogene rilasciate in seguito alla morte cellulare, vengono definite DAMPS e possiedono un'elevata capacità di attivazione del sistema immunitario. La NCDD definisce come ICD (*immunogenic cell death*) "una forma di RCD che è in grado di attivare una risposta immunitaria adattativa in un ospite immunocompetente" (64). La ferroptosi collabora in diverse funzioni del sistema immunitario, tra le quali la fagocitosi, la migrazione e la presentazione antigenica da parte delle cellule APC. Recentemente è stato dimostrato che le cellule tumorali andate incontro a ferroptosi, sono in grado di rilasciare numerose quantità di DAMPS. L'induzione di questa RCD nella cellula tumorale, rappresenta quindi una strategia finalizzata all'attivazione del sistema immunitario adattivo ed innato nei confronti della neoplasia, al fine di una sua più efficace eliminazione (110). Uno studio su Nature nel 2019 (111) ha dimostrato che i linfociti CD8+ attivati dall'immunoterapia promuovono la perossidazione dei lipidi e

sensibilizzano la cellula tumorale alla ferroptosi. Nello specifico, l'INF γ tramite la via di JAK-STAT, inibisce l'espressione delle subunità SLC3A2 e SLC7A11 del trasportatore Xc⁻. Lo stesso studio spiega anche la correlazione tra ferroptosi e immunità tumorale mediata dalle cellule T, in particolar modo in un ambiente tumorale povero di cisteina. Perciò, targettare il metabolismo tumorale associato alla ferroptosi potrebbe migliorare l'efficacia dell'immunoterapia contro il cancro.

1.4 RUOLO DELLA FERROPTOSI NELLE PATOLOGIE EPATICHE

1.4.1 Ferroptosi e fibrosi epatica

La fibrosi epatica manca ancora di un trattamento efficace, e la scoperta della ferroptosi fornisce una nuova visione per affrontare questo problema. La fibrosi epatica è caratterizzata da un eccessivo accumulo di proteina della matrice extracellulare (ECM), principalmente collagene fibrillare-I, in risposta ad un danno epatico persistente. La cirrosi rappresenta lo stadio terminale della fibrosi epatica, ed il maggior driver della fibrogenesi è l'attivazione delle cellule stellate epatiche (HSC). La regressione della fibrosi epatica è accompagnata da una riduzione o perdita di HSC attivate, il che suggerisce che la disattivazione o la riduzione delle HSC potrebbe essere una strategia antifibrotica indipendentemente dalla causa del danno epatico. L'unico trattamento clinico efficace è il trapianto di fegato per i pazienti che sono progrediti verso la cirrosi (107). Pertanto, è urgente trovare nuove terapie antifibrotiche, e l'inibizione dell'attivazione delle HSC è una strategia efficace per trattare e prevenire la fibrosi epatica. In uno studio è stato studiato il trattamento con isoglicirrinato di magnesio (MgIG), che ha notevolmente ridotto la formazione di cicatrici fibrotiche e attenuato il danno epatico nel modello di ratto con fibrosi epatica. L'eme ossigenasi-1 è a monte della ferroptosi indotta da MgIG nelle HSC, e il knockdown di HO-1 ha bloccato la ferroptosi nelle cellule HSC e, a sua volta, ha esacerbato la fibrosi epatica (112).

Il ferro è abbondante nelle HSC, il che rappresenta un pre-requisito per la morte cellulare ferroptotica. Sembra che la ferroptosi funzioni come un'arma a doppio taglio nell'insorgenza e nello sviluppo della fibrosi epatica. È stato riscontrato che l'eccessiva deposizione di ferro epatico e la ferroptosi potenziano la fibrosi epatica. Tuttavia, è stato riferito anche che la ferroptosi può essere considerata una nuova strategia per eliminare le HSC e migliorare la fibrosi epatica. La relazione tra ferroptosi e fibrogenesi epatica è ancora sconosciuta, tuttavia la sua scoperta ha aperto una nuova piattaforma nel campo della fibrosi epatica (107). In un altro studio è stato analizzato l'effetto dell'Artesunato sulla fibrosi epatica di topo indotta dal tetracloruro di carbonio. I risultati hanno dimostrato che il trattamento con Artesunato potrebbe indurre la ferroptosi nelle HSC attivate dei fegati con fibrosi. L'Artesunato ha anche attivato la ferritinofagia, e questi risultati hanno suggerito che la ferroptosi nelle HSC mediata dalla ferritinofagia fosse responsabile dell'efficacia anti-fibrotica dell'Artesunato (113).

In un altro studio sono stati studiati i meccanismi molecolari alla base dell'effetto della Berberina contro la fibrogenesi epatica. Nei topi è stata indotta la fibrosi epatica attraverso tioacetamide e tetracloruro di carbonio, e successivamente sono stati trattati con la Berberina per via intragastrica. I risultati hanno mostrato che la Berberina ha alleviato la fibrosi epatica del topo e ripristinato la sua funzionalità, tuttavia questi effetti farmacologici contro la fibrosi sono stati significativamente ridotti dal trattamento con la ferrostatina-1. La Berberina ha aumentato la produzione di ROS nelle HSC innescando in queste cellule la ferroptosi, e ha attenuato la fibrosi epatica (114). Infine, è stato scoperto che l'RNA binding protein ZFP36/TTP svolge un ruolo cruciale nella regolazione della ferroptosi nelle cellule stellate epatiche HSC. ZPF36 protegge le cellule contro la ferroptosi, regolando il signaling di autofagia nelle HSC. Sorafenib porta alla down regulation di ZPF36, attiva la ferritinofagia e induce la ferroptosi nelle HSC umane. La ferroptosi ZPF36-autofagia dipendente è un potenziale target per il trattamento della fibrosi epatica (115).

1.4.2 Ruolo della ferroptosi nelle neoplasie

La ferroptosi svolge un ruolo fondamentale nella depressione della tumorigenesi. Con la mutazione di p53, la cellula tumorale perde l'abilità di indurre senescenza, apoptosi e arresto del ciclo cellulare, ma può ancora mantenere la capacità di inibire la tumorigenesi grazie all'induzione della ferroptosi (96).

Vie correlate al cancro nella ferroptosi

1) RAS

Gli oncogeni della famiglia RAS (HRAS, NRAS e KRAS) sono i più comunemente mutati nei tumori dell'uomo (116). Gli induttori della ferroptosi come l'Erastina ed RSL3 hanno mostrato letalità selettiva contro le cellule tumorali RAS-mutanti. L'inibizione genetica o farmacologica di RAS o delle sue molecole di segnalazione a valle (BRAF, MEK e ERK) inverte l'attività antitumorale di Erastina e RSL3, probabilmente perché la segnalazione di RAS mutante arricchisce il pool di ferro cellulare, regolando l'espressione di geni correlati al metabolismo del ferro come TRFC, FTH1 e FTL. Le cellule di adenocarcinoma polmonare con mutazione di KRAS sono suscettibili alla ferroptosi indotta dall'inibizione di SLC7A11. Questi risultati preclinici supportano l'idea che l'induzione della ferroptosi potrebbe costituire una strategia adeguata contro i tumori portatori dell'oncogene RAS (98).

2) TP53

P53 regola attivamente l'espressione di BBC3 (noto anche come PUMA) e BAX per indurre l'apoptosi. Al contrario, la soppressione trascrizionale mediata da p53 di SLC7A11 promuove la ferroptosi nelle cellule tumorali (98). P53 ha la capacità di limitare la ferroptosi legando direttamente la dipeptidil peptidasi DPP4 per inibire la perossidazione lipidica mediata da NOX, o inducendo l'espressione di CDKN1A. Gli inibitori della DPP4 (come vildagliptin, alogliptin e linagliptin) sono usati per ridurre i livelli di zucchero nel sangue nei pazienti

con diabete di tipo 2, e potrebbero limitare ed interferire con l'attività antitumorale degli attivatori della ferroptosi (117).

3) NFE2L2

NFE2L2 è un regolatore principale della segnalazione dello stress ossidativo e ha un duplice ruolo nella progressione del tumore: un'attività carente di NFE2L2 può contribuire alla tumorigenesi precoce, mentre un'attività costitutiva elevata può innescare la progressione del tumore e la resistenza alla terapia. Studi preclinici indicano che la via di segnalazione di NFE2L2 è un importante meccanismo di difesa contro la ferroptosi, ed è coinvolta nella resistenza al Sorafenib delle cellule HCC. Il potenziale terapeutico degli inibitori di NFE2L2 come Brusatol, Trigonellina per migliorare la terapia pro-ferroptotica, dovranno essere ulteriormente approfonditi negli studi preclinici e clinici (98).

4) HIF

Negli studi preclinici, l'HIF sembra avere un duplice ruolo nella modulazione della ferroptosi nelle cellule tumorali. I chelanti del ferro antiferroptotici, possono migliorare la stabilità dell'HIF inibendo l'attività delle proteine EGLN (98).

5) EMT

La transizione epiteliale-mesenchimale EMT è il processo mediante il quale le cellule epiteliali perdono la polarità e le proprietà di adesione intercellulare associate al fenotipo epiteliale e acquisiscono progressivamente capacità migratorie e invasive del fenotipo mesenchimale (118). Oltre a limitare gli effetti di molti trattamenti anti tumorali, il segnale EMT può anche promuovere la ferroptosi. La proteina LYRIC (anche conosciuta come metadherin) è un regolatore positivo dell'EMT, e promuove la ferroptosi inibendo l'espressione di GPX4 e di SLC3A2. Le cellule in uno stato mesenchimale sono vulnerabili alla ferroptosi a causa della perdita dei contatti cellula-cellula e dell'attivazione di fattori coinvolti nella transizione

EMT, come *ZEB1*, *SNAI1* e *TWIST1* (figura 15). Collettivamente, i risultati sottolineano la possibilità teorica di eliminare specificamente le cellule tumorali con un fenotipo simile al mesenchimale, utilizzando farmaci che inducono la ferroptosi (98).

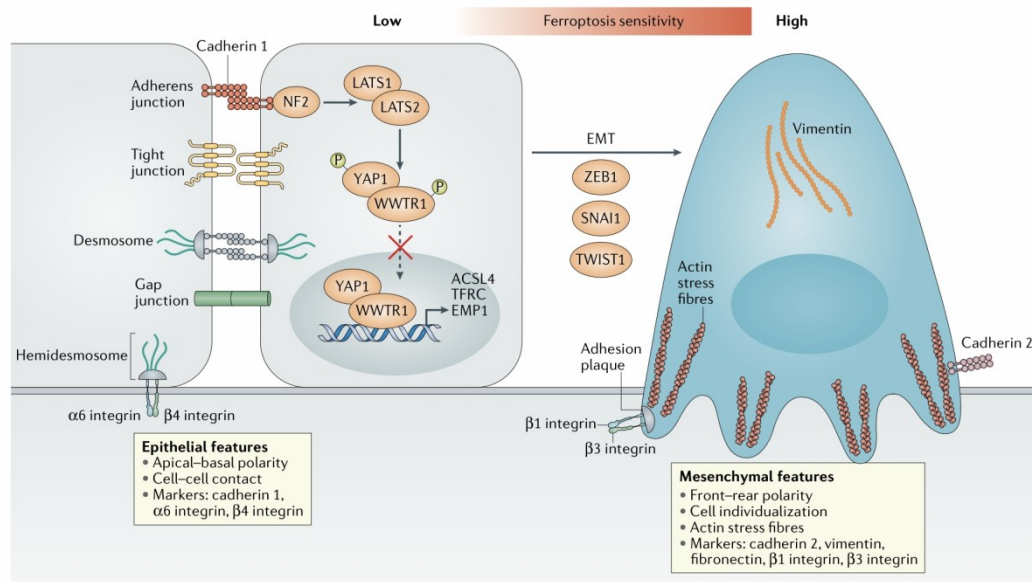


Figura 15: Ruolo dell'EMT nella ferroptosi. Tratto da (98)

1.4.3 Ruolo della ferroptosi nel colangiocarcinoma

Nel biennio 2019/2020 l'anatomia patologica dell'AULSS2 di Treviso e dell'azienda ospedaliera di Padova hanno studiato la ferroptosi e la necroptosi nel colangiocarcinoma intra-epatico (i-CCA) (119). I risultati dimostrarono che nell'i-CCA la ferroptosi risulta essere inibita, mentre la necroptosi risultò presente e attivata. L'espressione dei marcatori di necroptosi (RIPK3, RIPK1, MLKL) si dimostrò inoltre inversamente correlata alla presenza di fattori prognostici negativi tumorali e direttamente correlata con un aumento dell'overall survival. Successivamente, lo stesso gruppo di ricerca nel biennio 2020/2021 ha indagato l'espressione di STAT3 negli e-CCA, e ha studiato per la prima volta il ruolo della ferroptosi nell' e-CCA, analizzando grazie all'immunoistochimica l'espressione dei suoi principali mediatori/regolatori. Lo studio ha dimostrato che la ferroptosi non è attivata nell'e-CCA, ma a

differenza del i-CCA, non è nemmeno inibita dal momento che l'espressione di GPX4 nella maggior parte dei pazienti è risultata assente. Questo dato è interessante perché suggerisce che la cascata ferroptotica non sia inibita costitutivamente nell'e-CCA, e che quindi potrebbe venire indotta con molecole e farmaci che attivino la cascata ferroptotica. Inoltre, lo studio ha dimostrato che in queste cellule tumorali ci sono bassi livelli di ferro e di espressione della transferrina, quindi potrebbe risultare utile utilizzare farmaci che aumentino il livello di ferro intra-cellulare, così da indurre la ferroptosi nelle cellule tumorali.

1.4.4 Ruolo della ferroptosi nell'HCC e vie molecolari coinvolte

L'alterata regolazione del metabolismo del ferro gioca un ruolo centrale nella patogenesi dell'HCC, in particolare nei pazienti che presentano NASH, emocromatosi o talassemia (120). Un'elevata assunzione di ferro nella dieta può aumentare il rischio di HCC, suggerendo che un alto contenuto di ferro può promuoverne lo sviluppo (121). Inoltre, un numero crescente di prove supporta l'idea che l'attivazione della ferroptosi possa inibire efficacemente la crescita delle cellule dell'HCC, fornendo così un razionale scientifico nell'indurre la ferroptosi come una nuova strategia terapeutica per l'HCC (100).

Il meccanismo alla base della regolazione della ferroptosi nell'epatocarcinoma rimane poco chiaro. Sono state identificate due categorie di geni: FUF (fattore di ferroptosi *up-regulated*) ed FDF (fattore di ferroptosi *down regulated*), che stimolano e sopprimono la ferroptosi influenzando la sintesi del GSH. I FUF sono controllati dal fattore di trascrizione HIC1, mentre gli FDF dal HNF4A. Clinicamente, HIC1 e HNF4A sono correlati allo stadio dell'epatocarcinoma. I pazienti con HIC1 inferiore e HNF4A più alto hanno una prognosi peggiore, quindi stimolare HIC1 inibendo contemporaneamente HNF4A potrebbe essere utile per il trattamento del cancro al fegato. Il fattore di trascrizione HNF4A è stato identificato come soppressore della ferroptosi, mentre HIC1 come suo stimolante nell'epatocarcinoma. HNF4A è fondamentale per lo sviluppo del

fegato ed è up-regulated nel cancro del fegato. Inoltre, stimola la risposta proliferativa mediata dall'EGFR durante lo sviluppo del tumore. HIC1 al contrario agisce come un oncosoppressore che inibisce la crescita cellulare, la migrazione e la sopravvivenza. Nonostante sia emersa la funzione di questi due fattori di trascrizione, i loro geni bersaglio nelle cellule di HCC rimangono in gran parte sconosciuti. A livello basale, la trascrizione anti-ferroptosi mediata da HNF4 è più forte di quella della trascrizione pro-ferroptosi mediata da HIC1. Rompere l'equilibrio tra HIC1 ed HNF4A potrebbe essere utile per indurre la ferroptosi nel trattamento del cancro del fegato. STMN1 è un FDF e HBA1 un FUF. STMN1 è una fosfoproteina che destabilizza i microtubuli, la sua sovra espressione è osservata in vari tumori ed è associata a prognosi sfavorevole. STMN1 è stato caratterizzato come uno stimolatore di metastasi critico nel carcinoma epatocellulare. Sebbene il legame tra STMN1 e ferroptosi non sia stato ancora determinato, studi precedenti hanno riportato che lo stress ossidativo è in grado di aumentare l'HBA1, indicando che questo è coinvolto nella ferroptosi. I collegamenti tra HNF4A e STMN1 e tra HIC1 e HBA1 sono di fondamentale importanza per la ferroptosi. Questi due assi regolano in modo opposto la produzione di GSH tramite PSAT1, enzima chiave nella sintesi di GSH, ipotizzando che esso possa essere modificato post-traduzione (122).

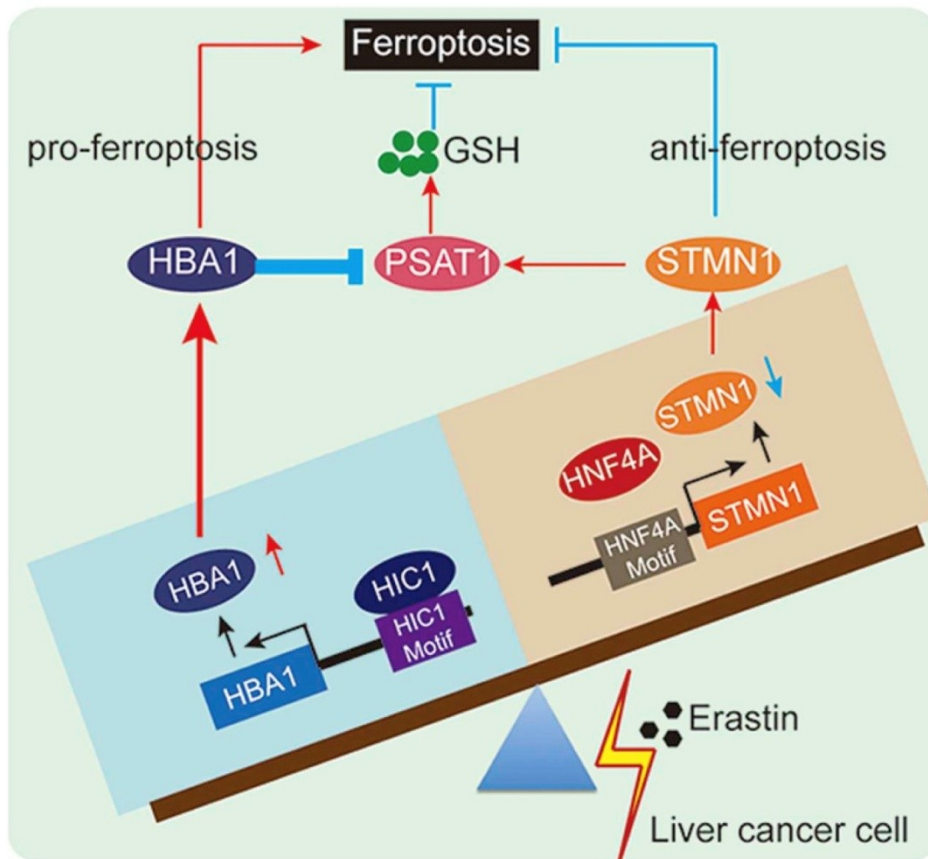


Figura 16: Interazione fra HIC1 e HNF4 per il controllo dell'equilibrio tra FUF e FDF nella ferroptosi. Tratto da (122)

Regolatori della ferroptosi nell'HCC

1) Nell'HCC, **ACSL4** può stimolare l'espressione della lipasi attraverso la via SREBP1 e regolare la produzione di lipidi, per partecipare alla proliferazione e metastatizzazione. Molti gruppi di ricerca hanno elaborato la relazione tra Sorafenib e ACSL4 e hanno proposto che l'espressione di ACSL4 possa essere utilizzata per predire l'effetto terapeutico di Sorafenib nell'HCC. Feng et al. hanno suggerito che la presenza di ACSL4 è associata ad una risposta negativa al trattamento con Sorafenib, e che per questo può essere utilizzato come predittore dell'effetto terapeutico (95).

2) La glutatione perossidasi 4 (**GPX4**) converte il glutatione (GSH) tra lo stato ridotto e quello ossidato e converte gli idroperossidi lipidici in alcoli lipidici. Studi precedenti hanno dimostrato che GPX4 è sovraespresso

nell'epatocarcinoma e che è direttamente correlato con la proliferazione cellulare e l'immortalizzazione delle cellule tumorali (136). GPX4 può essere utilizzato come marker prognostico e di tipizzazione per HCC (95).

3) Nel 2016, Sun et al. hanno chiarito il ruolo **dell'asse p62-Keap1-NRF2** nella protezione delle cellule tumorali di HCC dalla ferroptosi. Pertanto, il targeting dell'asse p62-Keap1-NRF2 può aiutare a prevenire la progressione dell'epatopatia cronica in HCC e ridurre le recidive postoperatorie di HCC reseccabile (101). Inoltre, in alcuni articoli è stata descritta anche la relazione tra la mutazione di CTNNB1 e NRF2. La mutazione del gene CTNNB1 è la seconda mutazione più comune nell'HCC, rappresentando circa il 26-38% di tutti i casi. Nel 2015, Zavattari et al. hanno studiato un modello di epatocita di ratto resistente ai farmaci e hanno scoperto che la mutazione CTNNB1 si è verificata tardi ed è apparsa solo nell'HCC completamente avanzato, mentre la mutazione NRF2 si è verificata precocemente e può mediare la trasformazione delle lesioni precancerose in HCC, attraverso l'amplificazione clonale. Nel 2021 è stato scoperto che, sebbene le mutazioni CTNNB1 non siano rare nell'HCC, le mutazioni CTNNB1 da sole non portano alla comparsa dell'HCC, ma sembrano avere un effetto sinergico con le mutazioni NRF2 per promuovere l'insorgenza di HCC (95).

4) **MT-1G** (metallotioneina-1G) è un regolatore negativo della ferroptosi nell'HCC. Il knockdown di MT-1G migliora la ferroptosi indotta da Sorafenib, aumentando la perossidazione lipidica e l'esaurimento di GSH (96).

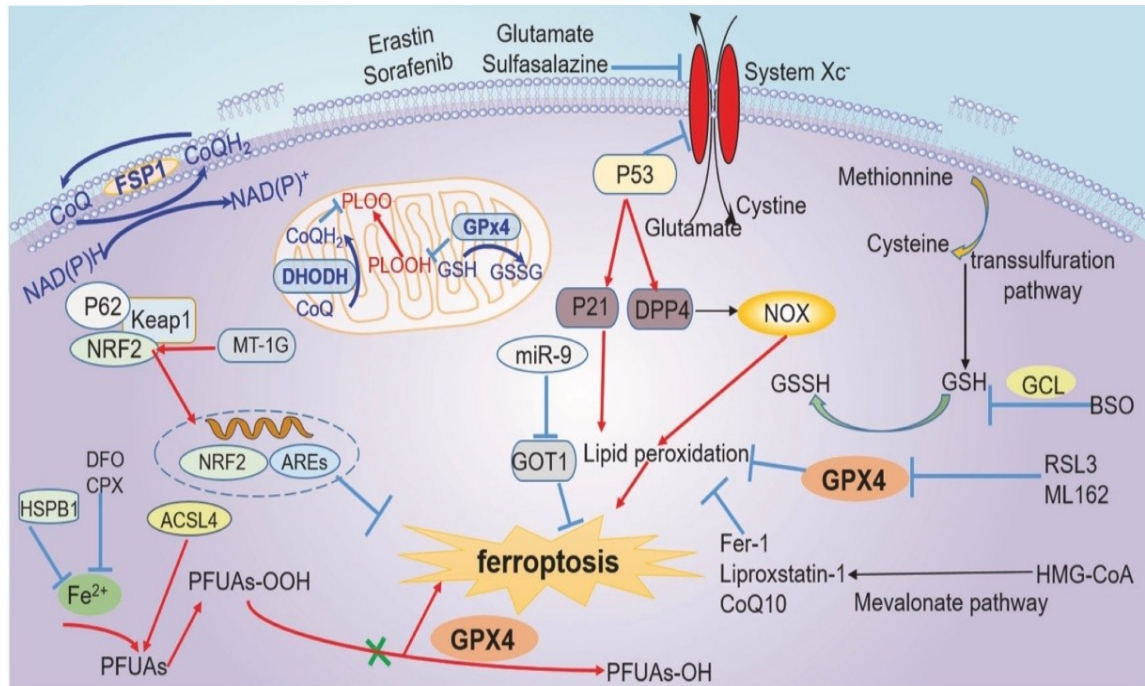


Figura 17: regolatori chiave della ferroptosi. Tratto da (123)

1.5 FERROPTOSI E TERAPIA ANTI TUMORALE

L'incapacità delle cellule di uccidere se stesse è stata direttamente collegata allo sviluppo del cancro, e può promuovere la resistenza alla terapia antitumorale. Le cellule incapaci di uccidersi, come quelle che sovra esprimono l'inibitore dell'apoptosi BCL2 o quelle con difetti di p53, possono accumulare danni genetici che fanno avanzare la trasformazione neoplastica. Le mutazioni con perdita di funzione di p53 non solo impediscono di indurre l'apoptosi, ma influenzano anche le sue altre funzioni di soppressione del tumore, inclusa la capacità di attivare le vie di riparazione del DNA e causare l'arresto del ciclo cellulare e la senescenza (124).

La potenziale applicazione della ferroptosi nel superare la resistenza ai farmaci delle cellule tumorali, è riflessa dal suo ruolo di indurre la morte nelle cellule tumorali persistenti, che sono sopravvissute al trattamento con diversi cicli di chemioterapia. Lo studio della vulnerabilità di queste cellule tumorali ha mostrato che i geni bersaglio di Nrf2 erano down-regulated, e come detto in precedenza, Nrf2 è un importante soppressore della ferroptosi. Ulteriori studi hanno dimostrato che le cellule tumorali persistenti hanno livelli notevolmente ridotti sia di glutatione che di NADPH, e hanno una sensibilità specifica alla perossidazione lipidica piuttosto che una sensibilità generale allo stress ossidativo. L'evidenza mostra che gli inibitori di GPX4 sono letali in modo specifico nelle cellule persistenti proprio attraverso la ferroptosi. Sulla base di questi risultati, indurre la ferroptosi può essere una strategia promettente per superare la resistenza ai chemioterapici (94).

L'alterata omeostasi del ferro è una delle caratteristiche principali dell'HCC, suggerendo che si possa trattare l'HCC agendo sull'omeostasi di questo elemento. L'Artesunato è clinicamente usato come farmaco antimalarico, ma può indurre ferroptosi ROS-dipendente mantenendo il pool di ferro labile (LIP). In particolare, l'Artesunato promuove l'accumulo di LIP nel reticolo endoplasmatico, acidificando i lisosomi per promuovere la degradazione della

ferritina. Ciò può causare la sovrapproduzione di ROS e grave compromissione del reticolo endoplasmatico, che può provocare la morte cellulare (95).

Sorafenib è il farmaco di prima linea per il carcinoma HCC avanzato, ma può solo prolungarne la sopravvivenza limitata; è necessario quindi trovare una strategia combinata per aumentarne l'efficacia. L'Artesunato è un buon candidato, poiché è clinicamente ben tollerato, e soprattutto entrambi i farmaci possono indurre ferroptosi tramite meccanismi diversi. In uno studio è stato dimostrato che l'Artesunato ha notevolmente migliorato gli effetti antitumorali con basse dosi di Sorafenib. Il trattamento combinato ha indotto perossidazione lipidica e ferroptosi esacerbate. Sorafenib a basse dosi causa principalmente stress ossidativo, attraverso alterazioni mitocondriali e deplezione del glutatione; l'Artesunato media l'attivazione del lisosoma che sinergizza con gli effetti pro-ossidativi di Sorafenib. L'Artesunato potrebbe quindi essere utilizzato per rendere più efficace il trattamento dell'HCC con Sorafenib (125).

Diversi studi che utilizzano linee cellulari di HCC suggeriscono che la ferroptosi potrebbe essere il meccanismo principale alla base dell'effetto antitumorale di Sorafenib, attraverso la soppressione dell'antiporto cistina/glutammato SLC7A11. È interessante notare che le cellule HCC negative al retinoblastoma (Rb) sono più suscettibili alla morte cellulare indotta da Sorafenib rispetto alle cellule HCC che esprimono Rb (100). Un altro studio recente ha scoperto che il LIFR (recettore del fattore inibitorio della leucemia) sensibilizza le linee cellulari HCC alla ferroptosi indotta da Sorafenib sia in vitro che in vivo, mentre la perdita dell'espressione di LIFR conferisce resistenza alla ferroptosi (126). Questi risultati contraddittori potrebbero essere attribuiti a diversi contesti cellulari, come i livelli di espressione di LIFR e/o altri geni/percorsi non definiti correlati alla sensibilità di Sorafenib. Recentemente, l'IFN- γ è stato utilizzato per sensibilizzare le cellule di HCC alla ferroptosi sopprimendo il sistema Xc⁻, tramite l'attivazione della via di segnalazione JAK/STAT, fornendo così nuove informazioni sul possibile utilizzo dell'IFN- γ per indurre la ferroptosi nel trattamento dell'HCC (127). La soppressione dell'FTH (ferritin

heavy chain) rende le cellule HCC più sensibili sia alla ferroptosi indotta da RSL3 che dal ferro. Al contrario, le cellule HCC con livelli di lattato extracellulare aumentati sono più resistenti alla ferroptosi indotta da RSL3 ed Erastina (128). Presi insieme, questi studi suggeriscono che l'induzione della ferroptosi può servire come strategia promettente per il trattamento dell'HCC.

Nel 2020, Leineweber et al (129) hanno scoperto che il Sorafenib può mediare gli effetti antitumorali anche attraverso i suoi effetti sui PUFAs. In particolare, Sorafenib è un efficace inibitore dell'eossido idrolasi solubile (sEH). sEH è in grado di catalizzare la conversione dell'acido arachidonico (AA) e dell'acido docosaesaenoico omega-3 (DHA) nei corrispondenti glicoli. L'acido AA epossidocosapentaenoico (EET) può promuovere la crescita e la metastasi del tumore, mentre l'acido DHA 19,20-eossidocosapentaenoico (19,20-EDP) ha l'effetto opposto. È stato ipotizzato che, sebbene l'effetto sugli EET possa influenzare l'effetto terapeutico di Sorafenib, l'integrazione con DHA nel trattamento dell'HCC con Sorafenib può aumentare il livello di 19,20-EDP e potenziarne l'effetto antitumorale. Pertanto, è ragionevole ipotizzare che, sebbene il suo effetto sugli EET possa influenzare la risposta terapeutica complessiva a Sorafenib, l'integrazione con DHA nel trattamento dell'HCC può invertire l'effetto degli EET e potenziarne la capacità antitumorale (95).

Recentemente però uno studio ha ottenuto dei risultati che dimostrano inequivocabilmente come Sorafenib non inneschi la ferroptosi né attraverso l'inibizione del sistema Xc⁻ né con altri meccanismi non ancora riconosciuti rilevanti per la ferroptosi, a differenza dell'Erastina e della Sulfasalazina che inibiscono Xc⁻. Inoltre, è stato scoperto che le linee cellulari possono reagire in modo molto diverso all'inibizione del sistema Xc⁻. Pertanto, in questo studio si scoraggia l'utilizzo di Sorafenib come induttore della ferroptosi in futuro. (130)

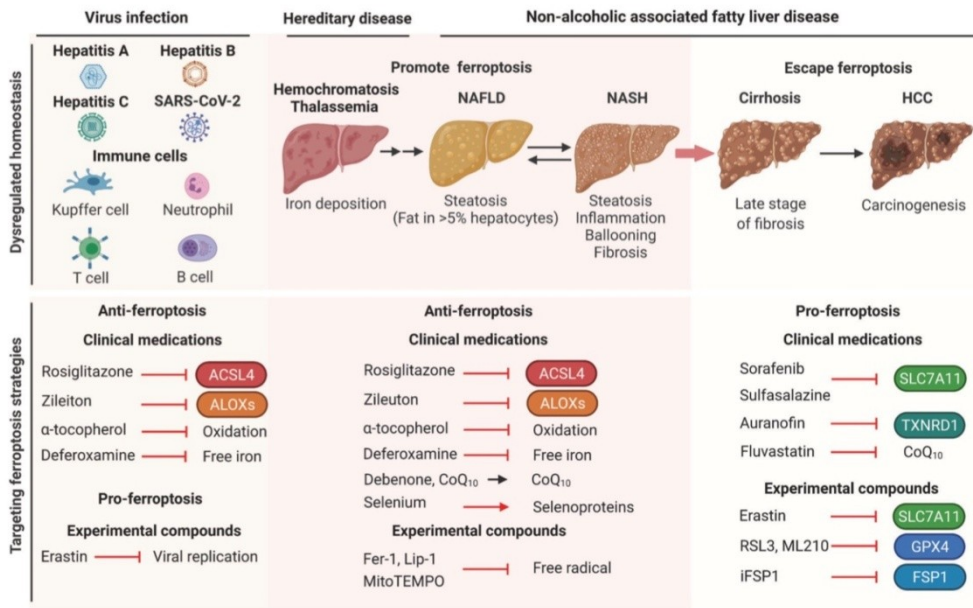


Figura 18: La ferroptosi come strategia terapeutica nelle patologie epatiche. Tratto da (100)

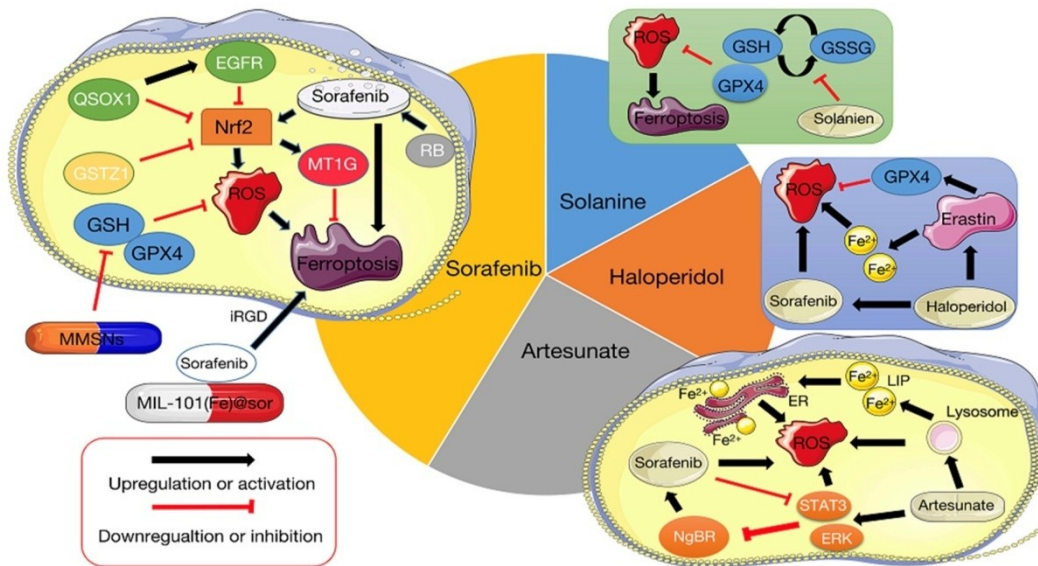


Figura 19: Possibili meccanismi di trattamento dell'HCC tramite la ferroptosi. Tratto da (95)

2. SCOPI DELLO STUDIO

Uno dei principali *hallmarks* del tumore è l'elusione dei meccanismi di morte cellulare, quali l'apoptosi e la necroptosi. Nel 2012 è stato scoperto un nuovo tipo di morte cellulare regolata, la ferroptosi, dipendente dal ferro e dalla perossidazione lipidica. Anche nell'epatocarcinoma, la cellula tumorale è in grado di sopravvivere e proliferare in maniera incontrollata grazie all'attivazione di vie molecolari anti-apoptotiche e anti-necroptotiche. Da diversi studi però, è emerso che nelle cellule tumorali resistenti ad uno di questi meccanismi di morte cellulare, viene mantenuta la sensibilità nei confronti della ferroptosi. Sulla base di questi risultati, indurre la ferroptosi può essere una strategia promettente per superare la resistenza ai chemioterapici. Avvalendosi di queste considerazioni, lo scopo principale dello studio è stato i) studiare il ruolo della ferroptosi nell'HCC umano, analizzando con metodica immunohistochimica l'espressione dei suoi principali mediatori/regolatori; ii) correlare tali risultati di laboratorio con le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti. È stata analizzata anche l'espressione di STAT3 per valutare lo stato anti-apoptotico del microambiente tumorale e l'espressione mutata/ wild type di P53, che è uno dei principali oncosoppressori tumorali.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Selezione dei casi

Per lo studio sono stati selezionati 65 pazienti, sottoposti ad intervento chirurgico di resezione epatica per HCC con intento curativo presso la U.O.C. Clinicizzata di Chirurgia della AULSS2, Ospedale di Treviso. Tutti i pazienti hanno dato il loro consenso informato alla procedura. I casi sono stati selezionati a partire dalla disponibilità di blocchetti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) del tumore, conservati presso gli archivi della U.O.C Clinicizzata di Anatomia Patologica della AULSS2, Ospedale di Treviso. Il periodo di reclutamento è compreso tra luglio 2015 e gennaio 2021. I criteri di esclusione sono stati 1) la presenza di necrosi all'interno del tessuto tumorale conseguente a procedure di TACE/TARE; 2) la mancanza di qualità/quantità di materiale sufficiente per un'analisi immunohistochimica; 3) l'assenza d'informazioni cliniche.

3.2 Dati clinici

I dati clinici dei pazienti sono stati ottenuti dalle cartelle cliniche. Tali dati includono sesso, età, patologia epatica di base, stato all'ultimo follow-up, recidiva di malattia. Tutti i pazienti inclusi sono stati sottoposti a follow-up tramite esecuzione di TC torace-addome e visite di controllo chirurgiche/gastroenterologiche.

3.3 Analisi istologica

Tutti i casi sono stati rivisti dalla laureanda e da due anatomopatologhe e sono stati classificati secondo i criteri WHO 2019 (36). Nei casi selezionati sono stati valutati i seguenti parametri: grading tumorale, stadio TNM (36), sottotipo macrotrabecolare, stato dei margini di resezione, la presenza d'invasione linfo-vascolare e/o perineurale. Durante la revisione al microscopio, sono state selezionate per ciascun paziente le aree rappresentative da cui ottenere il TMA e su cui eseguire la successiva indagine immunohistochimica: tessuto

tumorale, parenchima non neoplastico, interfaccia tra tessuto non neoplastico e neoplastico.

3.4 Analisi immunoistochimica

L'analisi immunoistochimica è stata eseguita su TMA costruiti ottenendo da ciascun caso 2 carotaggi di 2.0 mm di diametro, comprendenti tessuto ottenuto dalla porzione di parenchima non tumorale, dalla porzione centrale del tumore e dalla porzione periferica del tumore al confine con il tessuto non neoplastico. Le colorazioni immunoistochimiche sono state eseguite secondo le tecniche standard utilizzando Leica Microsystems Bond-Max autostainer (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK).

I TMA (*tissue microarray analysis*) sono blocchi di paraffina nei quali vengono raccolti prelievi di tessuto, definiti *cores*, sotto forma di cilindri derivati da molteplici pazienti. Questa tecnica, infatti, permette di analizzare contemporaneamente un ampio numero di casi e viene diffusamente utilizzata per lo studio dei biomarkers tumorali (132). Il microarray tissutale è una tecnica ad alto rendimento che consente ai patologi di eseguire analisi su larga scala utilizzando l'immunoistochimica, l'ibridazione in situ fluorescente (FISH) o l'ibridazione in situ dell'RNA (ISH) a costi più bassi e più velocemente rispetto agli approcci convenzionali. La tecnica fu segnalata per la prima volta 20 anni fa da Battifora, ed il formato array è stato concepito per la prima volta da Wan e colleghi nel 1987. Nel 1998, Kononen inventò un dispositivo per la costruzione rapida e accurata dei microarray, divenendo in questa maniera accessibile nella maggior parte dei laboratori. L'invenzione di questo dispositivo ha portato ad un aumento della popolarità e dell'utilità della tecnica. Esistono numerosi vantaggi del microarray tissutale rispetto alle tecniche standard, tra cui: 1) amplificazione di una risorsa materiale scarsa 2) analisi simultanea di un numero molto elevato di campioni 3) uniformità sperimentale 4) diminuzione del volume, del tempo e dei costi del test 5) la tecnica non distrugge il blocco originale per la diagnosi e quindi viene conservato tessuto prezioso. Una delle critiche più comuni al microarray

tissutale è che i cores hanno piccole dimensioni e potrebbero non essere rappresentativi dell'intero tumore, in particolare nei tumori eterogenei. Tuttavia, molti gruppi hanno mostrato un'eccellente concordanza tra *spots* di tessuto microarray e intere sezioni negli studi immunohistochimici di multipli tipi di tumore (131).

Procedura

La laureanda ha preparato i blocchetti di TMA per l'analisi immunohistochimica autonomamente. Grazie alla sovrapposizione dei vetrini (sui quali sono state selezionate le zone da analizzare: tumore, tessuto non neoplastico e tessuto peritumorale), con i corrispondenti blocchetti di paraffina, la laureanda ha ottenuto dei *cores* cilindrici di tessuto che sono stati inseriti nel blocchetto per il TMA, seguendo delle coordinate precedentemente studiate.

Con uno strumento apposito vengono acquisiti frustoli di tessuto dai blocchi FFPE donatori che vengono poi collocati in un blocco di paraffina vuoto. In ogni blocco sono stati inseriti 33 frustoli cilindrici. La difficoltà durante la procedura sta nell'ottenere dei carotaggi di piccole dimensioni che siano comunque rappresentativi del tessuto da analizzare, e durante la procedura di inserimento all'interno del blocchetto bisogna prestare attenzione a non inserire il carotaggio troppo in profondità. Una volta ottenuto il microarray tissutale, infine, sono state tagliate delle sezioni di 5 μm con un microtomo dai blocchi di TMA preparati dalla laureanda, e si sono ottenuti dei vetrini per l'analisi immunohistochimica (figure 20 e 21).

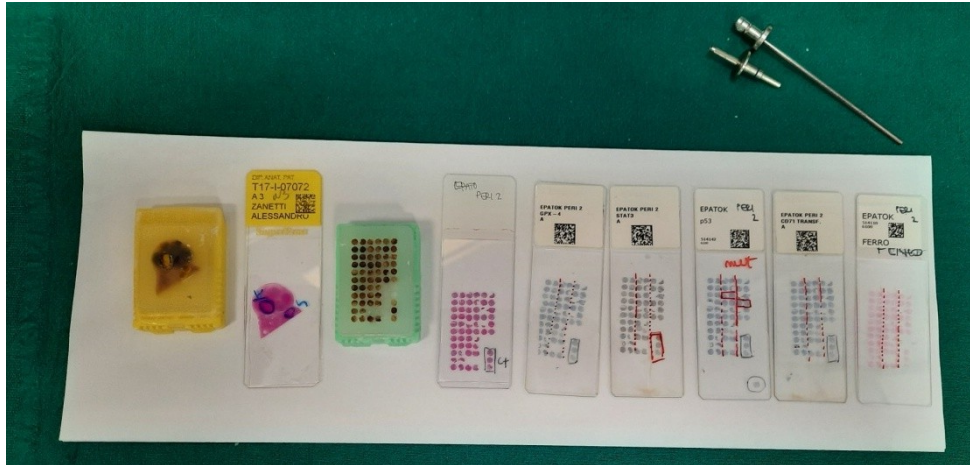


Figura 20: Materiali per la costruzione del TMA e vetrini ottenuti.



Figura 21: TMA master, strumento utilizzato per la preparazione del blocchetto in paraffina del TMA.

Ferroptosi

La ferroptosi è stata analizzata usando i seguenti anticorpi: **anti-GPX4** (Sc-166570, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA; diluizione 1:400; anticorpi monoclonali murini), **anti-TFR1** (10F11, Novocastra, Leica Biosystems, Newcastle, United Kingdom, diluizione 1:100; anticorpi monoclonali murini).

Per ciascuna colorazione sono stati utilizzati dei controlli positivi:

- Per GPX4 si è usato un core ottenuto da un campione di testicolo. Sono state considerate positive le colorazioni intra-citoplasmatiche e nucleari delle cellule dei tubuli seminiferi e delle cellule di Leydig.

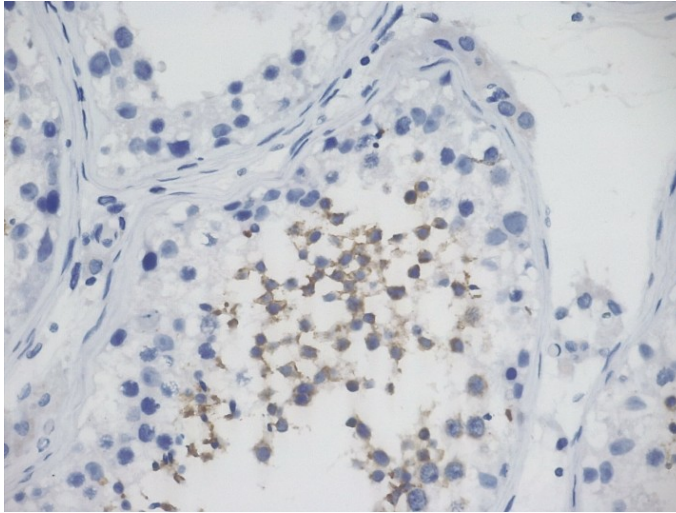


Figura 22: colorazione immunoistochimica positiva per GPX4 nel campione di testicolo

- Per TFR1 (CD71) si è usato un core ottenuto da un campione di trofoblasto placentare. La colorazione è risultata positiva nel citoplasma (in forma granulare) e sulla membrana del sinciziotrofoblasto placentare.

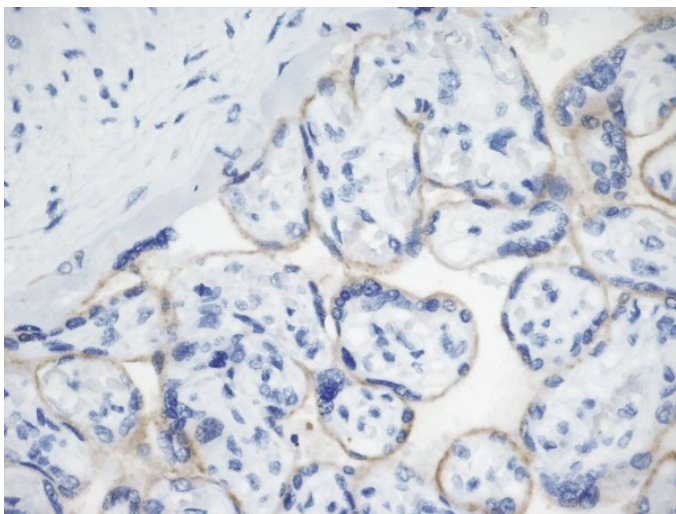


Figura 23: colorazione immunoistochimica positiva per CD71 nel campione di trofoblasto placentare

STAT3

È stato utilizzato l'anticorpo anti-STAT3 (Sc- 8019, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA; diluzione 1:200; anticorpi monoclonali murini). Per il controllo positivo è stato utilizzato un core ottenuto da un campione di tuba di Falloppio umana. La colorazione è risultata positiva nel citoplasma delle cellule ghiandolari.

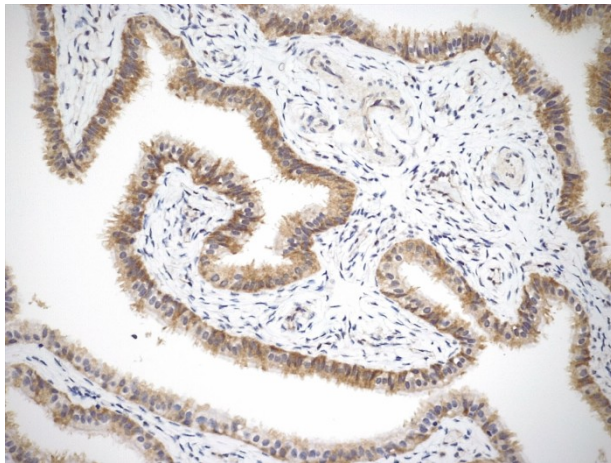


Figura 24: colorazione immunoistochimica positiva per STAT3 nel campione di tuba di Falloppio.

P53

È stato utilizzato l'anticorpo anti-P53 (Agilent Technologies- GA616, Glostrup, Danimarca; diluzione ready to use; anticorpo monoclonale murino DO-7). Per il controllo positivo è stato utilizzato un core ottenuto da un campione di carcinoma sieroso di alto grado dell'ovaio. È stata considerata positiva (pattern mutato) l'immunoreazione nucleare oltre l'80% delle cellule, oppure una completa assenza d'immunoreattività nucleare in presenza di un controllo interno positivo. Per pattern non mutato si intende invece una positività debole eterogenea.

Le analisi d'immunoistochimica sono state valutate nel seguente modo:

-GPX4: nessuna espressione = 0; espressione citoplasmatica/nucleare > 50% del citoplasma =2+; espressione citoplasmatica/nucleare < al 50% = 1+ (90)

- STAT 3: nessuna espressione = 0; 1+ (<10%), 2+ (10-50%), 3+ (50-75%), 4+ (>75%). (91)

- TFR1 (CD71): è stato calcolato un *H-score* moltiplicando la percentuale di cellule positive per l'intensità della colorazione (0 assente, 1+ bassa, 2+ moderata, 3+ alta). (92).

- P53: pattern wild type = 0; pattern mutato = 1

- L'Iron Stain Kit (Agilent, Dako) è stato utilizzato per individuare la presenza di pigmenti di ferro all'interno di ciascun campione, espressa come assenza (-) e presenza (+).

3.5 Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata eseguita mediante il programma statistico SPSS (version 25.0, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, USA). Per le correlazioni clinico-patologiche sono stati utilizzati Mann–Whitney test (Rank Sum Test), Wilcoxon test e lo Spearman rank correlation test. Le variabili continue sono state espresse come intervalli, mentre le variabili categoriche come frequenza e percentuali. Il test del chi quadro è stato utilizzato per il confronto tra medie. Le curve di OS e DFS sono state generate utilizzando il metodo di Kaplan-Meier e comparate utilizzando il long-rank e il test Wilcoxon. Un p-value < 0.05 è stato considerato come significativo.

4. RISULTATI

GENERALITA'

Caratteristiche clinico-patologiche

La tabella VI riporta i dettagli clinico-patologici dei 65 pazienti arruolati, di cui la maggioranza di sesso maschile (78,5%), con età media alla diagnosi di 67 anni (range 34-86 anni) e con malattia epatica di base nella maggioranza (HCC insorto in fegato non fibrotico/cirrotico in una minoranza di pazienti). Il follow-up clinico medio è stato di 755 giorni (range 5-2452 giorni), durante il quale si è verificata recidiva in un terzo dei pazienti (21/65; 32%) e morte per malattia in 9 casi (9/65; 14%). Tutti i casi hanno avuto la conferma della diagnosi istologica di HCC. Le caratteristiche istologiche con valore prognostico che sono state valutate sono riportate in dettaglio in tabella VI. Una minoranza dei casi (7/65; 11%) presenta pattern di crescita macrotrabecolare. Quattro di questi ultimi casi hanno presentato recidiva di malattia (4/7; 57%), per la maggioranza sono di alto grado (sono scarsamente differenziati) e con multiple invasioni linfovaskolari.

	N = 65 (100%)
Maschi	51 (78.5)
Femmine	14 (21.5)
Età, media ± DS – anni	67.3 ± 10.5
Patologia di base	
<i>HCV</i>	25 (35)
<i>Esotossica</i>	17 (24)
<i>NAFLD/NASH</i>	10 (14)
<i>Criptogenica</i>	9 (12,5)
<i>HBV</i>	6 (7)
<i>Fegato “sano”</i>	2 (3)
<i>Epatite autoimmune</i>	2 (3)
<i>Emocromatosi</i>	1 (1,5)

Grado di differenziazione HCC	
G1	23 (35,4)
G2	35 (53,8)
G3	7 (10,8)
Stadio TNM (AJCC 8°ed)	
pT1	28 (43)
pT2	19 (29)
pT3	3 (5)
pT4	1 (1,5)
pN1	1 (1,5)
Invasione linfovascolare	
presente	21 (32)
assente	44 (67)
Invasione perineurale	
presente	1 (1,5)
assente	64 (98,5)
Necrosi	
presente	13 (20)
assente	52 (80)
Cirrosi	
presente	33 (51)
assente	32 (49)
Steatosi	
presente	20 (31)
Assente	45 (69)

Stato dei margini di resezione	
R0	59 (91)
R1	6 (9)
Follow-up	
media \pm DSD – giorni	755 \pm 536
Recidiva	
Presente	21 (37,5)
assente	35 (62,5)
Media \pm DS – giorni	1002 \pm 588
Status	
Morti di malattia	9 (13,8)

Tabella VI: Caratteristiche clinico-patologiche dei 65 pazienti

Espressione dei marcatori immunoistochimici

CD71

Il marcatore è risultato negativo in tutti i casi di tessuto non neoplastico e positivo in 10 casi di HCC (15,4%), dei quali 5/10 con espressione di membrana e 5/10 con espressione citoplasmatica (figura 25).

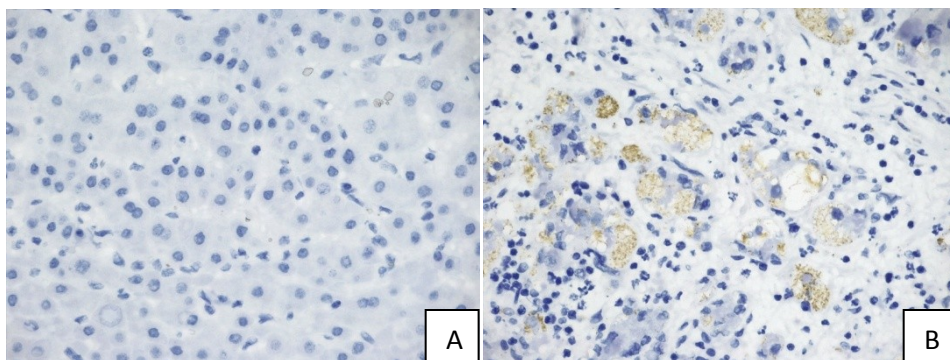


Figura 25: colorazione immunoistochimica per CD71 negativa (A) e positiva citoplasmatica (B)

GPX4

Il marcatore è risultato espresso sia nel tessuto non neoplastico che nel tessuto tumorale in 10/65 casi (15,4%), solo nel tessuto non neoplastico in 28/65 casi (43%) e solo nell'HCC in 5/65 casi (7,7%). Tra i casi di tessuto non neoplastico con espressione positiva di GPX4, 29/38 sono risultati ad espressione di basso grado e 9/38 di alto grado (figura 26). Tutti i casi di tessuto tumorale positivi per il marcatore GPX4 (15/65; 23%) sono ad espressione di basso grado.

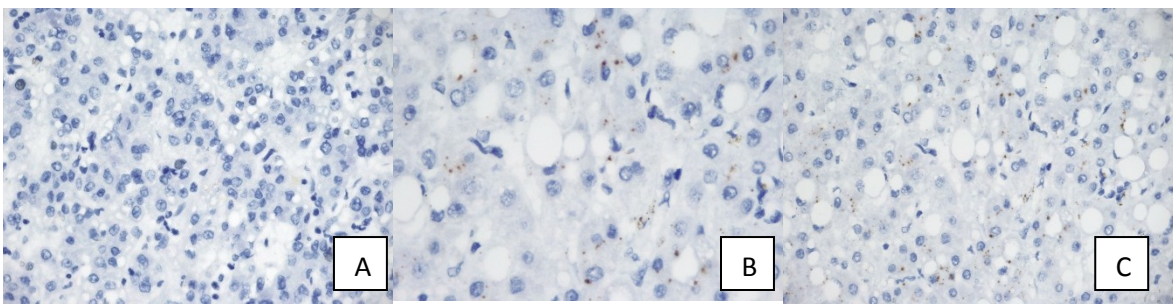


Figura 26: colorazione immunoistochimica per GPX4 negativa (A), positiva di basso grado (B), positiva di alto grado (C)

Ferro

La colorazione per il ferro è risultata positiva in 11/65 casi di tessuto non neoplastico (17%) e in 2/65 casi (3%) di HCC, la cui controparte di tessuto non neoplastico però non è risultata positiva per la stessa colorazione (figura 27).

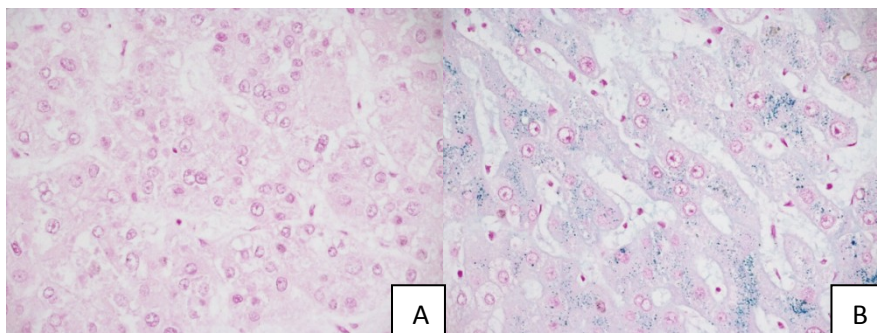


Figura 27: colorazione per il ferro negativa in un tessuto neoplastico (A) e positiva nel fegato non neoplastico (B)

STAT3

Il marcatore è risultato positivo in 53/65 casi di tessuto non neoplastico (81,5%), di cui 30/53 di basso grado e 23/53 di grado intermedio. Inoltre è risultato espresso in 55/65 casi di HCC (84%), di cui 39/55 di basso grado, 13/55 di grado intermedio e 3/55 di alto grado (figura 28). In 8/65 casi il marcatore STAT3 è risultato negativo nel tessuto non neoplastico e positivo nel corrispondente tessuto di HCC, mentre in 8/65 casi la positività per STAT3 era espressa nel tessuto non neoplastico e non nel corrispettivo tessuto di HCC.

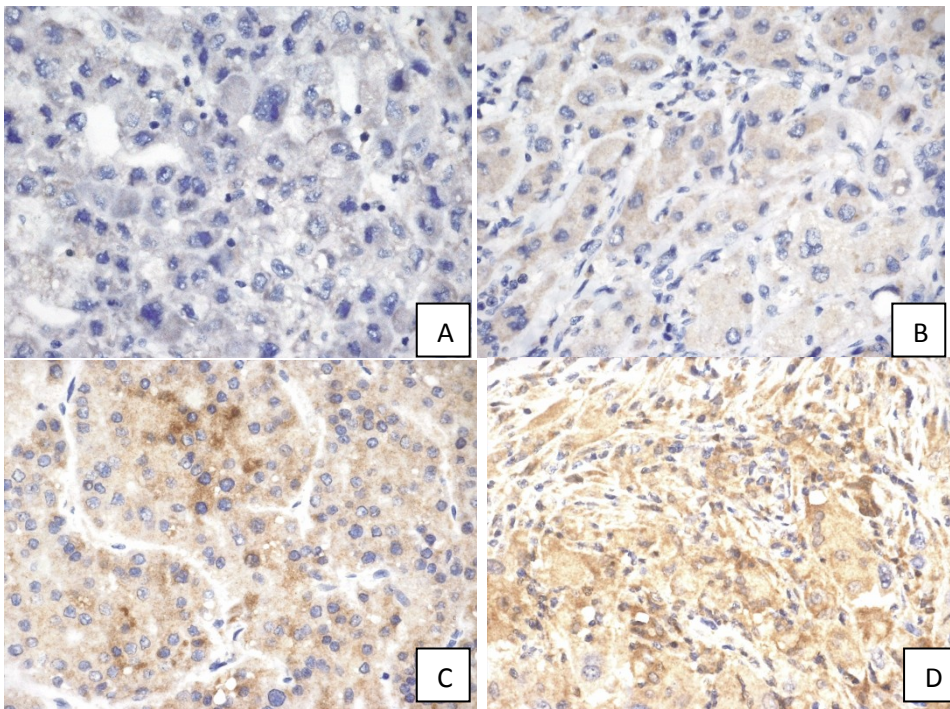


Figura 28: Colorazione immunoistochimica per STAT3 negativa (A), positiva di basso grado (B), positiva di grado intermedio (C), positiva di alto grado (D).

P53

La colorazione per p53 è risultata con pattern non mutato in tutti i tessuti non neoplastici analizzati (65/65) e con pattern mutato iperespresso in 3/65 HCC (figura 29).

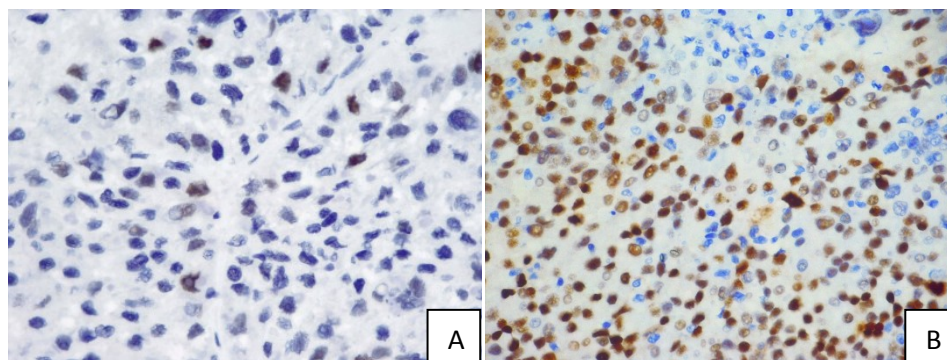


Figura 29: colorazione immunohistochemica per p53 con pattern non mutato (A) e pattern mutato (iperespresso) (B)

Non sono state rilevate differenze nell'espressione di STAT3, p53, CD71, GPX4 e nella colorazione per il ferro nei TMA di tessuto peritumorale rispetto alle corrispondenti carote di tessuto non neoplastico e neoplastico.

Correlazioni clinico-patologiche

Non sono state evidenziate differenze significative tra maschi e femmine.

E' emersa una relazione inversa tra età alla diagnosi e presenza di necrosi neoplastica ($p=0,03$), steatosi ($p=0,03$) e recidiva di malattia ($p=0,02$). Una maggiore dimensione del tumore (valutata mediante il parametro T del TNM sec. AJCC 8°ed) è correlata al grado di differenziazione nella nostra casistica: più grande è il tumore e meno è differenziato, cioè meno assomiglia alla controparte di tessuto sano ($p=0,01$). Inoltre all'aumentare delle dimensioni del tumore, aumenta la presenza d'invasioni linfovascolari neoplastiche ($p<0,001$). E' emersa inoltre una relazione inversa tra T e OS ($p=0,04$) e DFS ($p=0,01$).

La presenza d'invasione linfovaskolare nella nostra casistica dimostra un trend di correlazione con una peggiore OS (così come mostrato dalle curve di sopravvivenza nella figura 30) ($p=0,08$).

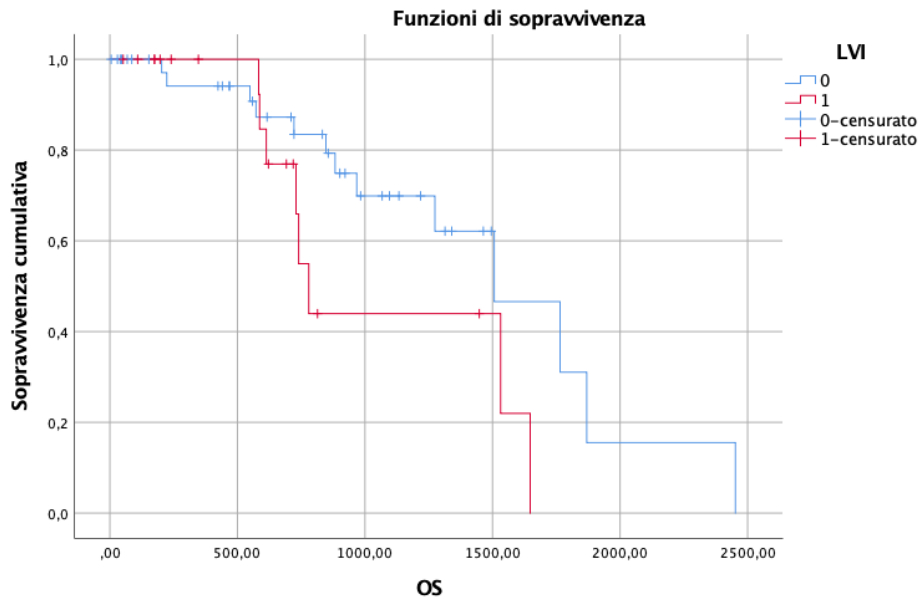


Figura 30: Correlazione tra invasione linfovaskolare e OS

Il pattern di crescita macrotrabecolare risulta correlato ad una minore OS ($p=0,019$) e DFS ($p=0,029$) (figura 31).

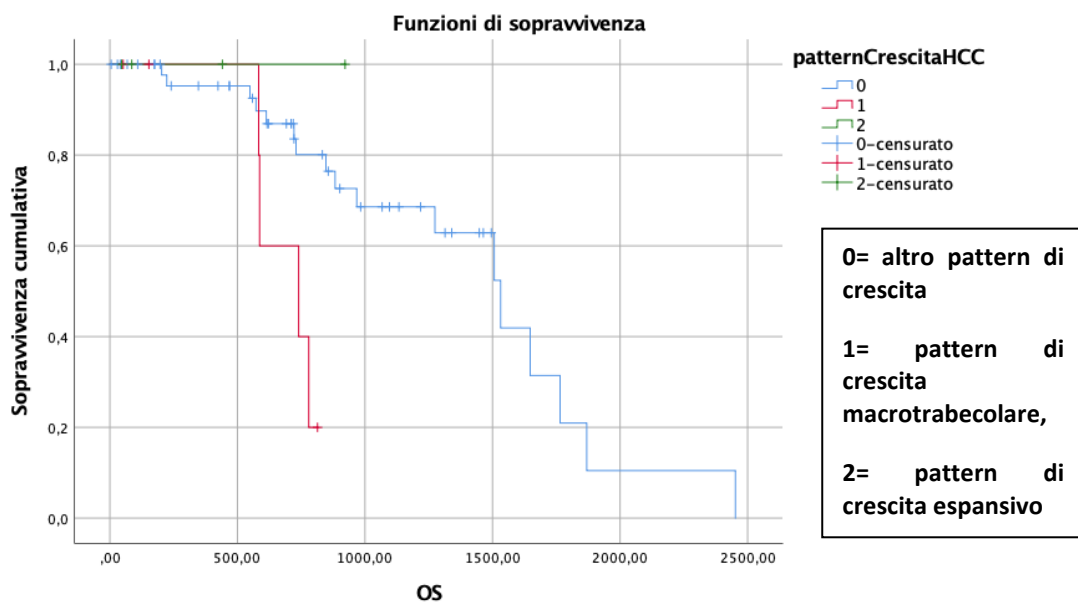


Figura 31: Correlazione tra pattern di crescita dell'HCC e OS

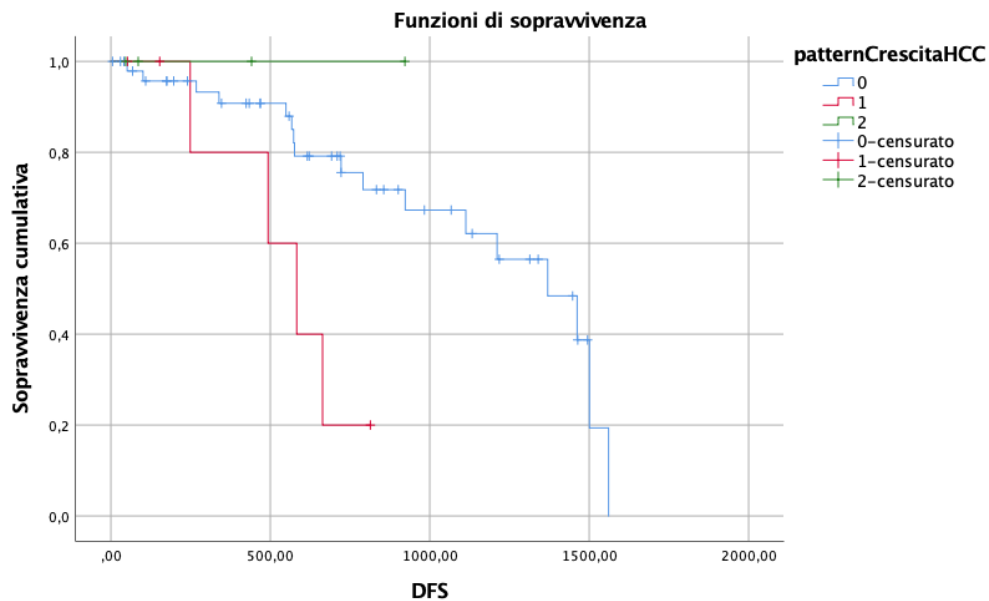


Figura 32: Correlazione tra pattern di crescita dell'HCC e DFS

L'espressione in membrana di CD71 è presente in una minoranza di HCC (5/65; 8%) ed è più frequente nel sesso femminile che in quello maschile ($p=0,02$). La recidiva di malattia si è verificata in uno di questi casi, il cui tumore è caratterizzato da alto grading (G3), pattern di crescita macrotrabecolare, presenza d'invasione linfovaskolare (i quali sono tutti fattori di rischio) ed è insorto in fegato non cirrotico. I 4 restanti casi non hanno presentato recidiva e sono tumori di basso grado, a pattern di crescita espansivo, privi di invasioni vascolari ed insorti tutti in fegato cirrotico. In questo sottogruppo di casi, GPX4 è risultato poco espresso nel fegato non neoplastico e assente nel tessuto neoplastico. Non abbiamo documentato accumulo di ferro in nessuno dei casi di HCC. STAT3 è risultato espresso (2+ o 3+) in questi 5 casi nel tessuto neoplastico.

L'espressione di STAT3 correla con la presenza di necrosi nel tessuto non neoplastico ($p=0,04$). Alla curva di sopravvivenza la maggior espressione di STAT3 si associa ad una maggiore OS ($p=0,016$) (figura 33). Inoltre,

l'espressione di STAT3 nel tessuto di HCC correla con la presenza di pattern mutato di p53 ($p=0,03$).

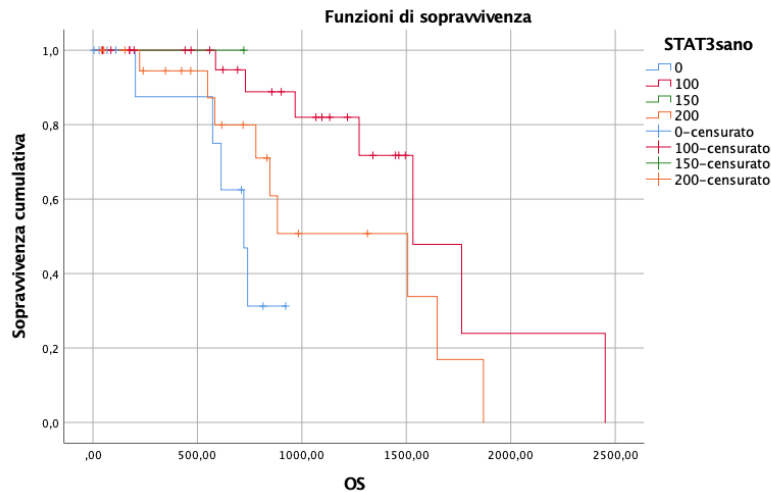


Figura 33: Correlazione tra l'espressione di STAT3 e OS

GPX4 è risultato positivo con espressione di basso grado in 15/65 HCC (23%). E' stata rilevata una relazione tra GPX4 in HCC e presenza di cirrosi ($p=0,047$), minor dimensione del tumore valutata mediante il T ($p=0,02$), minor grado di differenziazione ($p=0,03$) e morte per malattia ($p=0,07$). Non è stata trovata una relazione statisticamente significativa con OS né DFS.

Pazienti recidivati

Una minoranza di pazienti è deceduta per malattia (9/65; 13,8%). Tra questi, 6/9 (67%) hanno avuto recidiva di malattia ($p=0,017$), 4/9 (44%) erano cirrotici, 4/9 (44%) con invasione linfovaskolare, 1/9 (11%) con PNI ($p=0,01$), 3/9 (33%) con margini di resezione positivi ($p=0,007$), tutti G2/G3 ($p=0,07$), 2/9 (22%) con pattern mutato di TP53 ($p=0,006$), con assenza di espressione di GPX4 nel fegato malato ($p=0,07$) e con debole espressione di GPX4 nel fegato non neoplastico adiacente ($p=0,06$).

All'analisi di sopravvivenza abbiamo riscontrato che i casi con p53 mutato hanno una maggior mortalità ($p=0,06$) e ridotta DFS ($p=0,01$) (figure 34, 35).



Figura 34: Correlazione fra espressione di p53 (pattern mutato vs non mutato) nel tessuto tumorale e OS

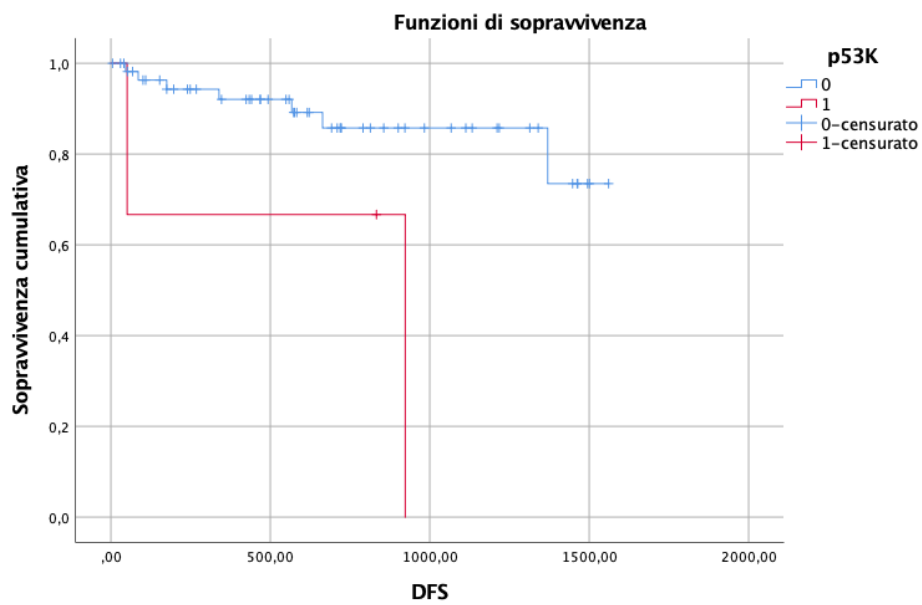


Figura 35: Correlazione fra espressione di p53 (pattern mutato vs non mutato) nel tessuto tumorale e DFS

5. DISCUSSIONE

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è una neoplasia maligna primitiva del fegato composta da cellule epiteliali, con differenziazione epatocellulare (36). Ad oggi, lo sviluppo sequenziale dell'epatocarcinogenesi non è completamente compreso. Nello sviluppo dell'HCC c'è un'interazione complessa tra fattori pro-infiammatori (IL-6, TNF- α), citochine anti infiammatorie (TGF- β e α), fattori di trascrizione (NFkB, STAT3) e le loro vie di trasduzione del segnale (14). NF-kB promuove la sopravvivenza degli epatociti e controlla l'espressione della citochina IL-6, che attiva STAT3, fattore di trascrizione ritenuto importante nello sviluppo dell'HCC. STAT3 appartiene alla famiglia dei trasduttori di segnale e attivatori di trascrizione (STAT) e la sua attivazione richiede la fosforilazione mediata dalle Janus chinasi, in particolare JAK2 (133). STAT3 regola molti geni dell'immunosoppressione e della progressione del tumore. Inoltre, funge da fattore di trascrizione oncogenico e promuove la tumorigenesi proteggendo le cellule tumorali dall'apoptosi. L'inibizione della pathway IL-6/STAT3 potrebbe essere un potenziale trattamento per l'HCC (134).

Uno dei principali *hallmarks* del tumore è l'elusione dei meccanismi di morte cellulare. Durante la trasformazione maligna dell'HCC, le cellule tumorali spesso subiscono un processo di selezione che consente loro di eludere l'apoptosi. La ferroptosi è un tipo di morte cellulare programmata, ferro-dipendente non apoptotica, caratterizzata dall'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dalla perossidazione lipidica (93). L'eccesso di ferro cellulare promuove la perossidazione lipidica e la produzione di ROS, che innescano la ferroptosi. Gli epatociti neoplastici hanno la capacità di evitare l'accumulo di ferro in eccesso nel citoplasma ai fini della sopravvivenza cellulare. In uno studio (135) è stato dimostrato che il TFR-1 è significativamente sovraespresso nelle cellule tumorali di HCC e che era maggiormente espresso nei sottotipi aggressivi. La glutatione perossidasi 4 (GPX4) è uno dei principali regolatori della ferroptosi. Agisce come inibitore, prevenendo la formazione di ROS e perossidi lipidici. L'inibizione di GPX4 dunque rappresenta una strategia per indurre la cascata ferroptotica. Studi precedenti hanno dimostrato che GPX4 in vivo è sovraespresso

nell'epatocarcinoma, e che è direttamente correlato con la proliferazione cellulare e l'immortalizzazione delle cellule tumorali (136). Da diversi studi è emerso che nelle cellule tumorali resistenti ad uno dei meccanismi di morte cellulare, viene mantenuta la sensibilità nei confronti della ferroptosi. Sulla base di questi risultati, indurre la ferroptosi può essere una strategia promettente per superare la resistenza ai chemioterapici (94).

Dai nostri dati è risultato che l'espressione di STAT3 nel tessuto di HCC correla con la presenza di pattern mutato di p53. Questo risultato è in linea con i dati della letteratura. Infatti le mutazioni in *TP53* sono presenti in quasi il 50% di tutti i tumori umani, e la perdita funzionale di p53 provoca l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari, che porta all'ossidazione dei residui catalitici di cisteina e all'inattivazione della tirosina fosfatasi SHP2, che dunque non riesce a defosforilare JAK2 e STAT3, mediando così l'attivazione persistente di STAT3 (140). I casi con p53 mutato hanno mostrato una ridotta OS e DFS. I casi mutati in p53 sono maggiormente aggressivi, hanno un'alta espressione del fattore anti-apoptotico STAT3, sono correlati ad una maggiore mortalità ($p=0,006$). E' però anche da ricordare che il gene *TP53* è coinvolto in tutti i meccanismi di morte cellulare e il suo peso specifico nella ferroptosi merita di essere ulteriormente approfondito.

Dall'analisi dei nostri dati è emersa una relazione inversa tra età alla diagnosi e presenza di necrosi neoplastica, steatosi e recidiva di malattia. Questo dato è in linea con la letteratura, infatti le caratteristiche cliniche del carcinoma epatocellulare sono diverse nei pazienti anziani rispetto a quelli giovani. Negli anziani, l'HCC ha una fibrosi di accompagnamento inferiore rispetto ai pazienti più giovani e di solito viene diagnosticato come nodulo singolo e di dimensioni maggiori. Inoltre, i noduli HCC sono più frequentemente ben differenziati, incapsulati e senza invasione vascolare (137).

La presenza d'invasione linfovaskolare ha un trend di correlazione con una peggiore OS ($p=0,08$), confermando la letteratura. La mancanza di significatività statistica, sebbene sia presente un trend, potrebbe essere

dovuta al fatto che i) alcuni paziente sono stati persi al follow-up ii) periodo di follow-up breve rispetto alla storia naturale della malattia iii) bassa numerosità della casistica. Tuttavia, nella nostra serie di HCC il pattern macrotrabecolare si conferma più aggressivo ($p=0,019$), come noto in letteratura. Inoltre, all'aumentare delle dimensioni del tumore, l'HCC appare meno differenziato ($p=0,01$), con più invasioni linfovascolari ($p<0,001$), minor OS ($p=0,04$) e DFS ($p=0,01$).

I risultati del nostro studio suggeriscono come non sia presente una correlazione fra le diverse patologie alla base dell'HCC e i marcatori della ferroptosi. Perciò possiamo dedurre come non sia necessario stratificare i casi di carcinoma epatocellulare in base all'eziologia durante lo studio della ferroptosi nell'HCC.

Il recettore della transferrina (CD71) è un mediatore vitale della ferroptosi, che svolge un ruolo chiave nell'assorbimento cellulare del ferro attraverso la sua interazione con la transferrina. Il ferro circolante viene introdotto nelle cellule attraverso CD71 e viene poi trasformato in Fe^{2+} dagli endosomi. Un eccesso di Fe^{2+} porta all'accumulo di perossidazione lipidica attraverso la reazione di Fenton, scatenando così la ferroptosi (138). Dai nostri risultati è emerso che nei casi laddove CD71 è espresso nel tessuto tumorale, GPX4 non viene espresso nello stesso tessuto. Perciò in questi casi di HCC è verosimile che la ferroptosi non sia inibita, ma potrebbe essere attivata dal momento che il recettore per la transferrina favorisce la ferroptosi, agendo sul metabolismo del ferro. Però, in uno solo dei 5 casi positivi per CD71 la colorazione per il ferro è risultata positiva nel tessuto tumorale. La colorazione speciale per il Ferro documenta quantitativi macroscopicamente rilevabili ("grandi"), e potrebbe essere insufficiente per dimostrare le quantità di ferro necessarie e sufficienti per far funzionare la ferroptosi, che potrebbero essere minori. In alternativa, il ferro potrebbe essere stato progressivamente consumato dai ROS e con GPX4 negativo la ferroptosi potrebbe essere attiva.

L'idea che la ferroptosi in queste cellule di HCC possa essere attiva deriva anche dal fatto che 4/5 casi non hanno avuto recidiva di malattia, hanno un grading minore e minore aggressività non essendoci invasione linfovaskolare, suggerendo quindi che la ferroptosi possa essere un meccanismo di morte cellulare protettivo nell'HCC.

Nei 15 casi di HCC positivi alla colorazione immunohistochimica per GPX4 abbiamo evidenziato che erano tutti epatocarcinomi comparsi nel contesto di un fegato cirrotico ($p=0,04$). In un contesto di fibrosi prima, e cirrosi epatica poi, c'è accumulo di radicali liberi dell'ossigeno e perossidazione lipidica. In una fase precoce di danno epatico, le molecole rilasciate dagli epatociti morti (DAMPs) attivano i macrofagi residenti o cellule di Kupffer che, attraverso la secrezione di chemochine quali CCL2 e CCL5, reclutano nel fegato danneggiato monociti dal circolo. Questi ultimi in caso di danno cronico prevalgono numericamente sui macrofagi residenti e danno origine a particolari macrofagi pro-infiammatori e pro-fibrogenici, che a loro volta producono NO, specie reattive dell'ossigeno (ROS), amplificano la risposta infiammatoria ma sostengono anche l'attivazione delle cellule stellate epatiche, dando origine alla risposta fibrogenica (139).

Nel contesto della fibrosi/cirrosi quindi esistono molti elementi che possono favorire l'innescarsi della ferroptosi. Le cellule tumorali di HCC in questi casi esprimono GPX4 per sfuggire a questo tipo di morte cellulare, essendo GPX4 l'inibitore principale della ferroptosi. Questo permette la progressione tumorale. L'espressione di GPX4 nei nostri casi è risultata più frequente nei tumori di piccole dimensioni ($p=0,02$) e di basso grado ($p=0,01$), e nessuno dei pazienti con espressione di GPX4 è deceduto per malattia ($p=0,07$).

L'assenza di ferro nelle cellule neoplastiche, la mancanza di espressione di CD71 in membrana unitamente all'assenza di GPX4 sembrano suggerire, nel nostro gruppo di studio, che la ferroptosi non è normalmente attiva né costitutivamente bloccata nella maggioranza degli HCC, similmente a quanto documentato dal nostro gruppo di ricerca nei colangiocarcinomi extraepatici e diversamente dai colangiocarcinomi intraepatici. E' pur vero che nei casi in cui abbiamo documentato l'espressione di CD71, possiamo supporre che il ferro venga

progressivamente consumato dalla presenza dei ROS. Questo dato, insieme alla negatività per GPX4, implica che la ferroptosi sembrerebbe attiva suggerendo la possibilità di utilizzare farmaci a monte di GPX4. Tra questi, si sottolineano i farmaci induttori della ferroptosi di classe 1, quali Erastina e Sulfasalazina (93). Questi farmaci agiscono inibendo il sistema X_c^- formato da SLC7A11 e SLC3A2, che appunto si trova a monte di GPX4 (figura 36).

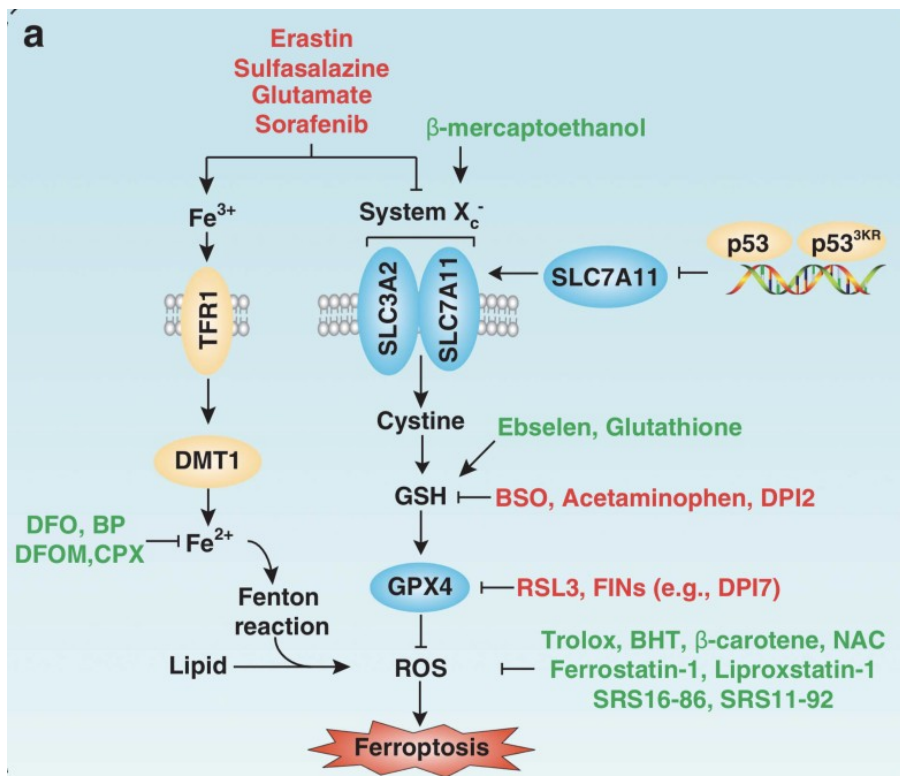


Figura 36: Meccanismo d'azione dell'Erastina e Sulfasalazina. Tratto da (97)

Anche il Sorafenib apparterebbe alla classe 1 degli induttori della ferroptosi, tuttavia recentemente uno studio ha ottenuto dei risultati che dimostrano inequivocabilmente come Sorafenib non inneschi la ferroptosi né attraverso l'inibizione del sistema X_c^- né con altri meccanismi non ancora riconosciuti rilevanti per la ferroptosi (130).

Sebbene in altre neoplasie, quali il glioblastoma e il carcinoma mammario, la sovraespressione di GPX4 sia un fattore prognostico negativo, nel nostro studio questo non sembra essere confermato. La differenza potrebbe tuttavia essere dovuta alla bassa numerosità della casistica.

6. CONCLUSIONI

Il nostro studio conferma che il carcinoma epatocellulare è una neoplasia estremamente eterogenea, sia morfologicamente che biologicamente (141). In un sottogruppo di HCC, l'espressione di GPX4 suggerisce che la via ferroptotica di morte cellulare sia inibita, e che potrebbe essere attivata utilizzando farmaci che hanno GPX4 come bersaglio. Negli altri casi in cui sembra che la ferroptosi non sia costitutivamente inibita, si potrebbe suggerire l'utilizzo di farmaci che agiscano su bersagli a monte o a valle di GPX4.

BIBLIOGRAFIA

1. Alqahtani, Ali et al. "Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies." *Medicina (Kaunas, Lithuania)* vol. 55,9 526. 23 Aug. 2019
2. Yang, Ju Dong et al. "A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management." *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* vol. 16,10 (2019): 589-604.
3. Kulik, Laura, and Hashem B El-Serag. "Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology* vol. 156,2 (2019): 477-491.
4. Linee guida AIOM 2020
5. Unigastro-Malattie dell'apparato digerente
6. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012 May;142(6):1264-1273.e1.
7. Yang JD, Mohamed EA, Aziz AO, et al. Characteristics, management, and outcomes of patients with hepatocellular carcinoma in Africa: a multicountry observational study from the Africa Liver Cancer Consortium. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(2):103-111. doi:10.1016/S2468-1253(16)30161-3
8. Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y, Racila A, Hunt S, Beckerman R. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology*. 2016 Nov;64(5):1577-1586.
9. Younossi ZM, Otgonsuren M, Henry L, Venkatesan C, Mishra A, Erario M, Hunt S. Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology*. 2015 Dec;62(6):1723-30
10. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet*. 2001;357(9255):539-545.
11. Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF. Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3943-3953.
12. Golabi P, Fazel S, Otgonsuren M, Sayiner M, Locklear CT, Younossi ZM. Mortality assessment of patients with hepatocellular carcinoma according to underlying disease and treatment modalities. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Mar;96(9):e5904.
13. Ramakrishna G, Rastogi A, Trehanpati N, Sen B, Khosla R, Sarin SK. From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence. *Liver Cancer*. 2013 Aug;2(3-4):367-83.

14. Villanueva A, Luedde T. The transition from inflammation to cancer in the liver. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2016 Oct 27;8(4):89-93.
15. Khemlina, Galina et al. "The biology of Hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies." *Molecular cancer* vol. 16,1 149. 30 Aug. 2017
16. Calderaro J, Ziol M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *J Hepatol*. 2019 Sep;71(3):616-630.
17. Monga SP. β -Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2015 Jun;148(7):1294-310.
18. Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouzé E, Blanc JF, Laurent C, Hajji Y, Azoulay D, Bioulac-Sage P, Nault JC, Zucman-Rossi J. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol*. 2017 Oct;67(4):727-738.
19. *EMJ Hepatol*. 2017;5[1]:81-88.
20. Buscarini L. Hepatocellular carcinoma. *Trends Med* 2004; 4(4):305-316.
21. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S35-S50.
22. Chang CY, Hernandez-Prera JC, Roayaie S, Schwartz M, Thung SN. Changing epidemiology of hepatocellular adenoma in the United States: review of the literature. *Int J Hepatol*. 2013;2013:604860.
23. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu JT, et al. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology*. 2006;43(3):515-524.
24. Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20(43):15955-15964.
25. Della rocca C., D'Amati G., *Anatomia Patologica. La sistematica*. Editore:Edra – Masson, Edizione:II 2018
26. Kojiro M. Pathology of Hepatocellular Carcinoma. Hoboken: Wiley, 2009: 1-184
27. The international Agency for Research on Cancer: WHO Classification of Tumors of the digestive System (IARC WHO Classification of Tumors). 4th ed. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. Publisher : World Health Organization, 2010: 1-418
28. Shafizadeh N, Kakar S. Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(6):438-445.

29. Chen IY, Agostini-Vulaj D. Hepatocellular carcinoma overview. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorHCC.html>. Accessed May 30th, 2022.
30. EDMONDSON HA, STEINER PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*. 1954 May;7(3):462-503.
31. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. European Association for the Study of the Liver. *Journal of Hepatology* 2018 vol. 69 j 182–236
32. Vogel A. et al. Hepatocellular Carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* (2018) 29 (Suppl 4): iv238–iv255
33. Hu KQ. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in patients with chronic hepatitis C, but not hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99(5):860-5.
34. Zhao YJ et al. Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(4):593-8.
35. Joo M et al. Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci*. 2005;20(5):829-34.
36. Digestive System Tumours 5th Edition, *Who Classification of Tumors*
37. Guido M et al. Squamous cell carcinoma antigen in human liver carcinogenesis. *J Clin Pathol*. 2008;61(4):445-7.
38. Zhou L et al. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006;12(8):1175-81.
39. Bellissimo F et al. Diagnostic and therapeutic management of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2015;21(42):12003-21.
40. Bialecki ES, Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB*. 2005; 7(1):26-34.
41. Brancatelli G, Federle MP, Grazioli L, et al. Benign regenerative nodules in Budd-Chiari syndrome and other vascular disorders of the liver: radiologic-pathologic and clinical correlation. *Radiographics* 2002; 22:847-862.
42. Doyle A, Sherman M. Liver Biopsy for Hepatocellular Carcinoma (HCC): Should this be a Routine? *Current Hepatology Reports*. 2017;16(1):46-50.
43. Sanai FM, Keeffe EB. Liver biopsy for histological assessment-the case against. *Saudi J Gastroenterol*. 2010;16(2):124-32.

44. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 28:751-5, 1998
45. Llovet JM, Bru C, Bruix J: Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Seminars in Liver Disease* 19:329–38, 1999
46. Farinati F, et al; ITA.LI.CA study group. Development and Validation of a New Prognostic System for Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLoS Med.* 26;13(4), 2016
47. Borzio M, et al. External validation of the ITA.LI.CA prognostic system for patients with hepatocellular carcinoma: A multicenter cohort study. *Hepatology* 67(6):2215-2225, 2018
48. Yau T, Tang VY, Yao TJ, Fan ST, Lo CM, Poon RT. Development of Hong Kong Liver Cancer staging system with treatment stratification for patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 146(7):1691-700, 2013
49. Tellapuri S, Sutphin PD, Beg MS, Singal AG, Kalva SP. Staging systems of hepatocellular carcinoma: A review. *Indian J Gastroenterol.* 2018 Nov;37(6):481-491
50. Reig M, Forner A, Rimola J, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol.* 2022;76(3):681-693.
51. Gervais DA, Arellano RS. Percutaneous tumor ablation for hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol.* 2011;197:789–94.
52. Sangro B, Iñarrairaegui M, Bilbao JI. Radioembolization for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012;56:464–73
53. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *New Engl J Med* 1996; 14:693-699.
54. Papatheodoridis GV, Dalekos GN, Yurdaydin C, et al. Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in Caucasian chronic hepatitis B patients receiving entecavir or tenofovir. *J Hepatol.* 2015;62:363–70.
55. Cersosimo RJ. Systemic targeted and immunotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Am J Health Syst Pharm.* 2021 Jan 22;78(3):187-202.
56. Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;389:56–66.
57. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet.* 2017;389:2492–502.

58. Kelley RK, Verslype C, Cohn AL, et al. Cabozantinib in hepatocellular carcinoma: results of a phase 2 placebo-controlled randomized discontinuation study. *Ann Oncol*. 2017;28:528–34.
59. Zhu AX, Galle PR, Kudo M, et al. A study of ramucirumab (LY3009806) versus placebo in patients with hepatocellular carcinoma and elevated baseline alpha-fetoprotein (REACH-2). *J Clin Oncol*. 2018;364 Suppl:TPS538.
60. Liu, Ziyu, et al. "Molecular targeted and immune checkpoint therapy for advanced hepatocellular carcinoma." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38.1 (2019): 1-13.
61. Mahmud N. Selection for Liver Transplantation: Indications and Evaluation. *Curr Hepatol Rep*. 2020;19(3):203-212.
62. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019 Jun;43(6):582-592.)
63. Aizawa S, Brar G, Tsukamoto H. Cell Death and Liver Disease. *Gut Liver*. 2020;14(1):20-29.
64. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486-541.
65. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology*. 2014 Oct;147(4):765-783.e4.
66. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae CO, Matsushima K (1990) Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *The Journal of Immunology* 144(8): 3034–3038.
67. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P (2001) Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci* 21(13): 4752–60
68. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. Gennaio 2000; 100(1): 57-70.
69. Igney FH, Krammer PH (2002) Death and anti death: tumor resistance to apoptosis. *Nat rev Cancer* 2(4): 277-88
70. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev*. 2004 Apr;84(2):411-30.
71. Holler N, Zaru R, Micheau O, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. 2000;1(6):489-495.

72. Schwabe RF, Luedde T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(12):738-752.
73. Seehawer M, Heinzmann F, D'Artista L, et al. Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer [published correction appears in *Nature*. 2018 Nov 8;:]. *Nature*. 2018;562(7725):69-75.
74. Boise LH, Collins CM. Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death? *Trends Microbiol*. 2001 Feb;9(2):64-7.
75. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(5):2396-2401.
76. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004;306(5698):990-995.
77. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-1075.
78. Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem*. 2004;263(1-2):55-72.
79. Chen CF, Lee WC, Yang HI, et al. Changes in serum levels of HBV DNA and alanine aminotransferase determine risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1240-1248.e12482.
80. Lee MH, Yang HI, Lu SN, et al. Hepatitis C virus seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: long-term predictors from a community-based cohort study. *J Clin Oncol*. 2010;28(30):4587-4593.
81. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med*. 2011;43(8):617-649.
82. Lavallard VJ, Bonnafous S, Patouraux S, et al. Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One*. 2011;6(3):e17599. Published 2011 Mar 18.
83. Weerasinghe SV, Jang YJ, Fontana RJ, Omary MB. Carbamoyl phosphate synthetase-1 is a rapid turnover biomarker in mouse and human acute liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;307(3):G355-G364.
84. Weber A, Boger R, Vick B, et al. Hepatocyte-specific deletion of the antiapoptotic protein myeloid cell leukemia-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*. 2010;51(4):1226-1236.
85. Hikita H, Kodama T, Shimizu S, et al. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J Hepatol*. 2012;57(1):92-100.

86. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011;365(12):1118-1127.
87. Bettermann K, Vucur M, Haybaeck J, et al. TAK1 suppresses a NEMO-dependent but NF-kappaB-independent pathway to liver cancer. *Cancer Cell*. 2010;17(5):481-496.
88. Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, et al. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*. 2007;11(2):119-132.
89. Vucur M, Reisinger F, Gautheron J, et al. RIP3 inhibits inflammatory hepatocarcinogenesis but promotes cholestasis by controlling caspase-8- and JNK-dependent compensatory cell proliferation. *Cell Rep*. 2013;4(4):776-790.
90. Zhao H, Ji B, Chen J, Huang Q, Lu X. Gpx 4 is involved in the proliferation, migration and apoptosis of glioma cells. *Pathol Res Pract*. 2017;213(6):626-633.
91. Wu X, Deng Y, Zu Y, Yin J. Histone demethylase KDM4C activates HIF1 α /VEGFA signaling through the costimulatory factor STAT3 in NSCLC. *Am J Cancer Res*. 2020;10(2):491-506.
92. Greene CJ, Attwood K, Sharma NJ, et al. Transferrin receptor 1 upregulation in primary tumor and downregulation in benign kidney is associated with progression and mortality in renal cell carcinoma patients. *Oncotarget*. 2017;8(63):107052-107075. Published 2017 Nov 6.
93. Capelletti MM, Manceau H, Puy H, Peoc'h K. Ferroptosis in Liver Diseases: An Overview. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):4908. Published 2020 Jul 11.
94. Xu T, Ding W, Ji X, et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy. *J Cell Mol Med*. 2019;23(8):4900-4912.
95. Liao H, Shi J, Wen K, et al. Molecular Targets of Ferroptosis in Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma*. 2021;8:985-996. Published 2021 Aug 24.
96. Mou Y, Wang J, Wu J, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):34. Published 2019 Mar 29.
97. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, et al. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ*. Marzo 2016; 23(3): 369-379
98. Chen X, Kang R, Kroemer G, Tang D. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(5):280-296.
99. Qiu Y, Cao Y, Cao W, Jia Y, Lu N. The Application of Ferroptosis in Diseases. *Pharmacol Res*. 2020;159:104919.
100. Chen J, Li X, Ge C, Min J, Wang F. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease. *Cell Death Differ*. 2022;29(3):467-480.

101. Sun X, Ou Z, Chen R, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. 2016;63(1):173-184.
102. Liu Y, Gu W. p53 in ferroptosis regulation: the new weapon for the old guardian. *Cell Death Differ*. 2022;29(5):895-910.
103. Kang R, Kroemer G, Tang D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network. *Free Radic Biol Med*. 2019;133:162-168
104. Liu J, Song X, Kuang F, et al. NUPR1 is a critical repressor of ferroptosis. *Nat Commun*. 2021;12(1):647. Published 2021 Jan 28.
105. Miotto G, Rossetto M, Di Paolo ML, et al. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1. *Redox Biol*. 2020;28:101328.
106. Lu D, Xia Q, Yang Z, et al. ENO3 promoted the progression of NASH by negatively regulating ferroptosis via elevation of GPX4 expression and lipid accumulation. *Ann Transl Med*. 2021;9(8):661.
107. Pan Q, Luo Y, Xia Q, He K. Ferroptosis and Liver Fibrosis. *Int J Med Sci*. 2021;18(15):3361-3366. Published 2021 Jul 25.
108. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(8):807-821.
109. Land W, Schneeberger H, Schleibner S, et al. The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation*. 1994;57(2):211-217.
110. Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):262-275.
111. Wang W, Green M, Choi JE, et al. CD8⁺ T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy. *Nature*. 2019;569(7755):270-274.
112. Sui M, Jiang X, Chen J, Yang H, Zhu Y. Magnesium isoglycyrrhizinate ameliorates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by regulating ferroptosis signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:125-133.
113. Kong Z, Liu R, Cheng Y. Artesunate alleviates liver fibrosis by regulating ferroptosis signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:2043-2053.
114. Yi J, Wu S, Tan S, et al. Berberine alleviates liver fibrosis through inducing ferrous redox to activate ROS-mediated hepatic stellate cells ferroptosis. *Cell Death Discov*. 2021;7(1):374. Published 2021 Dec 4.
115. Zhang Z, Guo M, Li Y, et al. RNA-binding protein ZFP36/TTP protects against ferroptosis by regulating autophagy signaling pathway in hepatic stellate cells. *Autophagy*. 2020;16(8):1482-1505.

116. Ryan MB, Corcoran RB. Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(11):709-720.
117. Xie Y, Zhu S, Song X, et al. The Tumor Suppressor p53 Limits Ferroptosis by Blocking DPP4 Activity. *Cell Rep*. 2017;20(7):1692-1704.
118. Yang J, Antin P, Berx G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition [published correction appears in *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Dec;22(12):834]. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(6):341-352.
119. Sarcognato S, Jong IEM, Fabris L, Cadamuro M, Guido M. Necroptosis in Cholangiocarcinoma. *Cells*. 2020;9(4):982. Published 2020 Apr 15
120. Datz C, Felder TK, Niederseer D, Aigner E. Iron homeostasis in the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2013;43(2):215-224.
121. Fonseca-Nunes A, Jakszyn P, Agudo A. Iron and cancer risk--a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(1):12-31.
122. Zhang X, Du L, Qiao Y, et al. Ferroptosis is governed by differential regulation of transcription in liver cancer. *Redox Biol*. 2019;24:101211.
123. Wu J, Wang Y, Jiang R, et al. Ferroptosis in liver disease: new insights into disease mechanisms. *Cell Death Discov*. 2021;7(1):276. Published 2021 Oct 5.
124. Strasser A, Vaux DL. Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. *Mol Cell*. 2020;78(6):1045-1054.
125. Li ZJ, Dai HQ, Huang XW, et al. Artesunate synergizes with sorafenib to induce ferroptosis in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*. 2021;42(2):301-310.
126. Yao F, Deng Y, Zhao Y, et al. A targetable LIFR-NF- κ B-LCN2 axis controls liver tumorigenesis and vulnerability to ferroptosis. *Nat Commun*. 2021;12(1):7333. Published 2021 Dec 17.
127. Kong R, Wang N, Han W, Bao W, Lu J. IFN γ -mediated repression of system xc⁻ drives vulnerability to induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *J Leukoc Biol*. 2021;110(2):301-314.
128. Zhao Y, Li M, Yao X, et al. HCAR1/MCT1 Regulates Tumor Ferroptosis through the Lactate-Mediated AMPK-SCD1 Activity and Its Therapeutic Implications. *Cell Rep*. 2020;33(10):108487.
129. Leineweber CG, Pietzner A, Zhang IW, et al. Assessment of the Effect of Sorafenib on Omega-6 and Omega-3 Epoxyeicosanoid Formation in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1875. Published 2020 Mar 9. doi:10.3390/ijms21051875

130. Zheng J, Sato M, Mishima E, Sato H, Proneth B, Conrad M. Sorafenib fails to trigger ferroptosis across a wide range of cancer cell lines. *Cell Death Dis.* 2021;12(7):698. Published 2021 Jul 13.
131. TMA: Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med.* 2009;29(2):123-127.
132. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998;4(7):844-847.
133. He G, Karin M. NF- κ B and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* 2011;21(1):159-168.
134. Yin Z, Ma T, Lin Y, et al. IL-6/STAT3 pathway intermediates M1/M2 macrophage polarization during the development of hepatocellular carcinoma [retracted in: *J Cell Biochem.* 2022 Jun;123(6):1118]. *J Cell Biochem.* 2018;119(11):9419-9432.
135. Adachi M, Kai K, Yamaji K, et al. Transferrin receptor 1 overexpression is associated with tumour de-differentiation and acts as a potential prognostic indicator of hepatocellular carcinoma. *Histopathology.* 2019;75(1):63-73.
136. Guerriero E, Capone F, Accardo M, Sorice A, Costantini M, Colonna G, et al. GPX4 and GPX7 over-expression in human hepatocellular carcinoma tissues *Eur J Histochem EJH.* 1 dicembre 2015;59(4):2540.
137. Macias RIR, Monte MJ, Serrano MA, et al. Impact of aging on primary liver cancer: epidemiology, pathogenesis and therapeutics. *Aging (Albany NY).* 2021;13(19):23416-23434
138. Liu L, Zhang C, Qu S, et al. ESR1 inhibits ionizing radiation-induced ferroptosis in breast cancer cells via the NEDD4L/CD71 pathway. *Arch Biochem Biophys.* 2022;725:109299.
139. Parola, Maurizio. "Fibrosi e cirrosi epatica: risoluzione o regressione... questo è il dilemma." *www.readfiles.it* 12 (2020): 40.
140. Pham TH, Park HM, Kim J, Hong JT, Yoon DY. STAT3 and p53: Dual Target for Cancer Therapy. *Biomedicines.* 2020;8(12):637. Published 2020 Dec 21.
141. Li L, Wang H. Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy. *Cancer Lett.* 2016;379(2):191-197.