



Università degli Studi di Padova

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Chirurgiche Oncologiche e Gastroenterologiche
Direttore: Prof. Fabio Farinati

U.O.C. Gastroenterologia
Direttore: Prof. Fabio Farinati

TESI DI LAUREA

MiR-21 come parametro di attività e progressione di malattia in pazienti con danno epatico cronico e epatocarcinoma.

Relatore: Ch.mo Prof. Fabio Farinati

Correlatore: Dr. Filippo Pelizzaro

Laureando: Marco Terzoli

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

| | |
|--|-----------|
| RIASSUNTO | 1 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| 1. INTRODUZIONE..... | 5 |
| 1.1 LA STORIA NATURALE DELLA MALATTIA EPATICA CRONICA..... | 5 |
| 1.2 AGENTI EZIOLOGICI DI MALATTIA EPATICA CRONICA | 7 |
| 1.2.1 Epatite B..... | 7 |
| 1.2.1.1 Epidemiologia..... | 7 |
| 1.2.1.2 Fattori di rischio e prevenzione..... | 8 |
| 1.2.1.3 Storia naturale | 8 |
| 1.2.2 Epatite C | 12 |
| 1.2.2.1 Epidemiologia..... | 13 |
| 1.2.2.2 Fattori di rischio e prevenzione..... | 13 |
| 1.2.2.3 Storia naturale | 14 |
| 1.2.3 Steatosi Epatica e Steatoepatite Non Alcol-Correlata..... | 16 |
| 1.2.3.1 Epidemiologia..... | 16 |
| 1.2.3.2 Fattori di rischio e prevenzione..... | 17 |
| 1.2.3.3 Storia naturale e patogenesi | 17 |
| 1.2.4 Steatosi Epatica e Steatoepatite Alcol-correlata..... | 20 |
| 1.2.4.1 Epidemiologia..... | 20 |
| 1.2.4.2 Fattori di rischio..... | 20 |
| 1.2.4.3 Storia naturale e patogenesi | 21 |
| 1.3 CIRROSI..... | 22 |
| 1.3.1 Epidemiologia | 23 |
| 1.3.2 Fattori di rischio | 23 |
| 1.3.3 Fisiopatologia della cirrosi..... | 24 |
| 1.3.4 Storia naturale..... | 24 |
| 1.3.5 Ipertensione portale | 26 |
| 1.3.6 Ascite | 28 |
| 1.4 CARCINOMA EPATOCELLULARE | 29 |
| 1.4.1 Epidemiologia | 29 |
| 1.4.2 Fattori di rischio | 30 |
| 1.4.3 Carcinogenesi..... | 31 |
| 1.4.4 Stadiazione e prognosi | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 1.5 VALUTAZIONE DELLA FIBROSI EPATICA: TEST NON INVASIVI | 35 |
| 1.5.1 Fibroscan | 35 |
| 1.5.2 Ecografia Addominale..... | 35 |
| 1.5.3 Test ematochimici | 36 |
| 1.6 MICRO RNA..... | 36 |
| 1.6.1 Generalità e biosintesi | 36 |
| 1.6.2 MiR-21 | 38 |
| 1.6.2.1 Ruolo molecolare nella progressione della malattia epatica | 38 |
| 1.6.2.2 Mir-21 come biomarcatore..... | 43 |
| 2. SCOPO DELLO STUDIO..... | 51 |
| 3. MATERIALI E METODI..... | 53 |
| 3.1 GRUPPI DI STUDIO | 53 |
| 3.2 ESTRAZIONE E ANALISI MICRO-RNA | 54 |
| 3.3 ANALISI STATISTICA | 55 |
| 4. RISULTATI..... | 57 |
| 4.1 CARATTERISTICHE DI BASE DEI PAZIENTI..... | 57 |
| 4.2 LIVELLI CIRCOLANTI DI MIR-21..... | 59 |
| 4.3 CORRELAZIONE TRA MIR-21 E PARAMETRI CLINICI..... | 60 |
| 5. DISCUSSIONE..... | 65 |
| 6. CONCLUSIONI..... | 69 |
| 7. BIBLIOGRAFIA..... | 71 |

RIASSUNTO

Presupposti dello studio

I microRNA, molecole coinvolte nel controllo dell'espressione genica, sono frequentemente deregolati in svariate patologie e tumori umani. Negli ultimi anni molti studi hanno evidenziato una deregolazione di queste molecole nelle malattie epatiche croniche e nel carcinoma epatocellulare, suggerendone un possibile ruolo diagnostico e prognostico, anche se i risultati non sono del tutto concordanti. Uno dei microRNA più espressi nelle malattie croniche epatiche è miR-21.

Scopo dello studio

L'obiettivo dello studio è quello di determinare i livelli di miR-21 negli stadi clinico-patologici della malattia epatica cronica e nell'epatocarcinoma e valutarne la correlazione con la severità della fibrosi epatica e con i test di laboratorio di funzionalità epatica.

Materiali e metodi

I campioni di sangue di 16 volontari sani, 11 pazienti con NAFLD/NASH, 19 pazienti con epatite cronica C (CHC), 20 pazienti cirrotici e 18 pazienti con HCC raccolti tra gennaio 2019 e giugno 2021, sono stati valutati retrospettivamente. Nei gruppi NAFLD/NASH e nei gruppi CHC è stata anche valutata la stiffness epatica, mediante elastografia, mentre questi dati erano disponibili solo in 7 dei pazienti cirrotici. Dai campioni ematici sono stati determinati i livelli sierici di miR-21, i quali sono stati calcolati utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*fold-change, fc*), utilizzando soggetti sani come gruppo di riferimento per la normalizzazione.

Risultati

Rispetto ai soggetti sani, ai pazienti con NAFLD/NASH e CHC, un livello significativamente più alto di miR-21 è stato rilevato nei cirrotici (2.13-fc, IQR 1.15-2.93) e nei pazienti con HCC (1.67-fc, IQR 1.17-2.10), senza differenze statisticamente significative tra questi due ultimi gruppi. MiR-21 era correlato positivamente con la stiffness epatica misurata all'elastografia ($r = 0.44$, IC 95% 0.10-0.68; $p=0.01$) e i pazienti F0-F1 mostravano livelli più bassi del marker

rispetto a F2-F3 ($p=0.03$) e pazienti F4 ($p=0.0009$). Inoltre, miR-21 si è rivelato un predittore indipendente di fibrosi F4. In pazienti con epatite cronica e cirrotici, miR-21 era correlato con AST ($r = 0.40$; $p=0.001$), ALP ($r = 0.36$; $p=0.005$), albumina ($r = -0.42$; $p=0.0008$) e INR ($r = 0.39$; $p=0.002$).

Conclusioni

MiR-21 è un biomarcatore utile per identificare la progressione del danno epatico, ma non sembra accurato nella diagnosi di HCC considerando il livello simile nei cirrotici rispetto ai pazienti con cancro. È correlato alla fibrosi epatica, all'attività necroinfiammatoria epatica e ai parametri di funzionalità epatica e potrebbe essere utile per fornire informazioni su diversi aspetti delle malattie croniche del fegato.

ABSTRACT

Background

MicroRNAs, molecules involved in the control of gene expression, are frequently deregulated in many human diseases and cancers. In recent years, many studies have shown a deregulation of these molecules in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma, suggesting a possible diagnostic and prognostic role, even if the results are not entirely concordant. One of the most expressed microRNAs in chronic liver diseases is miR-21.

Purpose

The aim of the study is to evaluate miR-21 serum levels in clinical-pathological stages of chronic liver disease and in hepatocellular carcinoma and to assess its correlation with the severity of liver fibrosis and with liver function laboratory tests.

Methods

Blood samples of 16 healthy volunteers, 11 patients with NAFLD / NASH, 19 patients with chronic hepatitis C (CHC), 20 cirrhotic patients and 18 patients with HCC collected between January 2019 and June 2021, were evaluated retrospectively. Liver stiffness measured with elastography was also collected in the NAFLD / NASH and CHC groups, while these data were only available in 7 of the cirrhotic patients. Serum levels of miR-21 were determined from blood samples and calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold-change, fc) method, using healthy subjects as the reference group for normalization.

Results

Compared to healthy subjects, NAFLD/NASH and CHC patients, a significantly higher level of miR-21 was detected in cirrhotics (2.13-fold, IQR 1.15-2.93) and in HCC patients (1.67-fold, IQR 1.17-2.10), without statistically significant differences between these last two groups. MiR-21 was positively correlated with liver stiffness measured with elastography ($r = 0.44$, 95% CI 0.10-0.68; $p=0.01$), and F0-F1 patients showed lower levels of the marker compared to F2-F3 ($p=0.03$) and F4 patients ($p=0.0009$). In addition, miR-21 proved to be an

independent predictor of F4 fibrosis. In chronic hepatitis and cirrhotic patients, miR-21 was correlated with AST ($r = 0.40$; $p=0.001$), ALP ($r = 0.36$; $p=0.005$), albumin ($r = -0.42$; $p=0.0008$) and INR ($r = 0.39$; $p=0.002$).

Conclusions

MiR-21 is a useful marker in identifying the progression of liver damage, but it seems not accurate in diagnosis of HCC considering the similar level in cirrhotics compared to patients with cancer. It correlates with liver fibrosis, hepatic necroinflammatory activity and liver function parameters, and it could be useful in providing information on different aspects of chronic liver diseases.

1. INTRODUZIONE

1.1 LA STORIA NATURALE DELLA MALATTIA EPATICA CRONICA

Il fegato è uno degli organi più importanti e svolge moltissime funzioni essenziali per l'organismo: metaboliche, a livello glucidico, lipidico e proteico, ma anche cataboliche, di deposito e di rimozione di sostanze tossiche. Quando il fegato viene interessato da un processo patologico queste numerose funzioni che svolge vengono compromesse, in modo variabile e generalmente progressivo a seconda del grado di coinvolgimento del parenchima epatico.¹

I meccanismi alla base del danno epatico sono estremamente complessi e non ancora del tutto chiariti. Il danno può essere diretto, da parte dell'agente eziologico (virale, ischemico o chimico/tossico) a livello del parenchima epatico, oppure, come nella maggior parte dei casi, indiretto, cioè causato dall'infiammazione conseguente all'interazione tra agente lesivo e sistema immunitario. A tale danno il fegato risponde con un pattern variabile di riparazione e rigenerazione epatocitaria, fibrosi o necrosi cellulare, anche in base all'entità del danno e soprattutto alla permanenza e persistenza della causa. La malattia cronica epatica è al giorno d'oggi una tra le più frequenti patologie croniche nel mondo, incidendo notevolmente in termini di morbilità e mortalità, ma anche in termini di costi diretti e indiretti legati alla diagnosi, al trattamento e alla gestione delle numerose complicanze.²

La malattia epatica può essere causata da molti agenti eziologici: i principali sono gli agenti virali (epatite B [HBV], epatite C [HCV]), metabolici (Steatosi Epatica Non Alcol-correlata [Non-Alcoholic Fatty Liver Disease o NAFLD] e Steato-Epatite Non Alcol-correlata [Non-Alcoholic Steato-Hepatitis o NASH]) e tossici (Epatopatia Alcol-correlata [Alcoholic Liver Disease o ALD] e Steato-Epatite Alcol-correlata [Alcoholic Steato-Hepatitis o ASH]).³

La storia naturale delle malattie croniche di fegato (Figura 1) è comune indipendentemente dal tipo di danno. Nonostante presentino un meccanismo patogenetico diverso le une dalle altre, tutte le malattie epatiche croniche convergono allo sviluppo di fibrosi, come tentativo di riparazione in risposta all'insulto lesivo a carico del parenchima epatico, e alla conseguente evoluzione in cirrosi epatica, che con le sue complicanze e l'aumentato rischio di insorgenza

di epatocarcinoma, rappresenta lo stadio terminale delle malattie epatiche croniche.⁴

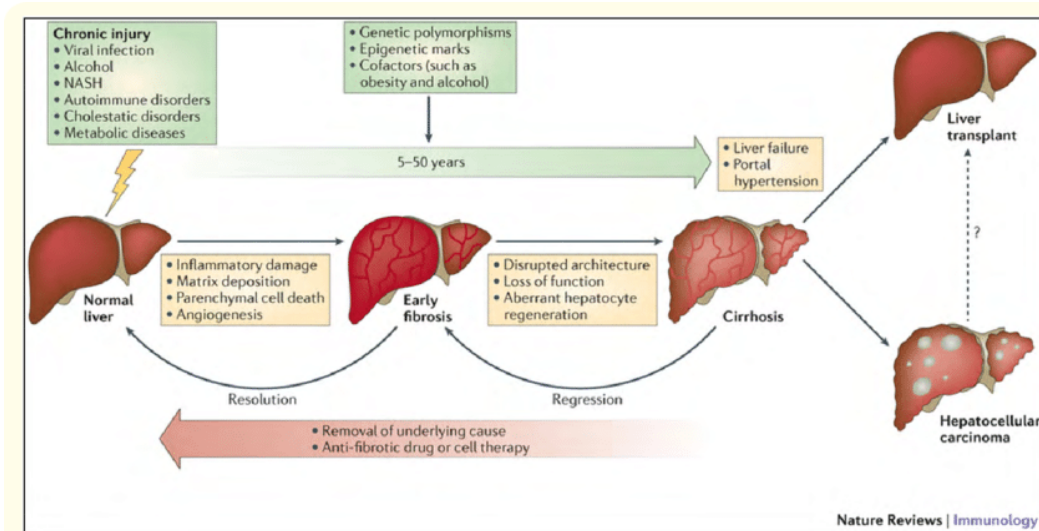


Figura 1: rappresentazione schematica della storia naturale della malattia epatica cronica.⁵

Le malattie di fegato possono esordire con una fase acuta, o epatite acuta, definita come un processo infiammatorio e necrotico che si risolve entro sei mesi. Solitamente questa fase è caratterizzata da un aumento importante delle transaminasi e dalla presenza di manifestazioni cliniche associate che dipendono in larga parte dalla gravità del coinvolgimento necroinfiammatorio a carico del parenchima epatico, come ittero e, seppur raramente, insufficienza epatica acuta. L'epatite cronica rappresenta la possibile evoluzione delle forme acute, le quali, maggior parte dei casi, passano inosservate in quanto asintomatiche o paucisintomatiche. L'epatite cronica è definita come un'entità clinico-patologica caratterizzata dalla persistenza per oltre sei mesi dei fenomeni di necrosi epatocitaria, causati da infiammazione diffusa del fegato e associati a un grado variabile di fibrosi.⁴

Spesso le epatiti croniche vengono diagnosticate casualmente, come conseguenza di altri accertamenti. Frequentemente l'esordio è subdolo, con sintomi aspecifici come astenia, febbricola e calo ponderale, con un lieve rialzo degli indici di epatocitolisi. Negli stadi più avanzati possono comparire i primi segni e sintomi legati allo scompenso epatico.^{6,7} Il tempo che intercorre tra l'esordio della malattia e l'instaurarsi della cirrosi, stadio terminale delle malattie epatiche croniche, è variabile e dipende da numerosi fattori come l'aggressività della malattia, dalla tempestività e dall'efficacia della terapia, dall'eliminazione degli eventuali fattori

di rischio e dalla capacità di risposta dell'organismo. Questo processo di infiammazione e fibrosi evolve in modo subclinico per molti anni, tant'è che la stessa cirrosi in fase iniziale non influisce sulla funzione epatica, che rimane conservata.⁸ La presenza di cirrosi può determinare lo sviluppo di ipertensione portale, una condizione caratterizzata da un aumento del gradiente pressorio tra vena porta e vene sovraepatiche, che può determinare l'insorgenza delle complicanze tipiche degli stadi avanzati di epatopatia quali l'insorgenza di varici esofagee e gastriche, ascite, encefalopatia, sindrome epatorenale, e discoagulopatia.⁹ La cirrosi epatica è inoltre la causa maggiore dell'insorgenza del carcinoma epatocellulare (HCC), al giorno d'oggi una delle neoplasie più comuni a livello mondiale e causa di elevata mortalità nella popolazione.¹⁰ Circa il 90% dei casi di HCC insorge infatti in pazienti cirrotici, ad eccezione dei paesi in cui l'eziologia virale predominante di epatiti croniche è HBV, come Cina, Giappone, Corea del Sud, Filippine e Vietnam: in questi casi l'HCC può insorgere, in un'elevata percentuale di casi, anche in fegati non cirrotici.^{11,12}

1.2 AGENTI EZIOLOGICI DI MALATTIA EPATICA CRONICA

1.2.1 Epatite B

Il virus dell'epatite B (HBV) è un virus a DNA, appartenente alla famiglia Hepadnaviridae. Caratteristica di HBV è quella di avere una DNA circolare, parzialmente a doppio filamento che viene convertito in un DNA stampo, detto cccDNA, altamente stabile e responsabile dell'infezione cronica.¹³

1.2.1.1 Epidemiologia

Nel 2010 circa la metà dei decessi associati a epatocarcinoma (HCC) è stata attribuita a HBV come fattore eziologico di malattia, mortalità che peraltro dimostra una continua ascesa nel mondo.¹⁴ Nel 2016, una stima ha indicato che circa 300 milioni di persone a livello globale sono positive all'infezione da HBV¹⁵, con circa 620 000 morti l'anno causate da questa patologia.¹⁶

I paesi del sud-est asiatico, tra cui soprattutto Cina, Giappone, Corea del Sud, Filippine, Vietnam e il continente Africano sono i paesi a più elevata incidenza di HBV¹¹. In Africa inoltre è frequente il riscontro di un quadro di co-infezione con il virus dell'immunodeficienza umana (HIV).¹⁷ Di contro, la prevalenza

dell'infezione è bassa in Europa e negli Stati Uniti, regioni in cui però l'immigrazione di individui provenienti da regioni ad alta incidenza rappresenta un problema crescente.¹⁸ Nei paesi sviluppati, Italia compresa, la mortalità legata a HBV e l'incidenza dell'HCC HBV-correlato ha subito una notevole riduzione negli ultimi anni grazie alle campagne di informazione, al miglioramento delle condizioni sociali e sanitarie e soprattutto all'introduzione della vaccinazione obbligatoria dal 1991, allo screening delle donne in gravidanza e l'eventuale somministrazione di profilassi anti-HBV ai nati da madri positive. Un ulteriore contributo è stato dato dalla sensibilizzazione della popolazione a riguardo del virus HIV, che condivide con HBV le stesse modalità di trasmissione.¹⁹⁻²¹

1.2.1.2 Fattori di rischio e prevenzione

L'infezione da HBV viene trasmessa per via parenterale, attraverso l'esposizione a sangue infetto e secrezioni corporee, ma può essere anche trasmessa per via verticale (da madre a neonato). La sterilizzazione inappropriata di strumenti sanitari, l'utilizzo di emoderivati e strumenti per dialisi contaminati e l'utilizzo di aghi infetti per la somministrazione di droghe endovenose rimangono le principali vie di trasmissione. Questi dati sottolineano l'importanza della prevenzione, ad esempio mediante lo screening dei donatori di sangue per l'HBsAg (un antigene superficiale di HBV utilizzato come marcatore di infezione), l'utilizzo di precauzioni in ambito sanitario, l'avvio di campagne d'informazione, lo screening, la vaccinazione degli adulti a rischio di esposizione e la futura vaccinazione universale per tutti i nuovi nati. Prevenire la trasmissione perinatale dell'HBV è cruciale, perché se nell'adulto il rischio di progressione dall'infezione acuta a cronica è basso, nell'infezione perinatale il rischio aumenta fino al 90%,^{19,22-25} con un conseguente elevatissimo rischio di sviluppo di malattia epatica cronica e carcinoma epatocellulare.²⁶

1.2.1.3 Storia naturale

Pur non essendo un virus citopatico diretto, HBV causa il danno a carico del parenchima epatico a seguito di una complessa interazione che il virus instaura con il sistema immunitario.^{25,27,28}

Generalmente l'infezione acuta è asintomatica o presenta lievi sintomi e poco specifici, specialmente in neonati e bambini, con un andamento subclinico, talvolta in forma di epatite itterica. La mancata guarigione dalla forma acuta predispone la transizione alla forma di epatite cronica (Figura 2), che si sviluppa in circa il 10% degli adulti e fino al 90% dei bambini.^{22,23,29} L'epatite fulminante è rara, ma è altamente letale in assenza di trapianto epatico.²⁵

La storia naturale della malattia (Figura 3) viene divisa in cinque fasi, mediante l'utilizzo di marcatori sierologici (HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe e anti-HBc IgM e IgG), virologici (HBV-DNA), biochimici (alanina amino-transferasi [ALT] e aspartato amino-transferasi [AST]) e istologici.

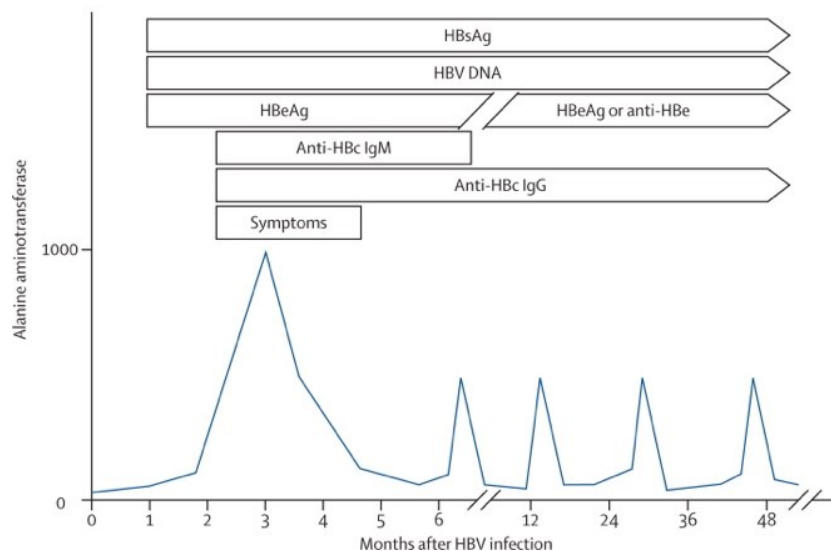


Figura 2: marcatori sierologici nella fase di transizione da epatite B acuta a epatite B cronica.²⁵

HBsAg è rilevabile nel siero dopo circa 2-10 settimane dall'esposizione all'HBV, prima ancora della comparsa dei sintomi e dell'aumento degli indici di epatocitolisi, e rimane positivo per tutta la fase acuta della malattia. In caso di guarigione si avrà la comparsa degli anticorpi anti-HBs, associati alla presenza di anticorpi anti-HBc; la sola presenza di anticorpi anti-HBs è indicativa di avvenuta vaccinazione. Nel caso invece di mancata guarigione e transizione nella fase cronica HBsAg continuerà a essere rilevabile. La presenza di HBV-DNA nel fegato e l'assenza di HBsAg nel siero invece indica una condizione detta infezione occulta.^{24,25,30}

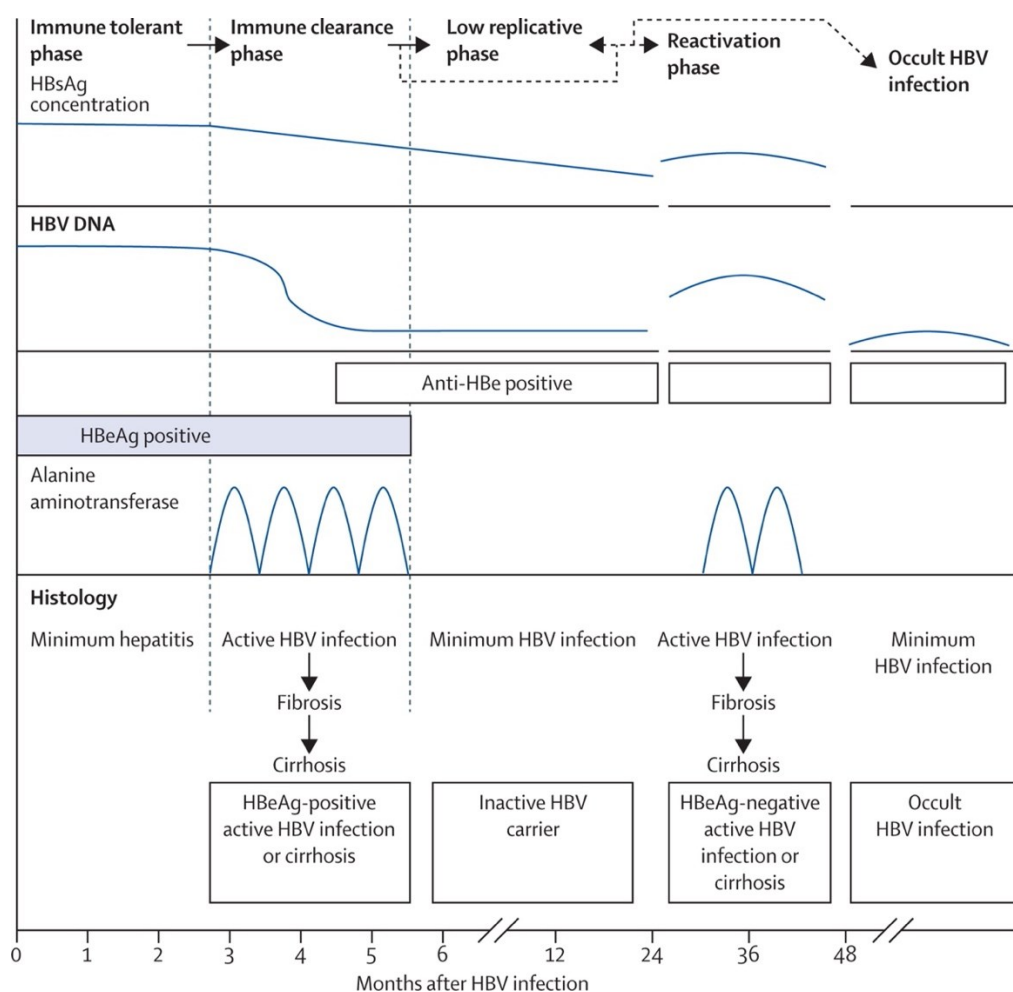


Figura 3: rappresentazione schematica delle fasi dell'epatite B cronica.²⁵

Quando l'infezione da HBV viene acquisita durante l'infanzia, la fase iniziale dell'infezione cronica (prima fase, immunotolleranza) è caratterizzata da elevati livelli di HBsAg, presenza di HBeAg, HBV-DNA molto alto (>20000 IU/mL), concentrazioni normali di ALT e minima infiammazione e fibrosi all'istologia.^{12,31,32} Questa fase può durare anche 20-40 anni con una progressione minima della malattia e un tasso di guarigione minimo. La seconda fase (epatite cronica immunoreattiva, HBeAg-positiva)³³ è caratterizzata da elevati livelli di HBV-DNA, da un aumento importante di ALT e da un quadro necroinfiammatorio o cirrotico all'istologia. Questi pazienti presentano un elevato rischio di progressione in HCC; tuttavia, può avvenire una sierconversione da HBeAg ad anti-HBe con remissione della malattia (stato di portatore asintomatico, terza fase), oppure progressione in epatite cronica anti-HBe positiva (quarta fase). La terza fase (portatore inattivo, HBeAg negativo) è caratterizzata

da un abbassamento di HBV-DNA e dal rientro nei limiti di norma della concentrazione di ALT. HBsAg è presente ma a basse concentrazioni. L'istologia epatica è normale o con un minimo grado di fibrosi.^{12,24}

Un paziente in questa fase può rimanere tale oppure può presentare una riattivazione della replicazione virale con ripresa della malattia epatica. Ecco perché i pazienti portatori inattivi devono essere monitorati nel tempo, non vengono trattati con terapia antivirale (a meno di uso di farmaci immunosoppressori) e devono evitare esposizione a fattori di rischio epatotossici come alcol e farmaci. La sierconversione dell'HBeAg prima dei 30 anni è associata a un minor rischio di comparsa di carcinoma epatocellulare e a una migliore sopravvivenza rispetto alla sierconversione in età più avanzata.^{34,35} Inoltre questi pazienti potrebbero guarire grazie alla comparsa di anticorpi anti-HBs e negativizzazione di HBsAg. Tanto più precoce è la comparsa degli anticorpi anti-HBs, migliore è la prognosi del paziente, con minor rischio di sviluppo di complicanze.³⁶⁻³⁹ I pazienti portatori inattivi che invece saranno soggetti a una ripresa di malattia si troveranno nella fase di epatite cronica HBeAg-negativa (quarta fase), caratterizzata da un processo necroinfiammatorio continuo o fluttuante, con periodi di remissione alternati a innalzamento di HBV-DNA e ALT, che andranno di pari passo al danno epatico. È la forma più comune di epatite cronica B (85% dei casi).^{24,25}

Circa il 25% dei pazienti con epatite cronica da HBV moriranno a seguito delle complicanze della cirrosi o a causa dello sviluppo di HCC.¹⁹ La maggior parte dei carcinomi epatocellulari correlati all'HBV si sviluppa nel fegato cirrotico, anche se circa il 20% si sviluppa in assenza di franca cirrosi.¹²

L'epatite B cronica, quindi, comprende un insieme di condizioni che spaziano dal paziente asintomatico, nel quale l'infezione viene scoperta accidentalmente, a seguito di esami eseguiti per altri motivi, al paziente che manifesta precocemente sintomi di scompenso e insufficienza epatica. Talvolta, inoltre, HBV può manifestarsi anche con una sintomatologia extraepatica, con quadri reumatologici (es. panarterite nodosa e vasculiti) o renali (es. glomerulonefriti membranosa e membranoproliferativa), dovute prevalentemente alla circolazione ematica di immunocomplessi.^{25,40,41}

Il rischio di progressione dell'epatite cronica da HBV a cirrosi ed eventualmente a epatocarcinoma è influenzato da numerosi fattori, in primis dai livelli di

replicazione virale, misurabile mediante i livelli di HBV-DNA.⁴² Altri fattori che possono accelerare il decorso della malattia sono l'età avanzata, il sesso maschile, un'anamnesi familiare positiva di cirrosi o HCC, l'etnia africana, la presenza di diabete e obesità, la coinfezione con HCV/HDV/HIV e un elevato consumo alcolico.^{24,43} In zone ad elevata endemicità il tasso di incidenza di HCC è stato di 0.2 per 100 persone-anno tra i portatori inattivi, di 1.0 nei soggetti con epatite B cronica ma senza cirrosi e di 3.2 nei soggetti con cirrosi compensata; l'incidenza cumulativa di HCC a 5 anni è stata del 15% tra quelli con cirrosi. In aree a bassa endemicità invece, l'incidenza di HCC è risultata essere 0.02 per 100 persone-anno nei portatori inattivi, 0.1 nelle persone con epatite B cronica senza cirrosi e 2.2 nelle persone con cirrosi compensata con un'incidenza cumulativa di HCC a 5 anni è stata del 10% nel gruppo di pazienti con cirrosi.⁴⁴

Un cambiamento radicale della storia naturale della malattia epatica HBV-correlata si è ottenuto con l'introduzione dei nuovi trattamenti antivirali nucleosidici (Lamivudina, Entecavir) e nucleotidici (Tenofovir). Questi farmaci presentano un notevole tasso di efficacia nella soppressione della replicazione virale, maggiore rispetto alla sola terapia con interferone e una maggiore tollerabilità, data la minore incidenza di effetti avversi (astenia, anoressia, sindrome simil-influenzale, mialgie nei casi lievi, importanti neutropenie e piastrinopenie in casi gravi) che talvolta imponevano un abbassamento di dose fino all'interruzione della terapia con interferone. Inoltre, anche se questi farmaci non sono in grado di eradicare l'infezione, come avviene invece per i nuovi farmaci per l'epatite C, si riesce ad ottenere una soppressione della replicazione virale, permettendo quindi di arrestare o rallentare notevolmente l'avanzamento della malattia e quindi l'instaurarsi della fibrosi (talvolta inoltre riescono a indurre anche una regressione) e della successiva cirrosi, garantendo ai pazienti quindi uno stato di portatore inattivo, asintomatico e senza rischio di progressione.^{45,46}

1.2.2 Epatite C

Il virus dell'epatite C (HCV) è un virus a RNA che appartiene alla famiglia dei Flavivirus. I bersagli naturali dell'HCV sono gli epatociti ma un probabile target è rappresentato dai linfociti B, il che potrebbe spiegare l'aumentata incidenza di

malattie linfoproliferative nei pazienti con epatopatia HCV-correlata. La replicazione avviene attraverso una RNA polimerasi RNA-dipendente, deficitaria di un sistema *proof-reading*, che rende HCV molto incline a mutazioni all'interno dell'ospite, che possono ostacolare l'effetto terapeutico dei farmaci.⁴⁷⁻⁴⁹

1.2.2.1 Epidemiologia

Nel 2009 è stato stimato che a livello globale, più di 200 milioni di persone fossero infette da HCV, prevalentemente in Asia e Nord Africa.⁵⁰ Poiché la maggior parte delle diagnosi avviene durante la fase cronica, l'epatite C rappresenta una delle principali cause di trapianto di fegato, rappresentando circa il 30% dei casi.^{51,52}

HCV è rappresentato da sei diversi genotipi, ognuno con una distribuzione geografica caratteristica: nelle regioni sviluppate, come Stati Uniti, Europa occidentale e Australia, prevalgono i genotipi 1a e 1b, seguiti dai genotipi 3 e 2; nei paesi in via di sviluppo invece prevalgono i genotipi 3 (soprattutto India e Pakistan), 4 (soprattutto in Egitto), 5 in Sud-Africa e 6 nelle regioni del Sud-Est Asiatico.⁵³ La determinazione del genotipo nel paziente affetto da epatite C è di estrema importanza in quanto il genotipo influenza la risposta alla terapia.^{48,54,55}

La diagnosi precoce di HCV e un'adeguata gestione terapeutica nei pazienti cronici possono prevenire queste complicanze e quindi migliorare la salute del paziente e ridurre la morbilità e la mortalità.^{48,56}

1.2.2.2 Fattori di rischio e prevenzione

Come nel caso del virus dell'epatite B, anche HCV si trasmette per via parenterale. I fattori di rischio maggiormente associati alla trasmissione dell'infezione sono l'uso di droghe iniettabili e la ricezione di una trasfusione di sangue prima del 1990, anno in cui è stato introdotto lo screening del sangue basato sulla rilevazione di anticorpi anti-HCV. Condizioni socioeconomiche precarie, rapporti sessuali non protetti e utilizzo di strumentazioni non sterilizzate in ambito sanitario sono collegati a un aumentato rischio di infezione.^{48,56} La trasmissione materno-fetale si verifica, ma è rara e spesso associata alla coinfezione con HIV-1 nella madre.⁵⁷

1.2.2.3 Storia naturale

Similmente all'infezione da HBV, l'infezione da HCV è raramente diagnosticata durante la fase acuta dell'infezione, che solitamente ha un decorso totalmente asintomatico o con lievi sintomi di tipo simil-influenzale.⁴⁸ L'epatite fulminante è stata descritta durante questo periodo, sebbene sia molto rara.⁵⁸ La risoluzione spontanea può verificarsi in circa il 15-25% dei pazienti nei primi 6 mesi di esposizione, e un altro 25% dei pazienti presenta un decorso benigno.⁵² Il resto sviluppa un'epatite cronica che ha un decorso imprevedibile e molto variabile. La fase cronica può avere una storia clinica molto lunga, alcuni studi indicano che solo il 2-3% dei pazienti evolverà in cirrosi nell'arco di 20 anni,^{59,60} mentre un altro studio indica che circa il 50% dei pazienti presenta cirrosi dopo 20 anni di malattia, con un 5% che presenta HCC.⁶¹ In due studi effettuati su pazienti donne che avevano ricevuto immunoglobuline anti-D contaminate da HCV è stato rilevato che nel 95% dei casi era riscontrabile alla biopsia infiammazione epatica, anche se nella maggior parte in forma lieve o moderata, e solo il 2% dei casi presentava cirrosi.⁶² Nonostante possa sembrare un dato rassicurante, è da tenere presente che HCV è una malattia ad alta prevalenza nella popolazione e che presenta numerose manifestazioni extraepatiche, in grado di determinare un abbassamento della qualità della vita anche in assenza di malattia epatica grave e cirrosi.^{63,64}

La storia naturale dell'epatite cronica C è influenzata da numerosi fattori intrinseci dell'individuo affetto, virali e ambientali.⁵² La maggior parte di questi non è modificabile: età avanzata, sesso maschile, predisposizione genetica, presenza di diabete e resistenza insulinica, carica virale e genotipo virale. Fattori modificabili sono invece l'obesità, la sedentarietà e abitudini voluttuarie quali l'abuso alcolico, il fumo e l'uso di cannabis.⁶⁵ L'alcol in particolare, che rappresenta di per se un agente epatollesivo, accelera la progressione del danno epatico causato da altri agenti eziologici, soprattutto se consumato in elevate quantità da individui affetti da epatite C.⁶⁶ Da svariati studi è emerso che i maschi sono più suscettibili delle donne allo sviluppo di fibrosi e cirrosi in caso di infezione da HCV, forse per un effetto inibente degli estrogeni sulla fibrosi.^{67,68} La coinfezione con il virus dell'epatite B determina un'importante accelerazione della progressione della malattia, problema però in gran parte ridotto grazie all'introduzione della vaccinazione.⁶⁹ Un problema emergente è legato invece alla coinfezione con

HIV, virus che presenta le stesse modalità di trasmissione di HCV. In tali soggetti, l'aumento dell'aspettativa di vita ottenuto grazie all'introduzione dei nuovi farmaci antiretrovirali, fa sì che HCV abbia a disposizione più tempo per manifestare le sue complicanze ed evolvere in cirrosi, facendo sì che al giorno d'oggi queste complicanze rappresentino la più frequente causa di morte nei soggetti con infezione da HIV. Inoltre, sembra che HIV possa in qualche modo accelerare e aggravare la progressione del danno epatico indotta da HCV.⁷⁰⁻⁷²

Una volta che la malattia cronica è evoluta in cirrosi, il rischio di carcinoma epatocellulare è di circa l'1-4% all'anno. Il carcinoma epatocellulare può verificarsi anche senza lo sviluppo cirrosi, ma è raro.⁵²

Oltre alla malattia epatica, vi sono importanti manifestazioni extraepatiche dell'infezione da HCV.^{63,64} La maggior parte di queste sindromi sono associate a stati autoimmuni o linfoproliferativi e sono correlate alla possibile interazione tra HCV e cellule linfoidi.^{49,73} Queste manifestazioni spaziano da quadri vasculitici associati a debolezza e artralgie⁷⁴ a casi più gravi caratterizzati dalla presenza di glomerulonefrite membranoproliferativa,⁷⁵ polineuropatie periferiche⁷⁶ e crioglobulinemia di tipo II,⁷⁷ della quale HCV ne rappresenta la causa principale. È stata osservata anche una maggiore incidenza di linfoma non-Hodgkin nell'infezione da HCV.^{78,79} Inoltre, HCV può essere causa di malattie ad interesse dermatologico come il lichen planus, la sindrome di Sjogren e la porfiria cutanea tarda⁸⁰⁻⁸² anche se non è ancora stato compreso con precisione il meccanismo patogenetico. Infine, diversi studi clinici hanno segnalato un aumento di patologie cardiovascolari come sindrome coronarica acuta, cardiomiopia dilatativa o ipertrofica e miocarditi causate sia dalla azione citotossica diretta del virus, sia da meccanismi immunomediati.⁸³⁻⁸⁵ Questo spettro di patologie correlate all'infezione di HCV influiscono negativamente sulla prognosi del paziente e sulla qualità di vita, indipendentemente dalla severità dell'interessamento epatico.

Similmente a quanto avvenuto per l'epatite B, anche nel caso dell'epatite C l'introduzione di nuovi farmaci avvenuta negli ultimi anni ha consentito un radicale cambiamento della storia naturale della malattia. Questi farmaci, definiti DAA (*Direct Acting Antiviral*) sono caratterizzati da un ottimo profilo di tolleranza e una bassa incidenza di effetti avversi rispetto alle vecchie terapie a base di interferone e ribavirina e presentano un'enorme facilità di assunzione e una migliore compliance da parte del paziente, essendo somministrati per via

orale. L'elevatissima efficacia terapeutica consente un'eliminazione completa e definitiva (eradicazione) della malattia nel 95% dei pazienti, consentendo quindi sia una risoluzione delle complicanze secondarie, sia l'arresto della progressione del danno epatico, in quanto viene eliminato l'agente eziologico responsabile di tutti i processi necroinfiammatori a carico del parenchima epatico. Inoltre, la completa eradicazione del virus permette un notevole vantaggio anche in prospettiva di un eventuale trapianto di fegato, consentendo al paziente di arrivare al trapianto stesso in assenza di malattia ed evitare quindi le recidive post-intervento, purtroppo assai comuni nell'era pre-DAA.⁸⁶

1.2.3 Steatosi Epatica e Steatoepatite Non Alcol-Correlata

NAFLD è un termine generico utilizzato per descrivere un continuum di condizioni epatiche che vanno da una semplice steatosi ("fegato grasso"), alla steatoepatite non alcolica (NASH), caratterizzata da steatosi epatica e necroinfiammazione epatocitaria, con o senza fibrosi.⁸⁷ Per poter diagnosticare la NAFLD è necessario escludere altre cause di danno epatico come farmaci, virus, processi autoimmunitari e, soprattutto, consumo significativo di alcol (>20g/die nella donna e >30g/die nell'uomo corrispondenti rispettivamente a 2 o 3 drink/die).⁴

1.2.3.1 Epidemiologia

Una metanalisi ha stimato che la prevalenza globale della NAFLD è circa il 25%, con dei picchi del 30% circa in regioni quali Medio Oriente e Sud America. Le previsioni indicano tuttavia che questa malattia subirà negli anni futuri un notevole incremento. La stessa metanalisi evidenzia come NAFLD/NASH siano patologie strettamente collegate a condizioni dismetaboliche come diabete, obesità, ipertrigliceridemia e dislipidemia,⁸⁸ con una prevalenza che tocca dei picchi del 70% nei pazienti con diabete di tipo due.⁸⁹ Sfortunatamente, la NAFLD viene sempre più diagnosticata anche nella popolazione adolescente, con tassi di prevalenza più che raddoppiati negli ultimi vent'anni.⁹⁰ Probabilmente, inoltre, la reale prevalenza globale di NAFLD è oggi sottostimata.⁸⁸

Tutto ciò è rilevante poiché NAFLD è spesso una malattia progressiva associata a complicanze significative come cirrosi, carcinoma epatocellulare (HCC) e

mortalità globale. La NAFLD sta rapidamente diventando l'indicazione più comune per il trapianto di fegato⁹¹ in stretta associazione con la crescente prevalenza di obesità e diabete nella popolazione.⁸⁸

1.2.3.2 Fattori di rischio e prevenzione

La NAFLD è una patologia complessa e multifattoriale, influenzata da numerosi fattori genetici e ambientali.^{92,93} La maggior parte degli studi è concorde sul fatto che la NAFLD sia una manifestazione epatica correlata alla sindrome metabolica,⁹⁴ ovvero una condizione clinica caratterizzata dalla presenza di obesità viscerale e alto BMI, ipercolesterolemia LDL e bassi livelli di HDL, ipertrigliceridemia, ipertensione arteriosa e resistenza insulinica.⁹⁵ Infatti, la prevalenza di NAFLD aumenta all'aumentare dell'indice di massa corporea (BMI), dal 25% nei soggetti con peso normale, al 67% nei soggetti sovrappeso e al 91% nei soggetti obesi.⁴ Inoltre la sindrome metabolica è causa di eventi cardiovascolari e mortalità nei pazienti con NAFLD, indipendentemente dalla gravità dell'interessamento epatico.⁹⁶

A causa delle comorbidità e delle complicanze associate, la NAFLD è una malattia con un pesante impatto sociosanitario, con elevati costi diretti e indiretti. Dati i numerosi fattori di rischio modificabili, la lotta a questa malattia deve iniziare dalla prevenzione primaria, adottando uno stile di vita sano, evitando diete ipercaloriche e praticando esercizio fisico.

1.2.3.3 Storia naturale e patogenesi

Anche se la steatosi epatica è asintomatica, possiede un rischio trascurabile di evoluzione in cirrosi e i pazienti presentano un'aspettativa di vita simile alla popolazione generale,⁹⁷ una piccola percentuale di soggetti con NAFLD può evolvere in NASH, la quale predispone il fegato a una possibile evoluzione in fibrosi e cirrosi, con annesse complicanze.⁹⁸

In uno studio, 147 pazienti che non presentavano evidenze ecografiche di NAFLD al basale, sono stati seguiti per 7 anni ed è stato notato che 28 di loro (19%) ha sviluppato NAFLD. Di questi, la maggior parte presentava in partenza sindrome metabolica o iperinsulinemia. Ancora più importante, durante il periodo di *follow-up*, i pazienti che hanno sviluppato NAFLD sono quelli con maggior incremento

ponderale, mentre tra i pazienti che presentavano NAFLD al basale e che dopo il *follow-up* risultavano guariti, la maggior parte presentava calo ponderale.⁹⁹ Anche altri studi hanno evidenziato associazioni simili tra l'aumento di peso e il successivo sviluppo della NAFLD.^{100,101} È stato inoltre dimostrato che la NASH sembra essere più prevalente e notevolmente accelerata in presenza di insulino-resistenza e di diabete mellito.¹⁰²⁻¹⁰⁴ La spiegazione è data dal fatto che con la presenza di insulinoresistenza si ha un aumento della produzione di glicerolo e di acidi grassi non esterificati (*Free Fatty Acids* [FFA]) dovuto alla mancata capacità dell'insulina di bloccare in maniera efficace la lipolisi e a causa dell'aumentata assunzione con la dieta, tipica del paziente con sindrome metabolica.^{105,106} Gli FFA vengono assorbiti dal fegato, il quale produce trigliceridi e lipoproteine a bassissima densità (VLDL).¹⁰⁷ Inoltre, i carboidrati in eccesso derivanti da una dieta ipercalorica stimolano la lipogenesi de novo, la quale costituisce un altro importante contributo all'aumento dei trigliceridi a livello epatico.^{105,108} I metaboliti degli FFA causano danno epatocellulare sotto forma di stress del reticolo endoplasmatico, disfunzioni mitocondriali con produzione di ROS e stress ossidativo, apoptosi, attivazione di citochine pro-infiammatorie, infiammazione, necrosi e caratteristiche dismorfiche come il rigonfiamento e la formazione dei corpi di Mallory-Denk.^{97,109} L'accumulo di lipidi a livello degli epatociti favorisce, in soggetti geneticamente predisposti, l'insorgenza di un danno epatico cronico, con attivazione delle cellule di Kupffer e delle cellule stellate epatiche, responsabili della formazione di fibrosi, *primum movens* della cirrosi epatica.¹¹⁰ Ulteriori conferme di queste ipotesi patogenetiche arrivano da studi che hanno utilizzato modelli murini alimentati con cibi ricchi di fruttosio e grassi trans. Rispetto ai controlli, che assumevano una dieta regolare, i topi del braccio sperimentale avevano incremento ponderale e presentavano all'istologia epatica accumuli di grasso già alle prime settimane. Dopo circa 16 settimane era presente una steatosi importante con un associato aumento degli indici di epatocitolisi.¹⁰⁸ Uno studio simile, eseguito su 12 uomini e 6 donne, ha evidenziato un aumento di peso, una progressiva steatosi ed elevazione di AST e ALT nei soggetti alimentati con dieta "*fast-food*" e combinata a uno stile di vita sedentario.¹¹¹ La progressione della NAFLD, attraverso l'infiammazione del parenchima epatico, lo sviluppo di fibrosi e la comparsa di cirrosi predispone il paziente a un elevato rischio di complicanze legate alla malattia cronica epatica e all'insorgenza

di epatocarcinoma.⁹⁸ In una coorte giapponese di pazienti con NAFLD con 12 anni di *follow-up*, il tasso cumulativo di HCC è stato dello 0.5%.¹¹² Nei pazienti con NASH, il tasso di incidenza cumulativo a 5 anni è stato del 7.6%. Un altro studio ha dimostrato come in 15 anni di *follow-up*, circa l'1% di pazienti NAFLD sia andato incontro a evoluzione in cirrosi, contro l'11% della controparte di pazienti NASH.¹¹³ Tali risultati sono stati confermati in una metanalisi che ha incluso 86 studi: i pazienti con steatosi epatica semplice avevano un'incidenza annuale di HCC di 0.44 per 1000 persone-anno, mentre i pazienti con NASH avevano un tasso di incidenza annuale di HCC di 5.29 per 1000 persone-anno.⁸⁸ Di fondamentale importanza è il fatto che in caso di NASH, l'HCC può insorgere anche in assenza di cirrosi epatica. È stato stimato che questo avvenga almeno nel 50% dei casi.^{114,115} Tuttavia, l'incidenza di HCC nei pazienti senza cirrosi è troppo bassa e il numero di pazienti da sorvegliare è troppo elevato per raccomandare la periodica sorveglianza di questi pazienti per lo sviluppo di tumore primitivo del fegato.¹¹⁶

Da non sottovalutare inoltre il pesante impatto di NAFLD in termini di complicanze extraepatiche, strettamente correlate alla sindrome metabolica e all'insulinoresistenza: nella stessa metanalisi⁸⁸ è stata evidenziata un'elevata prevalenza di obesità (51.3%), diabete di tipo 2 (22.5%), iperlipidemia (69.2%), ipertensione (39.3%) e sindrome metabolica (42.5%) nei pazienti con NAFLD.

I pazienti con NAFLD hanno anche una mortalità più elevata rispetto a quelli senza NAFLD. Uno studio che confrontava 420 pazienti con diagnosi di NAFLD ha rilevato una mortalità complessiva più elevata rispetto alla popolazione generale della stessa età e sesso.¹¹⁷ Dunn et al. hanno inoltre evidenziato come il sospetto di NAFLD sia un forte fattore di rischio per lo sviluppo di morte legata a eventi cardiovascolari.¹¹⁸ Un'altra metanalisi di 16 studi ha dimostrato che i pazienti NAFLD presentano un rischio elevato di eventi cardiovascolari fatali e non fatali rispetto ai pazienti senza NAFLD, e che la gravità della patologia è correlata alla gravità e alla frequenza di questi eventi.¹¹⁹

Questa enorme eterogeneità tra fattori di rischio, eventi patogenetici e complicanze, non solo epatiche, ha portato recentemente a riconsiderare il termine NAFLD. Per descrivere più correttamente questa patologia è stato proposto il termine MAFLD (*Metabolic Associated Fatty Liver Disease*) che si ritiene rifletta in modo più accurato le attuali conoscenze su tale patologia.¹²⁰

1.2.4 Steatosi Epatica e Steatoepatite Alcol-correlata

L'alcol rappresenta una delle più comuni cause di epatopatia cronica nella maggior parte dei paesi industrializzati, oltre a essere un problema sanitario globale con enormi conseguenze sociali ed economiche. Complessivamente, l'abuso alcolico è causa di circa il 20-25% dei casi di cirrosi epatica.¹²¹ Un elevato consumo di alcol è strettamente correlato con l'insorgenza di steatosi epatica, ma solo una minoranza (circa il 10%) dei pazienti progredisce in cirrosi.¹²²

La stima del consumo giornaliero di alcol può essere effettuata usando un'unità arbitraria denominata unità alcolica (UA) o drink. L'UA corrisponde a 12-13 g di etanolo puro, ed è contenuto in un bicchiere di vino da 125 ml, o in 330 ml di birra o in 40 ml di superalcolico. Il limite di assunzione giornaliera considerato accettabile è di massimo 20 g/die per le donne e 30 g/die per gli uomini.⁴

1.2.4.1 Epidemiologia

L'alcol è una delle maggiori cause prevenibili di malattia epatica. Secondo un rapporto W.H.O. nel 2012 l'alcol è stato causa di più di 3 milioni di morti nel mondo.¹²³ I maschi risultano più interessati da questo fenomeno. Oltre alla mortalità è necessario evidenziare il pesante impatto sociale dovuto all'abuso alcolico. Inoltre, un problema emergente degli ultimi anni è il coinvolgimento di giovani e adolescenti per quanto riguarda le epatopatie alcol-correlate, i quali tipicamente assumono alcol in una modalità definita *binge-drinking* (consumo di almeno 5 unità alcoliche in un breve lasso di tempo).¹²¹

1.2.4.2 Fattori di rischio

Il sesso femminile, l'obesità, la predisposizione genetica e il fumo di sigaretta possono favorire l'insorgenza di una malattia epatica alcol-correlata (ALD) e contribuire al rischio complessivo di sviluppare la steatoepatite alcol-correlata (ASH), la forma grave della malattia.¹²⁴ Inoltre, l'alcol interagisce sinergicamente con altri noti agenti causali di danno epatico come virus dell'epatite B o C e/o infezione da virus HIV, steatosi epatica non alcolica promuovendone la progressione e la severità del danno epatico.¹²⁵⁻¹²⁷ I più importanti fattori di rischio per lo sviluppo della malattia alcol-dipendente rimangono la durata

dell'esposizione e la quantità di alcol assunto, anche se non esiste un *cutoff* che possa predirne la comparsa.^{128,129}

1.2.4.3 Storia naturale e patogenesi

L'abuso di alcol può essere causa di danno epatico che va da condizioni lievi come la semplice steatosi a condizioni più gravi come l'epatite e la fibrosi, fino alla cirrosi conclamata e al conseguente elevato rischio di sviluppo di epatocarcinoma.¹³⁰ Anche se la steatosi è reversibile, la persistenza dell'assunzione e dell'abuso alcolico predispone il paziente a una progressione della malattia.¹³⁰ La cirrosi si verifica in circa il 10% dei pazienti¹³¹ ed è inizialmente micronodulare ma successivamente evolve in un quadro misto o macronodulare. L'epatocarcinoma si sviluppa tipicamente in questo contesto.¹³²

Il danno epatico causato dall'alcol è dovuto al fatto che il fegato è l'organo principale deputato alla detossificazione di numerose sostanze, tra cui l'alcol. I metaboliti dell'alcol (acetaldeide, acetato, esteri dell'etanolo e degli acidi grassi, addotti etanolo-proteine) sono in grado di creare un danno direttamente in loco, agendo come epatotossine.¹³³ L'alcol viene ossidato da enzimi come alcoldeidrogenasi (ADH) che trasforma l'alcol in acetaldeide e acetaldeide deidrogenasi (ALDH) che trasforma quest'ultima in acetato e NADH.¹²⁷ E' stato dimostrato che l'acetaldeide è un composto tossico in grado di promuovere processi pro-fibrotici e infiammatori nel fegato, ad esempio attivando il fattore di crescita trasformante (TGF)- β nelle cellule stellate epatiche (HSC)¹³⁴ e creando addotti immunogenici (malondialdeide) mediante un legame covalente con proteine, lipidi e DNA.¹³⁵⁻¹³⁸ L'incrementato rapporto NADH/NAD⁺ inoltre favorisce la sintesi di acidi grassi che contribuiscono allo sviluppo della steatosi.¹³⁹ L'ossidazione del NADH in eccesso richiede elevate quantità di ossigeno che verrà assorbito dal sangue arterioso, creando di fatto un insufficiente apporto di sangue ossigenato agli epatociti: ciò spiega il motivo per il quale la prima zona a evidenziare un danno ipossico è quella attorno alla vena centrolobulare (spazi perivenosi);¹²⁷ successivamente verranno coinvolte anche le zone intermedie fino ad arrivare agli spazi periportal. L'etanolo inoltre viene metabolizzato dal citocromo CYP2E1. Quest'ultimo subisce un processo di induzione, che lo rende resistente alla degradazione: questo spiega la tolleranza

agli effetti psicotropi dell'alcol presente in tali soggetti, che li porta ad assumere elevate quantità di etanolo, con un conseguente aumento anche dei metaboliti tossici e di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che oltre a essere responsabili dello stress ossidativo a livello epatico,¹³⁰ possono reagire ulteriormente con proteine e lipidi creando addotti immunogenici più voluminosi.¹⁴⁰ I ROS inoltre sono in grado di attivare fattori di trascrizione come NF- κ B¹⁴¹ e indurre un aumento di citochine pro-infiammatorie circolanti.¹³³

Un'ulteriore quota di acetaldeide viene prodotta dalla catalasi, che in condizioni di elevate assunzioni di etanolo partecipa alla sua ossidazione.^{124,133}

Ultimo ma non meno importante fattore che contribuisce allo sviluppo dell'infiammazione nell'epatopatia alcolica è il lipopolisaccaride (LPS) intestinale: l'alcol è in grado di danneggiare la barriera intestinale portando ad un aumento dei livelli di LPS circolante¹³⁰ che porta all'attivazione di NF- κ B e del fattore di necrosi tumorale (TNF)- α .^{142,143} Il TNF- α , a sua volta, peggiora ulteriormente la permeabilità intestinale, creando un circolo vizioso.¹⁴⁴

L'etanolo, inoltre, attiva geni che regolano enzimi lipogenici quali la sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c),¹³⁰ che favorisce la sintesi dei trigliceridi e l'accumulo nel citoplasma degli epatociti favorendo la steatosi.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

1.3 CIRROSI

La cirrosi è una malattia a lenta progressione, ampiamente diffusa in tutto il mondo, e rappresenta lo stadio comune e terminale delle malattie epatiche croniche, a prescindere dall'agente eziologico che ne è causa. Essa si sviluppa tipicamente attraverso processi infiammatori e pro-fibrotici a livello del parenchima epatico, nel quale l'alterata deposizione e l'accumulo di tessuto connettivale progressivamente ne impedisce un corretto funzionamento. Istologicamente il fegato cirrotico è caratterizzato dalla presenza di tessuto connettivo fibrotico e noduli rigenerativi, che si sviluppano in risposta al danno cronico a cui il fegato è sottoposto.¹⁴⁸ In base alle dimensioni dei noduli può essere classificata come micronodulare o macronodulare (noduli minori o maggiori di 3mm rispettivamente). La cirrosi micronodulare tipicamente origina su un contesto di epatopatia alcolica, mentre la cirrosi macronodulare ha tipicamente origine virale.⁴

1.3.1 Epidemiologia

Circa 2 milioni di decessi nel mondo ogni anno sono attribuibili a malattie del fegato e oltre il 60% di queste riguardano il sesso maschile. La cirrosi nel 2019 era l'undicesima causa di morte più comune, con un incremento rispetto al 2010 in cui rappresentava la tredicesima causa. È inoltre la terza causa di morte nelle persone di età compresa tra 45 e 64 anni e, insieme al cancro del fegato, rappresenta il 3,5% di tutti i decessi nel mondo.^{149,150} Non meno importante la cirrosi rappresenta un'importante causa di disabilità, dovuta alle sue complicanze epatiche ed extraepatiche.¹⁵¹

A livello globale, nel 2017, il 31.5% dei decessi nei pazienti di sesso maschile con cirrosi era correlato all'epatite B; il 25.5% era correlato all'epatite C; 27.3% erano correlati a malattie del fegato alcol-correlate; Il 7.7% era associato a steatoepatite non alcolica e l'8% è derivato da altre cause. I decessi causati da cirrosi associata a epatite B (24%) e malattie epatiche correlate all'alcol (20.6%) sono stati inferiori nelle donne; la proporzione relativa all'epatite C era simile (26.7%); e le proporzioni associate alla steatosi epatica non alcolica (11.3%) e ad altre cause (17.3%) erano più alte.¹⁵²

1.3.2 Fattori di rischio

Le cause principali di cirrosi sono le malattie croniche del fegato, rappresentate per la maggior parte da epatite cronica B (CHB), epatite cronica C (CHC), steatosi e steatoepatite non alcol-correlata (NAFLD/NASH) e alcol-correlata (ALD/ASH). Altre cause meno frequenti sono le epatiti autoimmuni, i disordini metabolici, cause iatrogene e vascolari. Il rischio di cirrosi alcol-correlata è strettamente associato alle abitudini di consumo.¹²⁹ Spesso la presenza di sindrome metabolica si sovrappone a un elevato consumo di alcol¹⁵³ e, allo stesso modo, in molti pazienti spesso l'abuso di alcol si sovrappone all'epatite cronica virus-correlata¹⁵⁴ andando a creare un aumento consistente del rischio di progressione della malattia. Essenziale è la mitigazione di questi fattori di rischio: nelle cause alcol-correlate è importante la cessazione del consumo alcolico, la perdita di peso nella NAFLD, la vaccinazione contro l'epatite B e il controllo o l'eradicazione della malattia nel caso dell'epatite C.¹⁵¹

1.3.3 Fisiopatologia della cirrosi

I meccanismi fisiopatologici alla base della cirrosi epatica sono la necrosi epatocitaria e la deposizione di tessuto fibrotico disorganizzato all'interno del parenchima, come meccanismo di risposta al danno epatico. Questo causa un'alterazione del microcircolo epatico che porta alla progressiva riduzione della massa epatica funzionante. Inoltre, queste alterazioni sono la base per lo sviluppo dell'ipertensione portale, evento cardine dello sviluppo di tutte le complicanze legate alla cirrosi epatica.⁸

Nelle epatopatie croniche, il perpetuarsi del danno verso gli epatociti attiva la proliferazione di cellule infiammatorie, cellule di Kupffer e piastrine che, a loro volta, liberano citochine: Interleuchina (IL)-2, IL-6, IL-1, TNF α e fattori di crescita come il platelet derived growth Factor- β (PDGF-B) e il TGF- β .¹⁴⁸ Queste citochine infiammatorie determinano un'attivazione delle cellule stellate epatiche (HSC)⁸ che da cellule adibite al deposito di vitamina A, acquisiscono un fenotipo simile ai fibroblasti e diventano cellule capaci di sintetizzare collagene.¹⁵⁵ Inizialmente la deposizione di collagene è limitata alle zone subendoteliali ed è causa della "capillarizzazione"¹⁵⁶ dei sinusoidi; progressivamente questo processo causerà una fibrosi estesa formando dei veri e propri setti porto-portali e porto-centrali, che inglobano gli epatociti in strutture nodulari disordinate, i noduli di rigenerazione.⁴ Al giorno d'oggi l'idea che la cirrosi sia una condizione irreversibile sta lentamente lasciando spazio a ipotesi di reversibilità. Tuttavia, il punto di non ritorno non è ancora stato identificato.¹⁵⁷ Sono già stati riportati casi di regressione in pazienti con cirrosi compensata,¹⁵⁸ ma la regressione in pazienti con cirrosi scompensata rimane un campo di ricerca in evoluzione. Esistono evidenze che suggeriscono che la fibrosi possa regredire con la terapia antivirale.¹⁵⁷ Numerosi studi, inoltre, si stanno concentrando sull'utilizzo della fibrolisi, operata da enzimi come le metalloproteinasi (MMP), con l'intento di controbilanciare e far regredire il processo di fibrosi.^{157,159-161}

1.3.4 Storia naturale

La malattia è tipicamente asintomatica nella fase iniziale ed è definita cirrosi compensata. A volte questa fase può essere diagnosticata casualmente tramite altri accertamenti. Con la comparsa delle complicanze dovute prevalentemente al

sovertimento della microcircolazione epatica e all'ipertensione portale (ascite e peritonite batterica spontanea, varici esofagee, encefalopatia, sindrome epatorenale e discoagulopatia) e alla disfunzione epatica si instaura la condizione definita cirrosi scompensata. Queste complicanze spesso portano a ospedalizzazione, ridotta qualità di vita ed elevata mortalità, stimata essere superiore di circa 5 volte rispetto alla popolazione generale.¹⁵¹ La presenza di cirrosi, fattori di danno epatico addizionali (dovute a epatite virale, indotta da farmaci o alcol-associata) o altre complicazioni (in particolare infezioni batteriche), possono portare a insufficienza epatica ed extraepatica, una condizione nota come insufficienza epatica acuta su cronica (ACLF)¹⁶² che è associata ad un'elevata mortalità a breve termine.^{148,151}

Secondo una stima del 2009, il tasso annuale di scompenso è di circa il 4% per l'HCV e del 10% per l'HBV. Nel caso della cirrosi alcolica questo rischio è direttamente proporzionale alla quantità e alla frequenza dell'assunzione alcolica. Si stima inoltre che la mortalità a 5 anni dei pazienti con cirrosi scompensata, in assenza di trapianto, sia intorno all'85% dei casi.¹⁴⁸ La sopravvivenza media di un paziente cirrotico dipende dalla precocità della diagnosi: con una diagnosi precoce, prima della comparsa delle complicanze, la sopravvivenza può essere anche molto superiore a dieci anni, mentre cala a circa due anni in caso di cirrosi scompensata. La persistenza dei fattori epatolesivi (l'infezione virale non trattata o la mancata cessazione dell'abuso alcolico) sono fattori che influiscono negativamente sulla prognosi del paziente.¹⁶³ È importante sottolineare che la cirrosi rappresenta il maggiore fattore di rischio per l'insorgenza del carcinoma epatocellulare (HCC).¹⁶⁴

Al giorno d'oggi il trattamento della cirrosi e delle sue complicanze consente un miglioramento della qualità di vita e un rallentamento della progressione della malattia, ma l'unico trattamento curativo rimane il trapianto di fegato.¹⁴⁸

La classificazione ancora oggi maggiormente utilizzata per ottenere una previsione della sopravvivenza media di un paziente cirrotico è quella di Child-Pugh (tabella I), basata su un punteggio calcolato in base alla presenza di encefalopatia e ascite e sui valori di bilirubinemia, albuminemia e INR.¹⁶⁵

Tabella I: Child-Pugh Score.¹⁶⁶

| Clinical and Lab Criteria | Points* | | |
|---|---------|--|------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Encephalopathy | None | Mild to moderate (grade 1 or 2) | Severe (grade 3 or 4) |
| Ascites | None | Mild to moderate (diuretic responsive) | Severe (diuretic refractory) |
| Bilirubin (mg/dL) | < 2 | 2-3 | >3 |
| Albumin (g/dL) | > 3.5 | 2.8-3.5 | <2.8 |
| Prothrombin time | | | |
| Seconds prolonged | <4 | 4-6 | >6 |
| International normalized ratio | <1.7 | 1.7-2.3 | >2.3 |
| Child-Turcotte-Pugh Class obtained by adding score for each parameter (total points) | | | |
| Class A = 5 to 6 points (least severe liver disease) | | | |
| Class B = 7 to 9 points (moderately severe liver disease) | | | |
| Class C = 10 to 15 points (most severe liver disease) | | | |

Sulla base del punteggio raggiunto, i pazienti sono suddivisi in tre classi: la sopravvivenza a cinque anni dei pazienti in classe A è intorno al 75%; quella dei pazienti in classe B è del 40%; quella dei pazienti in classe C intorno al 20%. Più recentemente è stato proposto un nuovo punteggio denominato Model for End stage Liver Disease (MELD) basato su un calcolo che include valori di bilirubinemia, creatininemia e INR. Questo punteggio viene utilizzato per stratificare i pazienti in attesa di trapianto di fegato, sulla base della severità della malattia.¹⁶⁵

1.3.5 Ipertensione portale

Il sistema portale è un sistema venoso, adibito al drenaggio del sangue dagli organi addominali verso il fegato, caratterizzato da un'elevata portata e una bassa resistenza. Il sangue dal fegato raggiunge la vena cava inferiore tramite le vene sovraepatiche e successivamente si immette nel circolo sistemico. Negli ultimi decenni sono stati fatti molti progressi nella comprensione della fisiopatologia dell'ipertensione portale. Il fattore scatenante principale è il sovrvertimento della normale struttura del parenchima epatico causato dalla cirrosi: l'apposizione di tessuto fibrotico e la formazione dei noduli rigenerativi, la capillarizzazione dei sinusoidi e la contrazione delle cellule muscolari lisce vascolari (VMSC) e delle HSC, favorita dalla presenza di vasocostrittori (es. endotelina) provoca un aumento della resistenza vascolare intraepatica. Inoltre, esiste anche una componente vasodilatatoria a livello splancnico, causata dalla presenza di vasodilatatori (es. ossido nitrico) che porta a un'ipocontrattilità

vascolare che causa un aumento del flusso ematico nei vasi splanchnici, con un conseguente aumento compensatorio della gittata cardiaca, dovuto all'aumentato ritorno venoso, condizione denominata circolazione iperdinamica.¹⁶⁷ L'eccessiva vasodilatazione provoca l'attivazione di un altro sistema di compenso fisiologico, il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAA), con conseguente stimolo sodioritentivo: l'ipervolemia secondaria dovuta ai meccanismi di compenso non sarà comunque sufficiente a compensare il quadro di ipovolemia relativa, ma favorirà l'instaurarsi di un circolo vizioso che aggrava l'ipertensione portale stessa.^{9,168-170}

Clinicamente l'ipertensione portale è definita come un aumento sostenuto del gradiente di pressione tra la circolazione portale e sistemica. Il parametro più comune utilizzato per misurare la pressione portale è il gradiente di pressione venosa epatica (HVPG), che rappresenta la differenza di pressione tra la vena porta e la vena cava inferiore. Negli individui sani, l'HVPG normale è 1-5 mmHg. Nella cirrosi compensata, un HVPG tra 6-10 mmHg è segno di una lieve ipertensione portale che non presenta sintomi o complicanze, mentre l'ipertensione portale diventa clinicamente significativa quando l'HVPG supera i 10 mmHg. La cirrosi scompensata è caratterizzata da un HVPG superiore a 12 mmHg, ed è caratterizzata tipicamente dallo sviluppo di shunt porto-sistemici, rottura delle varici esofagee e sanguinamento.¹⁷⁰ L'HVPG è una valutazione quantitativa, ma ci sono altri indicatori di ipertensione portale, tra cui la presenza di varici all'endoscopia, la presenza di splenomegalia, ascite e caput medusae, nonché positività all'imaging (ecografia, tomografia computerizzata e risonanza magnetica).¹⁶⁸

La maggior parte delle complicanze che si verificano nella malattia epatica cronica sono dovute all'ipertensione portale e definiscono la transizione del paziente dalla fase cirrotica compensata alla cirrosi scompensata. Tali complicanze sono la formazione e il successivo sanguinamento da varici esofagee, la gastropatia congestizia, la formazione di ascite e l'encefalopatia. Complicanze meno frequenti, ma ugualmente temibili, sono la peritonite batterica spontanea, la sindrome epatorenale, la coagulopatia e la trombosi portale.^{148,151} Queste complicanze determinano un deterioramento delle condizioni cliniche del paziente con una drastica diminuzione della sopravvivenza mediana da circa 10-12 anni a circa 2 anni.¹⁶³

1.3.6 Ascite

L'ascite è la complicanza più comune dell'ipertensione portale: i dati indicano che circa il 50% dei pazienti cirrotici sviluppa ascite nell'arco di 10 anni.¹⁷¹

Sono stati proposti due diversi meccanismi per spiegare la formazione di ascite e edema nella cirrosi. Il primo meccanismo (Teoria dell'overflow) suggerisce che esista un difetto renale primario nell'escrezione di sodio che provoca ipervolemia e riduzione delle resistenze vascolari sistemiche con aumento compensatorio della gittata cardiaca come tentativi di compenso della circolazione sistemica all'aumentata ritenzione di liquidi.¹⁷² Il liquido in eccesso uscirà dal compartimento vascolare verso lo spazio interstiziale con formazione di ascite e edema. Il secondo meccanismo (Teoria della vasodilatazione arteriosa) suggerisce che la ritenzione di sodio non sia un evento primario, ma una risposta fisiologica del rene ad una ipovolemia secondaria alla vasodilatazione arteriosa splancnica. La maggior parte dei dati attualmente disponibili sulla cirrosi umana e sperimentale supportano quest'ultimo meccanismo di formazione dell'ascite.^{173,174}

Nel 20% dei casi l'ascite è causata da un'ipertensione portale in assenza di cirrosi: nei paesi occidentali, i tumori e le malattie cardiache sono le cause predominanti, mentre i paesi in via di sviluppo sono principalmente interessati dalle malattie infettive, tra cui la tubercolosi è la causa principale.¹⁷⁵

Il principale sintomo dell'ascite è il disagio avvertito dal paziente, dovuto al gonfiore addominale e all'edema degli arti inferiori. In alcuni casi l'accumulo di liquidi è così importante da compromettere la funzione respiratoria e l'attività fisica. Pertanto, l'obiettivo del trattamento dell'ascite e dell'edema nella cirrosi è ridurre il disagio del paziente e migliorarne la qualità di vita. Clinicamente l'ascite si classifica in tre gradi: I grado se lieve e visibile solo all'ecografia, II grado se rilevabile all'esame obiettivo con la presenza di ottusità mobile alla percussione, III grado se visibile direttamente all'ispezione e confermata dal segno del frotto positivo.⁴ Inoltre, si definisce refrattaria un'ascite che non è responsiva ad elevate dosi di terapia diuretica.¹⁷⁶

L'aspirazione del liquido ascitico (paracentesi) e la sua analisi di laboratorio è un esame obbligatorio nel paziente ascitico, prima di intraprendere qualsiasi terapia. In primo luogo, va valutato il gradiente di albumina siero-ascitico (SAAG): un valore superiore a 1,1 g/dL (o 11 g/L) è in grado di differenziare l'ascite dovuta

alla cirrosi dall'ascite secondaria ad altre cause.^{177,178} In secondo luogo va valutata la concentrazione proteica del liquido ascitico: valori inferiori a 1,5g/dL rappresentano un fattore di rischio per l'insorgenza di peritonite batterica spontanea (PBS). La PBS è un'infezione batterica del liquido ascitico causata da una traslocazione di microrganismi di origine enterica, in assenza di cause intra-addominali. Nel paziente cirrotico è presente un'alterazione delle barriere mucosali intestinali, associata a una ridotta efficienza del sistema immunitario. La causa più comune di SBP sono i batteri Gram-negativi, come le specie *Escherichia coli* e *Klebsiella*, ma le infezioni da batteri Gram-positivi sono in aumento. La diagnosi di SBP è confermata quando la conta dei neutrofili ascitici è >250 cellule/mm³.^{176,179} La prevalenza della PBS nei pazienti ambulatoriali è dell'1,5-3,5% e di circa il 10% nei pazienti ospedalizzati.¹⁸⁰ La PBS è una complicanza pericolosa e potenzialmente letale, con una mortalità stimata del 20-40% a 50 giorni,¹⁸¹ che richiede una diagnosi precoce e un trattamento tempestivo. Tuttavia, la sopravvivenza a lungo termine rimane scarsa: in uno studio inglese la sopravvivenza a 1 anno è risultata essere del 34%.¹⁸²

1.4 CARCINOMA EPATOCELLULARE

1.4.1 Epidemiologia

Il carcinoma epatocellulare rappresenta l'80% dei tumori del fegato. Con 782000 casi diagnosticati e 746000 decessi nel 2012, il carcinoma epatocellulare è classificato come la quinta neoplasia più comune e la quarta causa di morte per cancro, ma si stima che in futuro la sua prevalenza tenderà ad aumentare.¹⁶⁴

Dal 2008 al 2012, secondo il National Cancer Institute Surveillance Epidemiology, il tasso di incidenza annuale è aumentato del 3.1% all'anno. Allo stesso modo, i tassi di mortalità sono aumentati del 2.8% e del 3.4% all'anno rispettivamente negli uomini e nelle donne. Inoltre, le persone nate tra il 1945 e il 1965 hanno avuto la più alta incidenza e tassi di mortalità data l'elevata prevalenza di HCV.¹⁸³

Gli uomini sono più esposti al rischio di sviluppare HCC rispetto alle donne, specialmente nelle regioni ad alta incidenza con un rapporto da 3.7:1,¹⁸⁴ forse per un effetto protettivo degli estrogeni.⁶⁸ L'HCC tende a manifestarsi più tardivamente in Giappone, Nord America e paesi europei, dove l'età mediana di

insorgenza è superiore ai 60 anni. Al contrario, in Cina, l'HCC viene comunemente diagnosticato in età più giovane, riflettendo forse la trasmissione madre-neonato di HBV, virus endemico in tale regione.¹⁸⁵ Tuttavia in queste regioni la vaccinazione contro HBV in tutti i nuovi nati sta già dando i primi risultati.¹⁸⁶ La sopravvivenza mediana varia in base alla regione considerata, influenzata dall'efficacia del sistema sanitario e dalla precocità della diagnosi, grazie a programmi di screening delle persone a rischio e al trattamento con tecniche avanzate, non attuabile nei paesi in via di sviluppo.¹⁸⁵

1.4.2 Fattori di rischio

La cirrosi di qualsiasi eziologia aumenta il rischio di HCC, soprattutto se dovuta a epatite C (HCV), epatite B (HBV), steatosi epatica non alcolica (NAFLD). Le cause preponderanti sono tuttavia le epatiti croniche causate da HBV e HCV, che insieme causano circa l'80% di HCC nel mondo.³ L'epatite cronica da HCV è responsabile di oltre un terzo dei casi di HCC negli Stati Uniti, con oltre il 90% di pazienti cirrotici al momento della diagnosi.^{187,188} Fattori di rischio aggravanti sono l'età avanzata, il sesso maschile, la coinfezione da HBV o HIV, il consumo di alcol, il diabete mellito, mentre una riduzione del rischio è ottenibile con l'eradicazione dell'infezione mediante terapia farmacologica.^{189,190} Tuttavia, l'eradicazione deve avvenire prima della comparsa di cirrosi, altrimenti il rischio di progressione in HCC persiste.¹⁹¹ L'epatite cronica da HBV presenta un rischio di insorgenza di HCC anche in assenza di cirrosi, sebbene il 70-90% degli HCC sia diagnosticato nei cirrotici. Il rischio di comparsa di HCC è aumentato con la coinfezione da HCV o HDV e con una storia familiare di HCC.¹⁹² Come per HCV, un trattamento farmacologico efficace riduce notevolmente il rischio di comparsa di HCC, specie quando vengono utilizzati i farmaci di ultima generazione.¹⁹³ La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è oggi la causa maggiore di malattia epatica nei paesi sviluppati e un importante fattore di rischio per l'HCC.⁸⁸ Considerando i fattori di rischio e la patogenesi della malattia sottostante all'HCC, tipicamente nei pazienti con NAFLD il tumore si manifesta in età più avanzate rispetto alle altre eziologie.¹⁹⁴ Come per HBV, anche l'HCC associato a NAFLD si verifica frequentemente in assenza di cirrosi.^{121,195} La cirrosi alcolica è il secondo fattore di rischio più comune per l'HCC negli Stati

Uniti e in Europa.¹⁹⁶ Le aflatossine sono micotossine con forti effetti epatocarcinogeni che contaminano molti cereali di base e semi oleosi. La contaminazione da aflatossine è molto diffusa nelle aree dove HBV è endemico, come Asia e Africa.¹⁹⁷ Altre cause più rare di HCC sono le malattie biliari croniche, le malattie genetiche e metaboliche del fegato.³

1.4.3 Carcinogenesi

La patogenesi dell'HCC è complessa ed è caratterizzata da numerosi eventi molecolari che influiscono sulla regolazione del ciclo cellulare, sull'instabilità cromosomica, sulla metilazione del DNA, sulla transizione epitelio-mesenchimale (EMT), sulla deregolazione delle cellule staminali e su numerose alterazioni a carico dei microRNA (miRNA).¹⁹⁸ Nonostante i meccanismi di danno epatico che portano progressivamente alla comparsa di HCC siano differenti a seconda dell'agente eziologico, la sequenza classica di progressione è l'infiammazione epatica conseguente all'insulto lesivo, la fibrosi che successivamente evolve in cirrosi e lo sviluppo del tumore. Le cellule danneggiate o necrotiche rilasciano nel microambiente mediatori molecolari come i Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) mentre ad esempio le cellule virali possono rilasciare i Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs): queste molecole sono in grado di attivare una risposta immunitaria innata mediante l'attivazione dei Pattern Recognition Receptors (PRR) tra cui il recettore Toll-Like (TLR), i recettori della lectina di tipo C, recettori simili al dominio di oligomerizzazione legante i nucleotidi (NOD). Primariamente si avrà una risposta infiammatoria acuta, che è reversibile una volta eliminata la causa del danno, ma se ciò non avviene l'infiammazione cronicizza ed è la causa della progressione in fibrosi e cirrosi.¹⁹⁹

Numerose mutazioni genetiche e modificazioni epigenetiche sono state riscontrate nell'epatocarcinoma. La mutazione somatica più frequente riguarda il promotore di TERT, gene che regola l'espressione e la riattivazione della telomerasi²⁰⁰, ma mutazioni altresì molto frequenti nell'HCC riguardano i geni CTNNB1, codificante per β -catenina (un protooncogene nella via di segnalazione del WNT), mutazioni inattivanti TP53 (regolatore del ciclo cellulare). Le mutazioni di CTNNB1 sono state associate a tumori causati da HCV e HBV, di grandi

dimensioni, poco differenziati, con tendenza all'invasione e alla metastasi.²⁰¹ Oltre a CTNNB1, altri geni coinvolti nella pathway di WNT, come AXIN1, AXIN2 e APC possono essere mutati nell'HCC.²⁰² Recentemente sono state scoperte mutazioni di ARID1A e ARID2, implicati nel rimodellamento della cromatina e tendenzialmente associati agli HCC ad eziologia non virale.²⁰³ Correlata all'HCC su NASH è anche la mutazione del gene CULLIN7.²⁰² Purtroppo, nonostante i progressi della ricerca in questo campo, nessuna delle classificazioni molecolari di HCC è in grado di predire la prognosi o il rischio di recidiva del tumore. L'unica strategia efficace è la prevenzione primaria, ovvero l'eliminazione dei fattori di rischio epatolesivi. Un primo passo potrebbe essere la vaccinazione contro HBV nei neonati, purtroppo ancora carente in molti paesi.²⁰⁴ La vaccinazione contro HCV non è attualmente possibile, ma le precauzioni atte a ridurre al minimo la possibilità di infezione (screening degli emoderivati, l'uso di dispositivi sanitari monouso e la sterilizzazione degli strumenti chirurgici e odontoiatrici) sono molto importanti.³ Inoltre i nati tra il 1945 e il 1965 sono considerati ad elevato rischio di positività per HCV ed è raccomandato lo screening.²⁰⁵ Mantenere uno stile di vita sano ed evitare i fattori di rischio come alcol, fumo, obesità sono strategie aggiuntive per la prevenzione dell'HCC. Ridurre al minimo l'esposizione alimentare alle aflatossine è un passaggio cruciale per ridurre il carico di HCC nelle aree con un elevato carico endemico.²⁰⁶

1.4.4 Stadiazione e prognosi

Un adeguato sistema di stadiazione di un tumore dovrebbe definirne la prognosi e guidare la scelta terapeutica in modo da trattare opportunamente ogni diverso stadio. La prognosi dei pazienti con HCC è determinata non solo dall'estensione tumorale, ma anche dalla funzionalità epatica residua (in considerazione dell'insorgenza nella maggior parte dei casi in pazienti con malattie croniche di fegato) e dalle condizioni cliniche del paziente.^{207,208} Per tale ragione, il sistema TNM non è adatto alla stadiazione dei pazienti con HCC poiché considera solamente il carico tumorale. Numerosi sistemi di stadiazione sono stati proposti nel tempo, sia dal mondo asiatico che da quello europeo/nordamericano, per stimare la prognosi dei pazienti con carcinoma epatocellulare, come il sistema di stadiazione Okuda, oggi ormai in disuso; lo *score* CLIP, con un ottima efficacia

prognostica, ma poco sensibile nella stratificazione degli stadi precoci di HCC; lo *score* JIS, utilizzato quasi esclusivamente in Giappone, combina il sistema TNM allo *score* Child-Pugh; lo *score* MESH, il quale ha ricevuto una convalida esterna nei paesi nordamericani/europei ma non propone raccomandazioni terapeutiche.²⁰⁹

Il sistema di stadiazione correntemente raccomandato dalle linee guida Europee ed Americane è il sistema BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer). Questo classifica l'HCC in cinque stadi, guidando anche la scelta terapeutica (Figura 4). Uno degli svantaggi del sistema BCLC è la sostanziale eterogeneità del carico tumorale, della gravità della disfunzione epatica e della prognosi nei pazienti con carcinoma epatocellulare in stadio intermedio (stadio BCLC B) o avanzato (stadio BCLC C). Numerosi ricercatori hanno cercato di perfezionare il sistema BCLC sottoclassificando BCLC stadio B in alcune sottocategorie. I pazienti con carcinoma epatocellulare in stadio molto precoce (BCLC 0) e in stadio iniziale (BCLC A) presentano una lesione solitaria o fino a tre noduli di diametro inferiore a 3 cm (senza invasione macrovascolare o diffusione extraepatica) e funzionalità epatica preservata. Questi pazienti possono trarre beneficio dalla resezione, dal trapianto o dall'ablazione e per ciascuna di queste opzioni la prognosi può essere affinata in base a diversi parametri. I pazienti con carcinoma epatocellulare in stadio intermedio (BCLC B) non presentano sintomi, ma hanno grandi tumori multifocali senza invasione vascolare o metastasi. Se la funzionalità epatica fosse preservata, questi pazienti potrebbero essere candidati alla chemioembolizzazione transarteriosa. I pazienti con malattia in stadio avanzato (BCLC C) hanno una o più delle seguenti caratteristiche: tumori metastatici, invasione vascolare e sintomi lievi correlati al cancro. In questo stadio è raccomandato il trattamento con terapia sistemica. Infine, i pazienti con malattia allo stadio terminale (BCLC D) hanno una scarsa funzionalità epatica o marcati sintomi correlati al cancro. Questi pazienti non sono candidati al trapianto perché hanno una prognosi sfavorevole e richiedono invece cure di supporto.^{164,207}

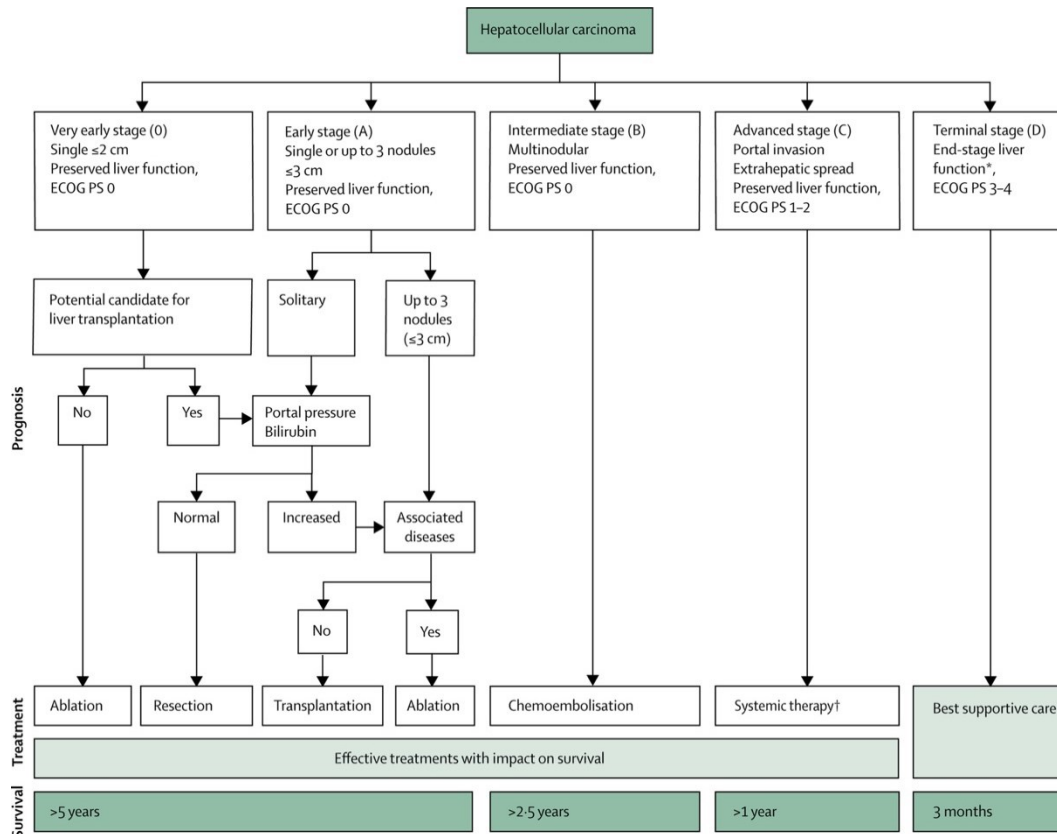


Figura 4. Sistema di stadiazione BCLC e trattamento del cancro al fegato in base allo stadio.¹⁶⁴

Un altro sistema di stadiazione, utilizzato soprattutto nel mondo orientale, è il CNLC: presenta molte somiglianze con il sistema BCLC ma propone strategie terapeutiche più aggressive per gli stadi avanzati di HCC. Un ulteriore sistema prognostico e di stadiazione più recente, creato nel 2016, è l'ITA.LI.CA. *staging system*: questo sistema richiama la classificazione BCLC relativamente alla stratificazione delle caratteristiche del tumore nei diversi stadi, ma fornisce una migliore definizione dello stadio intermedio, che viene diviso in tre sottogruppi. Questo *score* tiene conto del numero di noduli, del loro diametro, dell'invasione vascolare intraepatica, della classe Child-Pugh, delle condizioni generali del paziente (ECOG) e dei livelli di AFP. È stato appurato che il punteggio ITA.LI.CA. ha prestazioni migliori rispetto ad altri punteggi nei pazienti sottoposti a ristadiatione dovuta alla recidiva di HCC e prima delle decisioni terapeutiche.²¹⁰ Inoltre, il sistema prognostico ITA.LI.CA. può anche essere convertito in una semplice stadiazione ITA.LI.CA. al fine di guidare la scelta terapeutica.²¹¹ In conclusione, ITA.LI.CA. ha mostrato una notevole efficacia prognostica nei pazienti con carcinoma epatocellulare, superiore a quella di altri

sistemi prognostici, anche se un possibile *bias* potrebbe essere dovuto al fatto che il confronto è stato effettuato sulla popolazione da cui è stato generato ITA.LI.CA. stesso.²⁰⁹

1.5 VALUTAZIONE DELLA FIBROSI EPATICA: TEST NON INVASIVI

Il *gold standard* per la valutazione della fibrosi epatica è la biopsia, che consente sia una diagnosi in termini di estensione di malattia (*grading*) che in termini di gravità della fibrosi (*staging*). Essendo però un test invasivo non scevro di rischi, non è attuabile come screening o come test di prima linea. A questo proposito esistono dei test, per l'appunto non invasivi, che permettono di stimare la fibrosi epatica attraverso vari parametri. Questa stima permette quindi di valutare l'andamento della malattia epatica cronica, la quale gravità sarà proporzionale alla deposizione di collagene nel parenchima epatico, e quindi alla fibrosi.^{212,213} I test non invasivi si basano su un approccio strumentale (Fibroscan, ecografia addominale) oppure su un approccio laboratoristico utilizzando parametri ematochimici.

1.5.1 Fibroscan

L'elastografia (Fibroscan) è una nuova tecnica utilizzata per la valutazione non invasiva della fibrosi epatica. Questa tecnica prevede l'uso di un trasduttore all'estremità di una sonda US (*ultrasound*) che trasmette vibrazioni a bassa frequenza attraverso il tessuto epatico. La velocità della risultante "*shear wave*" ovvero l'onda che si propaga attraverso il tessuto epatico è misurata dal sistema US. La velocità dell'onda è correlata alla *stiffness* epatica, fornendo così una stima della fibrosi, espressa in kPa. Più aumenta la *stiffness*, più veloce sarà l'onda registrata e quindi maggiore il valore espresso in kPa.²¹²

1.5.2 Ecografia Addominale

L'ecografia (US) è diventata una modalità consolidata per la diagnosi non invasiva della cirrosi. La progressione della fibrosi nei pazienti con malattia epatica cronica viene rilevata ecograficamente attraverso cambiamenti caratteristici (es. un aspetto grossolano o nodulare del parenchima, epatomegalia e ipertrofia del lobo caudato).²¹⁴ L'ecografia può anche rilevare lo sviluppo

dell'ipertensione portale misurando il diametro della vena porta, la velocità del flusso, l'inversione del flusso, l'ascite e la splenomegalia.²¹⁵

1.5.3 Test ematochimici

I principali test non invasivi basati su parametri ematochimici sono:

-APRI: AST-Platelet Ratio Index [APRI = (AST/limite superiore della norma) *100/conta piastrinica] è un pannello di biomarcatori semplice e facilmente disponibile per la stima della fibrosi. I valori di APRI aumentano poiché l'ipertensione portale indotta da fibrosi determina una diminuzione della conta piastrinica. Questo test viene usato principalmente in caso di eziologia da HCV.²¹²

-FIBROTEST: è un pannello di biomarcatori brevettato che utilizza 5 marcatori biochimici (alfa-2 macroglobulina, aptoglobina, bilirubina totale, apolipoproteina-A, gamma glutamil-transferasi [GGT]) e 2 parametri clinici (età e sesso). Utilizzando un algoritmo questi biomarcatori vengono combinati per produrre un valore numerico compreso tra 0.0 e 1.0. Il punteggio risultante è correlato agli stadi della fibrosi di METAVIR (F0, F1, F2, F3, F4).²¹²

-FIB4: è un pannello di biomarcatori che utilizza età, AST, conta piastrinica e ALT [FIB4 = (età*AST)/(Piastrine*√ALT)]. È stato convalidato in NAFLD e NASH. Tuttavia, il test si basa su valori di cutoff per escludere o prevedere la fibrosi avanzata e i pazienti con valori intermedi richiedono test aggiuntivi di valutazione della fibrosi.^{216,217}

1.6 MICRO-RNA

1.6.1 Generalità e biosintesi

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA non codificanti a singolo filamento, di circa 19-24 nucleotidi, che regolano l'espressione genica legandosi a specifici bersagli di mRNA e promuovendone la degradazione e/o l'inibizione della traduzione in proteine.²¹⁸

Nel genoma umano si stima siano presenti più di 700 geni codificanti miRNA, rappresentando l'1-4% dei geni espressi.²¹⁹ I miRNA controllano un'ampia gamma di processi biologici, come la differenziazione cellulare, la proliferazione e l'apoptosi. In numerosi tumori umani sono state riscontrate espressioni aberranti di diversi tipi di miRNA, i quali possono essere sia up-regolati che down-regolati

rispetto alle cellule sane, figurando quindi come dei veri e propri geni oncosoppressori o oncogeni.^{220,221}

Numerosi studi hanno rilevato che i miRNA sono stabili nel siero e nel plasma, perciò facilmente rilevabili.^{222,223} Nel caso dell'HCC, i miRNA potrebbero risultare particolarmente utili in quanto spesso l'HCC viene diagnosticato in una fase in cui la resezione curativa non è più attuabile a causa di metastasi intra ed extraepatiche.²²⁴ L'identificazione di nuovi biomarcatori è quindi auspicabile.

La pathway biogenetica dei miRNA è complessa e include due separati eventi, il primo nel nucleo cellulare e il seguente nel citoplasma: i geni dei miRNA, sono trascritti dalla RNA Polimerasi II, che genera un precursore pri-miRNA di circa 100-1000 nucleotidi di lunghezza. All'interno del nucleo, il complesso proteico RNasi III Drosha riconoscendo una struttura secondaria "*stem-loop*" del pri-miRNA, attua un'escissione e rilascio di un filamento "*hairpin*" di circa 70 nucleotidi, denominato pre-miRNA. Infine, il pre-miRNA viene esportato al di fuori del nucleo da un complesso proteico (Exportina-5/Ran-GTP) che riconosce specificatamente RNA a doppio filamento. Una volta nel citoplasma il pre-miRNA, associato a un enzima chiamato Dicer e ai suoi co-fattori, viene processato con la formazione di un *duplex* miRNA-miRNA* di circa 22 nucleotidi di lunghezza. Il risultante duplex di RNA viene caricato sulla proteina Argonante (AGO), che conserva preferenzialmente solo un filamento di miRNA maturo rimuovendo l'altro filamento (miRNA*). AGO caricata con miRNA si associa ad altri cofattori, e costituisce il complesso effettore, chiamato complesso di silenziamento indotto dall'RNA (RISC).^{225,226} Il miRISC induce la degradazione dell'mRNA e/o la soppressione traslazionale attraverso l'interazione con le sequenze complementari nella regione 3' non tradotta (3'-UTR) dell'mRNA del gene bersaglio.²²⁷⁻²²⁹

Tuttavia, recenti studi hanno rivelato che i miRNA oltre a regolare negativamente l'espressione genica attraverso l'interazione con la regione 3'-UTR del mRNA bersaglio, possono anche regolare, sia positivamente che negativamente, regioni complementari del promotore e della regione codificante del mRNA bersaglio.²³⁰ Non è assolutamente da escludere che in futuro si scoprano altri meccanismi attraverso cui i miRNA svolgono le loro funzioni.

1.6.2 MiR-21

Tra i diversi microRNA, miR-21 è di particolare interesse per il suo coinvolgimento nelle malattie epatiche croniche. Questo è emerso essere ampiamente espresso in vari tipi di tessuti umani, compreso il fegato²³¹ e specialmente nelle cellule stellate (HSC) attivate, che sono responsabili della fibrosi epatica.^{232,233} Inoltre miR-21 è uno dei miRNA più iperespressi nell'HCC,²³⁴ con livelli tissutali²³⁵⁻²³⁷ ma soprattutto sierici^{224,238-242} significativamente elevati, condizioni che lo rendono facilmente isolabile e analizzabile.

Nel fegato, MiR-21 è sovraregolato in molti processi biologici, tra cui infiammazione, fibrosi e cancro.²⁴³

1.6.2.1 Ruolo molecolare nella progressione della malattia epatica

Nelle epatiti croniche ad eziologia virale (HBV, HCV) è stato dimostrato che i miRNA dell'ospite possono influenzare sia il genoma virale che diversi fattori cellulari dell'ospite stesso e, analogamente, il virus può influenzare i livelli di espressione dei miRNA cellulari a suo vantaggio, creando un ambiente favorevole alla progressione dell'infezione e del danno epatico.²⁴⁴ HBV codifica la proteina X (HBx), un fattore essenziale nella replicazione virale e nella patogenesi del carcinoma epatocellulare associato a HBV.²⁴⁵ Negli epatociti e nel carcinoma epatocellulare, HBx promuove la proliferazione, l'invasione e la migrazione cellulare inducendo l'iperespressione di miR-21 e favorendo la progressione del danno epatico mediante la repressione di geni oncosoppressori come morte cellulare programmata 4 (PDCD4)²⁴⁶ e omologo della fosfatasi e della tensina (PTEN)²⁴⁷ e mediante l'inibizione dell'apoptosi targettando l'interleuchina-12 (IL-12).²⁴⁸ Inoltre uno studio recente ha evidenziato che l'up-regolazione di miR-21 è associata alla recidiva dell'HCC HBV-correlato nei pazienti con trapianto di fegato,²⁴⁹ ma i meccanismi alla base devono ancora essere dimostrati. Analogamente, Chen et al. hanno dimostrato che nell'infezione da HCV si verifica una up-regolazione del miR-21, che a sua volta sopprime la produzione di Interferone di tipo I (IFN) normalmente indotta da HCV, promuovendo così la replicazione virale. Inoltre, miR-21 ha come target due fattori importanti nella via di segnalazione TLR: il fattore di differenziazione mieloide 88 (MyD88) e la

chinasi 1 associata al recettore dell'interleuchina-1 (IRAK1), anch'essi coinvolti nella produzione di IFN di tipo I indotto da HCV. Pertanto, HCV potrebbe aver sviluppato una strategia per eludere le risposte immunitarie dell'ospite e resistere alla terapia a base di interferone attraverso la deregolazione di miR-21.²⁵⁰

Una deregolazione di miR-21 è stata riscontrata anche nei pazienti con NAFLD/NASH: studi recenti hanno evidenziato come questo promuova l'accumulo di lipidi epatici e la proliferazione cellulare interagendo con la via Hbp1-p53-Srebp1c²⁵¹ e inibendo PTEN, un regolatore della via della fosfatidilinositolo-3-chinasi.²⁵² Inoltre è stato ipotizzato, tramite studi su modelli murini, che miR-21 possa promuovere la resistenza insulinica e la steatosi epatica, attraverso la deregolazione della proteina FOXO1, del gene INSIG2, di STAT3 e del fattore nucleare degli epatociti 4 alfa (HNF4- α).²⁵³ A dimostrazione di ciò l'inibizione di miR-21 portava a un miglioramento della tolleranza al glucosio, della sensibilità all'insulina e ritardava la steatosi epatica. MiR-21 sembra abbia anche un ruolo nell'indurre o facilitare il danno cellulare, l'infiammazione e la fibrosi, attraverso l'inibizione della via del segnale del recettore alfa attivato dal proliferatore del perossisoma (PPAR α).²⁵⁴

Similmente alla NAFLD, l'espressione epatica del miR-21 è up-regolata anche nei pazienti con ALD²⁵⁵ e nei modelli murini di ALD,²⁵⁶ ma la sua funzione in questa patologia non è stata ancora chiarita definitivamente.

L'attivazione delle cellule stellate epatiche (HSC) porta alla fibrosi epatica,⁸ che è caratterizzata da un'eccessiva produzione di collagene. Zhu et al. hanno dimostrato che l'espressione di miR-21 nelle HSC era drammaticamente elevata in campioni di fegato cirrotico umano e in fegati fibrotici murini (indotti da tioacetamide o tetracloruro di carbonio). Hanno inoltre dimostrato che miR-21 si manteneva a livelli costantemente elevati tramite un ciclo di feedback microRNA-21/proteina di morte cellulare programmata 4/proteina di attivazione-1 (miR-21/PDCD4/AP-1). L'interruzione di questo ciclo con inibitori di miR-21 o AP-1 sopprimeva significativamente l'attività pro-fibrotica nelle HSC. Al contrario, il potenziamento di questo ciclo con un piccolo RNA interferente (siRNA) contro PDCD4 promuoveva la fibrogenesi. Il miR-21 up-regolato promuoveva la via di segnalazione del fattore di crescita trasformante β (TGF- β) alla base dell'attivazione delle HSC. Il ciclo di autoregolazione miR-21/PDCD4/AP-1 sembra essere una delle principali forze trainanti per la progressione della fibrosi

epatica.²⁵⁷ Attraverso questo ciclo miR-21 esplica effetti non solo fibrogenici, ma anche di promozione della migrazione e dell'invasione cellulare nelle cellule di HCC, tramite un'up-regolazione delle vie di segnalazione a valle di PDCD4, tra cui fosfo-c-Jun, metalloproteinasi della matrice (MMP)-2 e MMP-9.²⁵⁸

MiR-21 partecipa all'attivazione indotta da Ang II dell'inflammasoma NLRP3 e promuove la sintesi del collagene da parte delle HSC attraverso il targeting di sprouty1 (SPRY1) e dell'omologo decapentaplegico 7 (SMAD7).²⁵⁹ Alcuni studi hanno evidenziato come un *Knock-Out* (KO) di miR-21 in modelli murini implichi una riduzione dell'infiammazione, della sintesi di collagene e dell'espressione di vie di segnalazione pro-fibrotiche.^{255,260} MiR-21 reprime l'espressione di SMAD7, che è un regolatore inibitorio della via di segnalazione del TGF- β ,²⁶¹ con conseguente aumento della fibrosi epatica. Tuttavia, il ruolo pro-fibrotico di miR-21 è stato contestato da uno studio recente, che ha riportato che la delezione genetica di miR-21 non attenuava la fibrosi epatica nei modelli murini né impediva l'attivazione dell'HSC in coltura.²³³ Sono necessari ulteriori studi per chiarire l'effetto di miR-21 nella fibrogenesi epatica.

Numerosi studi sono concordi nel classificare miR-21 come un onco-miRNA: la sua sovraespressione aumenta la proliferazione cellulare, la migrazione e l'invasione in molte cellule tumorali.²⁶²⁻²⁶⁴ Livelli elevati di miR-21 sono stati riportati in vari tumori (carcinomi polmonari, renali e del colon-retto)²⁶⁵⁻²⁶⁷ e alcuni studi hanno scoperto che miR-21 potrebbe fungere da marker diagnostico e prognostico per questi.²⁶⁸⁻²⁷⁰

L'up-regolazione di miR-21 contribuisce all'aumento della proliferazione cellulare e all'inibizione dell'apoptosi mediante la soppressione di diversi geni oncosoppressori, tra cui PTEN, tropomiosina I, PDCD4, maspin e inibitore della metalloproteinasi 3.^{247,271}

MiR-21 modula la protein-chinasi regolata dal segnale extracellulare ERK1 e l'EMT (transizione epitelio-mesenchimale) durante la fibrogenesi regolando HNF4 α e di sprouty2 (SPRY2) degli epatociti. L'inibizione di miR-21 ha soppresso la segnalazione di ERK1 e ne ha inibito l'attivazione. Al contrario, la stimolazione di miR-21 ha migliorato la segnalazione di ERK1 nelle HSC e ha indotto l'EMT degli epatociti targettando HNF4 α e SPRY2.²³²

Uno dei ruoli chiave di miR-21 riguarda la sua interazione con PTEN, il cui ruolo biologico come gene oncosoppressore risulta ben caratterizzato.²⁷² In epatociti

umani trasfettati con precursori di miR-21 si verificava una diminuzione dell'espressione di PTEN e una fosforilazione di FAK, proteina tirosin-chinasi a valle di PTEN, che normalmente viene defosforilata da PTEN stesso, con un effetto finale di aumentata migrazione cellulare.²⁴⁷ L'inibizione di miR-21 in linee cellulari di HCC riduceva sensibilmente la fosforilazione di FAK e di AKT, implicata nella via PI3K/AKT ed essenziale per la crescita tumorale. Inoltre, si è notato che la trasfezione di epatociti normali con il precursore di miR-21 aumentava i livelli di MMP-2 e MMP-9, normalmente inibite da PTEN.²⁷³ Questi risultati forniscono prove di un legame tra miR-21 e l'espressione dei mediatori dell'invasione cellulare nelle linee cellulari HCC, che contribuiscono al processo metastatico.²⁴⁷

In uno studio del 2010 è stato evidenziato come miR-21 sia implicato anche in meccanismi di chemioresistenza. Cellule che esprimevano elevati livelli di miR-21 dimostravano di essere più resistenti alla terapia con IFN- α e 5-Fluorouracile (5-FU) rispetto ai controlli e di essere inoltre più resistenti all'apoptosi. In seguito alla trasfezione di anti-miR-21 in queste cellule, con lo scopo di riportare i livelli di miR-21 al pari dei controlli, si otteneva una migliore risposta alla chemioterapia e un aumento della percentuale di cellule apoptotiche. La base molecolare di questo esperimento è stata attribuita ad alterati livelli di PTEN, PDCD4 e MMP, confermata attraverso l'inibizione di questi target attraverso i rispettivi siRNA.²⁷⁴

Un altro lavoro ha evidenziato un effetto di miR-21 relativo alla resistenza dell'HCC alla terapia con sorafenib, probabilmente dovuta a una down-regolazione di PTEN e alla sequenziale attivazione di AKT, risultante in una soppressione dell'autofagia. Il successivo antagonismo verso miR-21 da parte di oligonucleotidi specifici rendeva le cellule nuovamente sensibili a sorafenib e aumentava sensibilmente l'autofagia, confermando un ruolo di miR-21 in questa pathway.²⁷⁵

È stato scoperto inoltre, attraverso tecniche di immunohistochimica, che la proteina chinasi-chinasi 3 attivata dal mitogeno (MAP2K3), coinvolta nella senescenza cellulare, era sorprendentemente repressa nei tessuti di HCC umano, rispetto ai tessuti non tumorali, e questa repressione era solidamente collegata ai livelli di miR-21. Questo risultato suggerisce che MAP2K3 potrebbe essere un gene oncosoppressore, che viene down-regolato da miR-21 in HCC.²⁷⁶

Uno studio effettuato costruendo una linea cellulare di HCC che sovraesprimeva stabilmente miR-21 rispetto a una linea cellulare di controllo negativo ha evidenziato che l'espressione dei marcatori LCSC (Liver Cancer Stem Cell) come CD13, Ep-CAM, CD90 e OCT4 era significativamente più alta nella linea cellulare con sovraespressione di miR-21 rispetto al controllo. Queste molecole sono implicate in numerosi processi quali invasione, migrazione cellulare e carcinogenesi.²⁷⁷

In numerosi tumori umani miR-21 sembra avere un ruolo anche all'interno di processi angiogenetici tramite l'aumentata espressione del fattore 1α inducibile dall'ipossia (HIF1 α),²⁷⁸⁻²⁸⁰ ma nessuno studio ne ha ancora valutato l'eventuale associazione per quanto riguarda HCC.

Gli esosomi sono piccole vescicole extracellulari che vengono rilasciate dalle cellule in seguito alla fusione di corpi multivescicolari con la membrana plasmatica. Esistono prove emergenti che indicano che gli esosomi svolgono un ruolo centrale nella comunicazione cellula-cellula in quanto possono veicolare proteine bioattive, mRNA e microRNA, i quali possono essere trasferiti a cellule adiacenti o organi distanti.²⁸¹ È emerso che le cellule di HCC possono secernere miR-21 esosomiale che, attraverso l'inibizione di PTEN, porta all'attivazione della via PDK1/AKT nelle HSC, che vengono convertite in fibroblasti cancro-associati (CAF). I CAF attivati possono ulteriormente promuovere la progressione del cancro secernendo citochine angiogeniche, inclusi VEGF, MMP2, MMP9, bFGF e TGF- β . I dati clinici hanno indicato che un livello elevato di miR-21 esosomiale sierico era correlato a una maggiore attivazione dei CAF e una maggiore densità di vasi nei pazienti con HCC.²⁸²

Kruppel Like Factor 5 (KLF5) agisce come un oncosoppressore in alcuni tumori. Uno studio ha dimostrato che l'espressione di KLF5 è stata inibita da miR-21 attraverso il targeting a livello del 3'-UTR del gene. L'iperespressione di KLF5 diminuiva, almeno in parte, l'effetto indotto da miR-21 sulla capacità migratoria e invasiva delle cellule. I risultati mostrano quindi che la migrazione e l'invasione delle cellule HCC erano significativamente aumentate a causa dell'inibizione di KLF5 indotta da miR-21.²⁸³

Inoltre, l'espressione di miR-21 epatica era sovraregolata dopo epatectomia parziale nei topi,²⁸⁴ mentre il knockdown di miR-21 ritardava la rigenerazione del fegato.²⁸⁵ MiR-21 promuove la proliferazione degli epatociti inibendo

l'espressione dei suoi geni bersaglio come il gene BTG2, che è un inibitore del ciclo cellulare,²⁸⁴ e il gene membro della famiglia dell'omologo di RAS-B (RhoB).²⁸⁵

1.6.2.2 Mir-21 come biomarcatore

I miRNA hanno il potenziale per diventare nuovi biomarcatori non invasivi poiché sono altamente stabili e facilmente rilevabili in circolazione.²²² Numerosi studi, infatti, hanno dimostrato la superiorità di diversi miRNA come biomarcatori per la diagnosi precoce, la prognosi e la valutazione delle malattie croniche del fegato rispetto ai tradizionali biomarcatori. Dagli studi presenti in letteratura risultano evidenti i molteplici meccanismi, sebbene alcuni dei quali non completamente chiariti, attraverso cui miR-21 contribuisce alla progressione del danno epatico mediante l'attivazione o il potenziamento di vie di segnalazione molecolari con effetti pro-fibrotici, ma anche attraverso una deregolazione di vie di segnalazione relative a processi di migrazione, invasione cellulare, apoptosi e angiogenesi, con effetti cancerogenici. Non sorprende quindi il fatto che negli studi eseguiti i livelli di miR-21, il quale agisce come un onco-miR, siano più alti nei tessuti di HCC rispetto al tessuto epatico non tumorale.²³⁵⁻²³⁷ Inoltre, anche i livelli sierici di miR-21 sono più elevati nei pazienti con HCC rispetto ai controlli sani,²³⁸⁻²⁴² proponendo quindi la sua determinazione come valido strumento per la diagnosi.²⁸⁶ D'altro canto, però, ancora pochi studi sono stati effettuati con lo scopo di identificare miR-21 come un possibile biomarcatore di progressione nelle fasi della storia naturale della malattia epatica cronica, ad esempio valutandone la correlazione con la fibrosi epatica, oppure confrontandolo rispetto ai tradizionali biomarcatori umorali.

Lo studio di Cermelli et al., tra i pochi che hanno valutato la correlazione tra livelli di miR-21 e la gravità del danno epatico all'istologia (valutata tramite la fibrosi) in pazienti con epatite cronica HCV-correlata (CHC) o NAFLD, ha evidenziato un lieve aumento di miR-21 negli stadi avanzati (F4) ma non negli stadi precedenti.²⁸⁷ Analogamente Marquez et al. hanno dimostrato una correlazione positiva tra livelli di miR-21, gravità della fibrosi, carica virale e livelli di ALT e AST in pazienti con CHC.²⁸⁸ Anche in caso di epatite cronica HBV-correlata (CHB), lo studio di Wu et al. dimostrava una correlazione positiva

tra livelli sierici di miR-21 e la fibrosi epatica, anche se il valore predittivo del miR-21 sierico per lo stadio istologico della fibrosi epatica è apparso essere inferiore a quello dei punteggi APRI e FIB-4.²⁸⁹ Nel caso di NAFLD/NASH si riscontrano risultati discordanti in letteratura: a livello tissutale sono stati riscontrati elevati livelli di miR-21,^{254,290} per quanto riguarda i livelli sierici, uno studio ha dimostrato livelli inferiori di miR-21 rispetto ai controlli sani,²⁹¹ mentre in un altro studio i livelli sierici di miR-21 erano più alti nei pazienti con NAFLD rispetto ai controlli sani.²⁹² Anche in studi effettuati su modelli murini di NAFLD i livelli di miR-21 erano strettamente associati alla gravità della fibrosi epatica.²⁹³ Nello studio di Bihrer et al. sono stati confrontati i livelli di miR-21 di pazienti sani, con CHC e con HCC. I pazienti con CHC presentavano elevati livelli rispetto ai controlli sani, ma non c'era differenza tra pazienti con CHC e pazienti con HCC. Inoltre, i livelli sierici di miR-21 erano fortemente correlati a bilirubina, INR, gGT, ALT e AST. Livelli sierici elevati di miR-21 sono stati riscontrati solo in pazienti con CHC che mostravano livelli elevati di ALT, mentre i sieri di pazienti con CHC con livelli di ALT normali avevano concentrazioni sieriche di miR-21 normali. I livelli sierici di miR-21 erano fortemente correlati all'Histology Activity Index (HAI), un punteggio calcolato sulla base della gravità di necrosi, infiammazione e fibrosi epatica, suggerendo che il livello sierico di miR-21 potrebbe essere correlato all'attività necroinfiammatoria epatica nei pazienti con CHC. L'analisi multivariata dei dati dei pazienti con necroinfiammazione epatica minima o da lieve a grave ha rivelato che solo ALT e miR-21 erano correlati in modo indipendente con il grado di necroinfiammazione. Pertanto, la concentrazione sierica di miR-21 potrebbe essere un parametro utile per differenziare i pazienti con necroinfiammazione da lieve a grave nel fegato che è di rilevanza clinica. Per quanto riguarda la correlazione tra miR-21 e fibrosi, non è stata trovata alcuna differenza significativa, (in accordo con lo studio di Cermelli et al.²⁸⁷ ma non con quello di Marquez et al.²⁸⁸). Gli autori dello studio suggeriscono che i livelli sierici di miR-21 sono correlati più all'attività del danno epatico piuttosto che alla fibrosi epatica nei pazienti con CHC, indicando che il livello sierico di miR-21 è idoneo a rilevare l'attività necroinfiammatoria nel fegato e non la presenza di HCC.²⁹⁴ In uno studio su pazienti con CHC i livelli di miR-21 erano correlati positivamente con età, albumina, AST, ALT, AFP e fibrosi epatica.²⁹⁵

Diversi studi hanno anche valutato il ruolo di miR-21 come possibile marcatore circolante in pazienti con HCC, con risultati contrastanti. Xu et al. hanno dimostrato che i livelli sierici di miR-21 erano più elevati in pazienti con HCC rispetto ai controlli sani, ma andando a confrontare i livelli sierici in pazienti con epatite cronica HBV-correlata (CHB) è emerso che in questi ultimi non solo erano elevati, ma anche maggiori rispetto ai pazienti con HCC, indicando una sensibilità dell'84% e una specificità del 73.5% (AUC 0.87) nel discriminare i pazienti con HCC dai controlli sani, una sensibilità dell'80% e una specificità del 95.6% (AUC 0.91) nel discriminare i pazienti con epatite cronica da controlli sani. Tuttavia, le analisi della curva ROC hanno rivelato che miR-21 non era in grado di differenziare i pazienti con HCC dai pazienti con epatite cronica.²⁴² Qi et al. hanno confrontato i livelli di miR-21 in pazienti sani, con CHB senza HCC e con HCC. I livelli di miR-21 erano più bassi nei pazienti con HCC rispetto ai controlli sani mentre nessuna differenza significativa è stata osservata tra soggetti con CHB con e senza HCC. Non è stata trovata alcuna associazione significativa tra miRNA e il numero di tumori, le dimensioni, lo stadio, il grado Child-Pugh e la sopravvivenza globale. È stata anche studiata una potenziale relazione tra i livelli di miRNA circolanti e lo stato di cirrosi epatica, ma non è stata identificata alcuna differenza statisticamente significativa.²⁹⁶ Anche nello studio effettuato da Tomimaru et al. sono stati confrontati i livelli sierici di miR-21 tra pazienti sani, con epatite cronica e con HCC. Il livello plasmatico di miR-21 nei pazienti con HCC era significativamente più alto rispetto ai pazienti con epatite cronica e volontari sani. Questo studio ha prodotto un'AUC di 0.77 con una sensibilità del 61.1% e una specificità dell'83.3% quando si differenzia l'HCC dall'epatite cronica e un'AUC di 0.95 con una sensibilità dell'87.3% e una specificità del 92% quando si differenzia l'HCC dai volontari sani. Rispetto all'AFP, miR-21 ha mostrato una maggiore performance diagnostica nel discriminare HCC, cirrosi ed epatite cronica B e questa efficienza diagnostica è rimasta anche per i pazienti con HCC AFP negativo. Inoltre, stati confrontati pazienti con HCC prima e dopo il trattamento di chemio-embolizzazione trans-arteriosa (TACE): i livelli plasmatici di miR-21 erano diminuiti significativamente dopo l'intervento chirurgico rispetto ai valori preoperatori. Bharali et al. hanno confrontato i livelli di miR-21 tra pazienti con HCC, pazienti con epatite cronica e cirrosi senza HCC, pazienti con epatite cronica senza cirrosi e senza HCC e controlli sani. I risultati evidenziano

che i pazienti con HCC e cirrosi avevano livelli significativamente più alti rispetto ai pazienti con HCC senza cirrosi e i pazienti con cirrosi senza HCC avevano livelli intermedi tra i due precedenti. Inoltre, è stata evidenziata una correlazione positiva tra carico virale di HBV e livelli del miR-21. I risultati di questo studio hanno prodotto una sensibilità del 74.1%, specificità del 75.0% nel differenziare i pazienti HCC dai pazienti senza HCC, ma un'incapacità nel differenziare HCC dall'epatite cronica; nessuna correlazione è stata evidenziata tra livelli di miR-21 e stadio Child-Pugh.²³⁹ MiR-21 quindi sembra adatto a differenziare l'HCC con un efficiente potere diagnostico di sensibilità, specificità e livello di espressione.

Probabilmente la valutazione di più miRNA nel siero ha un valore diagnostico migliore rispetto alla determinazione di un singolo miRNA. Un gruppo di miRNA frequentemente espressi (miR-21, miR-199 e miR-122) può essere più specifico per la diagnosi di HCC.²⁹⁷ Zhou et al. hanno testato un pannello di sette miRNA (miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a e miR-801): questi erano in grado di distinguere HCC e controlli sani (AUC = 0.941), epatite cronica B (AUC = 0.842) e cirrosi epatica (AUC = 0.884) anche in una fase iniziale della malattia.²⁹⁸ Analogamente, Zhuang et al., utilizzando un *pool* di tre diversi miRNA (miR-21, miR-26a e miR-101) in pazienti con HCC, epatite cronica e controlli sani hanno evidenziato che il livello sierico di miR-21 era più alto mentre miR-26a e miR-101 erano significativamente più bassi nei pazienti con carcinoma epatocellulare rispetto a quelli nei controlli sani. I livelli sierici di miR-26a e miR-101 erano significativamente più bassi nei pazienti con HCC rispetto a quelli nei pazienti con epatite cronica. Le analisi della curva ROC hanno rivelato che miR-21, miR-26a e miR-101 possono differenziare i pazienti con carcinoma epatico dai controlli sani, l'area sotto la curva ROC (AUC) era 0.621 (67.4% di sensibilità e 55.8% di specificità), 0.754 (51.9% di sensibilità e 95.2% di specificità) e 0.631 (47.1% di sensibilità e 81% di specificità), rispettivamente. La combinazione di miRNA e alfa-fetoproteina (AFP) ha prodotto un'AUC di 0.914 con una sensibilità dell'87.0% e una specificità del 78.0%; la combinazione di miRNA e AFP ha prodotto un miglioramento dell'AUC rispetto al solo AFP (0.854 contro 0.683): gli autori sono giunti alla conclusione che i livelli sierici di miR-21, miR-26a e miR-101 possono fungere da potenziali biomarcatori e la combinazione di questi miRNA e AFP fornisce un risultato migliore rispetto alla sola AFP.²⁹⁹ Nello studio di Zhang et al., effettuato con una combinazione di miR-

21 e miR-130b, i miRNA sovraregolati erano associati ai parametri clinico-patologici di infiltrazione capsulare del tumore e allo stadio. I pazienti con elevati livelli di miRNA presentavano una prognosi sfavorevole. Inoltre, il rilevamento combinato di miR-130b e miR-21 sierico ha ottenuto risultati migliori nella diagnosi di HCC con una sensibilità del 92.16% e un tasso di accuratezza del 77.51%.³⁰⁰ Tali risultati potrebbero indicare l'utilizzo di più miRNA contemporaneamente al fine di ottimizzare la diagnosi precoce.

Una metanalisi²⁸⁶ ha dimostrato che il miR-21 presenta prestazioni diagnostiche moderate (sensibilità dell'81%, specificità dell'85%, con AUC 0.9 nella popolazione complessiva; sensibilità e specificità scendono rispettivamente a 62.4% e 84.4% nel discriminare l'HCC dall'epatite cronica) e può servire come potenziale co-biomarcatore per la diagnosi precoce dell'HCC (con AFP),²³⁸ perché la sua espressione potrebbe non essere specificamente associata all'HCC stesso.

Il ruolo del miR-21 come marker prognostico è stato ampiamente studiato e diversi lavori hanno dimostrato che un'elevata espressione di miR-21 nel tessuto HCC dei pazienti trattati con resezione chirurgica del fegato era associata in modo indipendente a una sopravvivenza globale peggiore. In una serie di 60 pazienti con carcinoma epatocellulare resecati chirurgicamente, un'elevata espressione di miR-21 era associata a stadio avanzato del tumore e prognosi infausta.²³⁷

Precedenti studi hanno dimostrato che il miR-21 può favorire la rigenerazione epatica a seguito di epatectomia parziale.^{284,301} Si può ipotizzare che il miR-21 possa promuovere simultaneamente la rigenerazione epatica negli epatociti normali e nelle cellule tumorali, con conseguente prognosi infausta per i pazienti con carcinoma epatocellulare sottoposti a resezione epatica.³⁰²

Un altro studio ha confermato che livelli elevati di espressione di miR-21 nel tessuto dei pazienti trattati con resezione epatica curativa erano correlati a una bassa differenziazione del tumore, stadio TNM avanzato e invasione venosa; inoltre, la sopravvivenza globale nel gruppo con miR-21 alto era significativamente più breve.³⁰³ Studiando la correlazione tra una maggiore espressione di miR-21 e le caratteristiche cliniche di HCC, Yan et al. hanno osservato che una maggiore espressione di miR-21 era significativamente correlata a dimensioni del tumore >5cm, invasione venosa, stadio TNM e cirrosi epatica.³⁰⁴ Altri studi sono giunti alle stesse conclusioni: nei pazienti con

carcinoma epatocellulare trattati chirurgicamente, l'espressione elevata di miR-21 era associata alla progressione della malattia²³⁶ ed era un predittore indipendente di sopravvivenza globale.³⁰⁵

MiR-21 è stato inoltre correlato con la recidiva in pazienti con carcinoma epatocellulare HBV-mediato sottoposti a trapianto di fegato.²⁴⁹ Tuttavia, ci sono dati in letteratura che non confermano questi risultati.²³⁹

Dati provenienti da diverse metanalisi non sono concordanti nella definizione dell'utilità prognostica di miR-21. I pazienti con un'elevata espressione di miR-21 sia nel tessuto [HR 1.76, IC 95% 1.29 – 2.41] che nel sangue [HR 1.73, IC 95% 1.07 – 2.80] hanno una sopravvivenza globale significativamente più breve secondo uno studio.³⁰⁶ Tuttavia, il miR-21 sembra non essere in grado di predire la sopravvivenza nella popolazione complessiva dei pazienti con carcinoma epatocellulare [HR 1.21, IC 95% 0.68 – 2.16], ma solo nei pazienti trattati con resezione chirurgica [HR 2.36, IC 95% 1.52 – 3.66, $p < 0.01$].³⁰² Inoltre è emerso che miR-21 presenta una sensibilità diagnostica dell'85.2%, ed è superiore nella diagnosi di HCC rispetto a AFP la cui sensibilità diagnostica complessiva era inferiore al 60%. Inoltre, la sensibilità è risultata superiore rispetto alla tomografia computerizzata (TC) o alla risonanza magnetica (MRI). L'AUC di miR-21 è risultata 0.89 (IC 95%: 0.85-0.91), leggermente superiore a quella di AFP (0.81).^{224,307} Rispetto a AFP, la quale difficilmente riesce a diagnosticare tumori in stadio iniziale, miR-21 ha ottenuto risultati migliori in questo frangente.³⁰⁸ Nonostante i livelli di miR-21 a livello epatico non siano efficaci nel predire la sopravvivenza²³⁶ è stato dimostrato che una maggiore espressione di miR-21 è correlata alla progressione del tumore, implicando quindi un possibile ruolo di miR-21 come nuovo potenziale biomarcatore per la prognosi di HCC.^{236,238}

Wang et al. hanno scoperto che l'espressione di miR-21 era significativamente più alta nei tessuti HCC rispetto ai normali tessuti epatici adiacenti e la sopravvivenza globale a 5 anni del gruppo con elevata espressione di miR-21 era significativamente più breve di quella del gruppo con ridotta espressione di miR-21 (40.2% contro 70.7%; $P=0.007$) e la sopravvivenza libera da malattia a 5 anni del gruppo con alta espressione di miR-21 era anche significativamente più breve di quella del gruppo con bassa espressione di miR-21 (17.4% contro 57.3%; $P=0.001$). Inoltre, in un modello Cox multivariato, hanno dimostrato che

l'espressione di miR-21 era un fattore prognostico negativo indipendente per la sopravvivenza a 5 anni (hazard ratio [HR]=3.189, intervallo di confidenza al 95% [CI]=1.911-10.012, P= 0.03) e sopravvivenza libera da malattia a 5 anni (HR=5.897, CI=3.009-13.763, P<0.001) nell'HCC.³⁰⁹

Nonostante gran parte degli studi confermi una netta correlazione tra i livelli di miR-21 e la prognosi di HCC o delle malattie croniche epatiche, alcuni risultati incoerenti sono stati ottenuti. Inoltre, ci sono pochi dati che valutino l'andamento di miR-21 nelle diverse fasi della patologia epatica cronica e una sua possibile correlazione con parametri quali gravità della fibrosi e indici bioumorali.

Non meno importante, questi studi appaiono difficilmente confrontabili tra loro, per diversi motivi: campioni di diverse dimensioni e diversa selezione del campione; differenze nei campioni utilizzati per determinare il livello di miR-21 (tessuto, siero, plasma, sangue intero); procedure di estrazione dell'RNA o controllo interno utilizzati; gruppi di controllo utilizzati (volontari sani, epatiti e cirrosi). Urge una necessità di approfondire ulteriormente questi studi e, soprattutto, uniformare le metodiche attraverso cui questi vengono effettuati, per riuscire a giungere a una conclusione sulla possibile eleggibilità e affidabilità dei miRNA come biomarcatori diagnostici e prognostici di HCC, ma anche delle malattie epatiche croniche, che rappresentano gli stadi della storia naturale precedenti all'insorgenza dell'HCC, al fine di permettere una diagnosi precoce, una stadiazione accurata e un trattamento appropriato.

2. SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo dello studio è quello di valutare i livelli sierici di miR-21 in gruppi di pazienti con malattia epatica cronica e carcinoma epatocellulare. Inoltre, è stata investigata la possibile correlazione di miR-21 con la severità della fibrosi epatica e con i test di laboratorio di funzionalità epatica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 GRUPPI DI STUDIO

In questo studio, i campioni di sangue di 16 volontari sani, 11 pazienti con NAFLD/NASH, 19 pazienti con epatite cronica C (CHC), 20 pazienti cirrotici e 18 pazienti con HCC raccolti tra gennaio 2019 e giugno 2021, sono stati valutati retrospettivamente. I campioni di sangue di pazienti con NAFLD/NASH, CHC e cirrosi epatica sono stati prelevati da pazienti gestiti presso l'ambulatorio dell'Unità di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova. Nel gruppo NAFLD/NASH sono stati inclusi pazienti con malattia metabolica epatica diagnosticata secondo le raccomandazioni delle linee guida europee.³¹⁰

Il gruppo CHC era composto da pazienti non cirrotici con infezione cronica da HCV in attesa di trattamento con antivirali ad azione diretta (DAA). Ai pazienti è stata diagnosticata la cirrosi, e di conseguenza inclusi nel relativo gruppo, quando soddisfacevano i seguenti criteri: rapporto internazionale normalizzato (INR) >1.2, conta leucocitaria <4.4 x 10⁹/L, piastrine <150 x 10⁹/L (almeno due su tre) e l'ecografia addominale (US) con reperti compatibili con la diagnosi di cirrosi (margini irregolari, parenchima disomogeneo, dilatazione della vena porta, flusso portale rallentato, splenomegalia, ascite). Tutti i pazienti cirrotici sono stati regolarmente controllati per lo sviluppo di HCC con US ogni sei mesi e la presenza di HCC è stata esclusa con la tomografia computerizzata dinamica (TC) o la risonanza magnetica (MRI) al momento dell'ingresso nello studio. I pazienti HCC inclusi nello studio sono stati ricoverati presso l'Unità di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova per il trattamento (DEB-TACE). La diagnosi di carcinoma epatocellulare è stata ottenuta con le caratteristiche tipiche alla TC o RM dinamica (enhancement nella fase arteriosa e washout nelle fasi ritardate), secondo le linee guida europee.²⁰⁷ In questo sottogruppo, i campioni di sangue sono stati raccolti immediatamente prima della TACE. Sono state registrate le seguenti variabili cliniche e correlate al tumore: sesso, età, eziologia, comorbidità, presenza di ipertensione portale clinicamente rilevante (CRPH), principali parametri sierologici (aspartato aminotransferasi [AST], alanina aminotransferasi [ALT], gamma-glutamyl transpeptidasi [gGT], fosfatasi alcalina [ALP], bilirubina totale, rapporto internazionale normalizzato [INR], albumina e

alfa-fetoproteina [AFP]), classe Child-Pugh e modello per la malattia epatica allo stadio terminale (MELD). La CRPH è stata definita come presenza di splenomegalia, varici esofagee o ascite e conta piastrinica $<100 \times 10^9/L$.³¹¹ Nei gruppi NAFLD/NASH e nei gruppi CHC è stata anche raccolta la *stiffness* epatica misurata con elastografia, mentre questi dati erano disponibili solo in 7 dei pazienti cirrotici. Genotipo e HCV-RNA sono stati registrati per i pazienti con CHC. Nei pazienti con carcinoma epatocellulare sono stati registrati numero e dimensione dei noduli epatici, presenza di invasione macrovascolare (MVI) e/o diffusione extraepatica (EHS), valutati con TC o RM dinamica. I pazienti sono stati stadiati secondo il sistema Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC).³¹²

3.2 ESTRAZIONE e ANALISI MICRO-RNA

Da 10 millilitri di sangue venoso, 5 mL sono stati utilizzati per la separazione di siero e plasma. I campioni sono stati conservati a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ fino al dosaggio dei marcatori biochimici. I campioni di plasma sono stati utilizzati per la determinazione dei miRNA. L'RNA totale è stato estratto da 200 μL di plasma utilizzando il kit miRneasy Serum/Plasm Advanced (Qiagen, GmbH, Hilden, Germania). L'efficienza di estrazione è stata verificata aggiungendo oligonucleotidi sintetici (UniSp2, UniSp4, UniSp5) alle concentrazioni consigliate. La trascrizione inversa per la sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando il kit miRCURY LNA RT (Qiagen, GmbH, Hilden, Germania) secondo le istruzioni del produttore. L'efficienza della trascrizione inversa è stata verificata aggiungendo oligonucleotidi sintetici (UniSp6). L'espressione dei miRNA è stata valutata mediante analisi quantitativa Real Time (qRT)-PCR (miRCURY LNA miRNA PCR Assays and PCR Panels, Qiagen, GmbH, Hilden, Germany), secondo le istruzioni del produttore, su un sistema PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) con miR-93, miR-103a, miR-425 come controlli di riferimento interni per la normalizzazione. Per valutare l'emolisi sono stati utilizzati due miRNA: miR-451, che è espresso nei globuli rossi, e miR-23a, che è relativamente stabile nel siero e nel plasma ma non è influenzato dall'emolisi. Il rapporto tra questi due miRNA era correlato al grado di emolisi. I campioni con rapporti superiori a 7.0 hanno un rischio maggiore di essere affetti da emolisi, rispetto ai campioni con rapporti inferiori. Pertanto, i

campioni con rapporti superiori a 7.0 sono stati esclusi dall'analisi. L'espressione relativa di ciascun miRNA è stata calcolata utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (*fold-change*, fc), utilizzando soggetti sani come gruppo di riferimento per la normalizzazione.

3.3 ANALISI STATISTICA

Le variabili quantitative sono state riportate come mediana e intervallo interquartile (IQR), mentre le variabili categoriali come frequenza assoluta e percentuale. I test di Kruskal-Wallis e Mann-Whitney sono stati utilizzati per confrontare le variabili quantitative. Il confronto tra i dati categoriali è stato eseguito con i test chi-quadrato o test esatto di Fischer. Le correlazioni tra variabili continue sono state stabilite calcolando il coefficiente di Spearman non parametrico.

Al fine di identificare predittori indipendenti di fibrosi F4, è stata eseguita una regressione logistica multivariata includendo nel modello solo le variabili significativamente o borderline ($p \leq 0.1$) associate allo stadio della fibrosi all'analisi univariata.

Un valore p (due code) < 0.05 è stato considerato significativo in questo studio. IBM SPSS Statistics (versione 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) e GraphPad Prism versione 8.3.1 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) sono stati utilizzati per tutti i calcoli.

4. RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE DI BASE DEI PAZIENTI

Le caratteristiche di base dei pazienti inclusi nello studio sono esposte nella Tabella II. Una percentuale significativamente più alta di pazienti maschi era presente nei gruppi di cirrotici e HCC. I volontari sani erano significativamente più giovani rispetto ai gruppi NAFLD/NASH, CHC, cirrosi e HCC. Il gruppo CHC aveva una *stiffness* epatica misurata all'elastografia significativamente inferiore rispetto a NAFLD/NASH, mentre come previsto i cirrotici avevano una *stiffness* notevolmente maggiore (sebbene questi dati fossero disponibili solo in 7/20 [35%] pazienti). Rispetto a NAFLD/NASH, i pazienti cirrotici e con HCC hanno dimostrato livelli significativamente più bassi di globuli bianchi (WBC) e piastrine, ma livelli più elevati di bilirubina e INR. I pazienti cirrotici hanno mostrato albumina significativamente inferiore rispetto a NAFLD/NASH, mentre i pazienti con HCC avevano livelli di AFP più elevati (nonostante il relativamente basso significato clinico considerando che il livello mediano di AFP nei pazienti con HCC era di 4.9 ng/mL [IQR 2.8-11.6]). Non sono state registrate differenze statisticamente significative nella funzionalità epatica (classe Child-Pugh e punteggio MELD) tra cirrotici e pazienti con carcinoma epatocellulare. Questi ultimi hanno mostrato un numero mediano di 3 noduli (IQR 1-4) con un diametro mediano di 2.0 cm (IQR 1.8-3.6). La maggior parte dei pazienti con carcinoma epatocellulare presentava un tumore BCLC stadio A o B (7 pazienti in entrambi i gruppi).

Tabella II. Caratteristiche di base dei pazienti.

| | Controlli (n=16) | NAFLD/NASH (n=11) | CHC (n=19) | Cirrosi (n=20) | HCC (n=18) |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Variabili cliniche | | | | | |
| Sesso – maschile | 4 (25.0) | 5 (45.5) | 7 (33.3) | 12 (66.7) * | 14 (77.8) # |
| Età (anni) | 50 (39-59) | 66 (56-73) # | 61 (47-72) * | 68 (58-72) # | 66 (62-75) † |
| Biopsia epatica | - | 5 (45.5) | 4 (19.0) | 0 (0) # | 2 (11.1) |
| Eziologia | | | | | |
| HBV | - | 0 (0) | 0 (0) | 2 (10.0) | 0 (0) |
| HCV | - | 0 (0) | 19 (100.0) ‡ | 5 (25.0) | 7 (38.9) * |
| NAFLD/NASH | - | 11 (100.0) | 0 (0) ‡ | 4 (20.0) ‡ | 3 (16.7) ‡ |
| ASH | - | 0 (0) | 0 (0) | 9 (45.0) # | 8 (44.4) * |
| HCV genotipo 1b | - | - | 11 (57.9) | - | - |
| Stiffness epatica (kPa) | - | 6.8 (5.3-8.4) | 5.3 (4.7-6.7) * | 26.4 (21.1-43.5) †,a | - ^b |
| WBC (x10 ⁹ /L) | - | 7.88 (6.03-9.50) | 5.36 (4.50-7.50) * | 5.46 (3.51-7.13) * | 5.49 (3.45-6.33) # |
| Hb (g/dL) | - | 14.2 (12.8-14.9) | 14.6 (13.9-15.6) | 11.8 (8.7-13.3) * | 13.3 (12.1-15.1) |
| PLT (x10 ⁹ /L) | - | 226 (188-282) | 214 (157-258) | 126 (67-195) # | 135 (73-177) † |
| AST (U/L) | - | 27 (22-41) | 39 (28-61) * | 48 (24-76) | 39 (28-49) |
| ALT (U/L) | - | 32 (23-59) | 45 (25-99) | 19 (15-49) | 29 (24-44) |
| gGT (U/L) | - | 68 (27-172) | 30 (15-84) | 81 (32-162) | 72 (52-156) |
| ALP (U/L) | - | 97 (76-108) | 78 (62-101) | 107 (82-149) | 93 (86-118) |
| Bilirubina (umol/L) | - | 8.7 (7.3-12.3) | 10.5 (7.6-16.7) | 22.0 (8.7-37.6) | 15.0 (11.3-32.8) * |
| INR | - | 1.04 (1.00-1.07) | 1.02 (0.98-1.07) | 1.27 (1.13-1.43) ‡ | 1.12 (1.09-1.32) # |
| Albumina | - | 4.1 (3.8-4.5) | 4.3 (4.1-4.5) | 3.5 (2.9-4.1) * | 4.1 (3.2-4.5) |
| AFP (ng/mL) | - | 2.2 (1.7-3.5) | 3.6 (2.0-5.3) | 3.7 (2.3-7.8) | 4.9 (2.8-11.6) * |
| CRPH | - | - | - | 17 (85.0) | 10 (55.6) * |
| Child-Pugh (classe) | | | | | |
| A | - | - | - | 10 (50.0) | 14 (77.8) |
| B | - | - | - | 6 (30.0) | 4 (22.2) |
| C | - | - | - | 4 (20.0) | 0 (0) |
| MELD | - | - | - | 11 (10-19) | 10 (8-14) |
| Variabili correlate al tumore | | | | | |
| Numero di noduli | - | - | - | - | 3 (1-4) |
| Diametro (cm) | - | - | - | - | 2.0 (1.8-3.6) |
| MVI e/o EHS | - | - | - | - | 2 (11.1) |
| BCLC (stadio) | | | | | |
| 0 | - | - | - | - | 2 (11.1) |
| A | - | - | - | - | 7 (38.9) |
| B | - | - | - | - | 7 (38.9) |
| C | - | - | - | - | 2 (11.1) |

a) I dati sulla stiffness epatica erano disponibili solo in 7 pazienti cirrotici

b) I dati sulla stiffness epatica non erano disponibili per i pazienti con carcinoma epatocellulare

Gruppi di riferimento per il confronto: controlli per sesso ed età; NAFLD/NASH per biopsia epatica, stiffness epatica, eziologia, WBC, Hb, PLT, AST, ALT, gGT, ALP, bilirubina, INR, albumina e AFP; cirrotici per CRPH, Child-Pugh e MELD.

* $p < 0.05$ e ≥ 0.01 ; # $p < 0.01$ e ≥ 0.001 ; † $p < 0.001$ e ≥ 0.0001 ; ‡ $p < 0.0001$

Abbreviazioni: NAFLD, steatosi epatica non alcolica; NASH, steatoepatite non alcolica; ASH, steatoepatite alcolica; CHC, epatite cronica C; HCC, carcinoma epatocellulare; HBV, virus dell'epatite B, HCV, virus dell'epatite C; GB, globuli bianchi; Hb, emoglobina; PLT, piastrine; AST, aspartato aminotransferasi; ALT, alanina aminotransferasi; gGT, gamma-glutamyl transpeptidasi; ALP, fosfatasi alcalina; INR, rapporto normalizzato internazionale; AFP, alfa-fetoproteina; CRPH, ipertensione portale clinicamente rilevante; MELD, model for endstage liver disease; MVI, invasione macrovascolare; EHS: diffusione extraepatica; BCLC, Barcelona clinic liver cancer.

4.2 LIVELLI CIRCOLANTI DI MIR-21

I livelli di miR-21 erano significativamente diversi tra i gruppi (Kruskall-Wallis $p < 0.0001$). I valori mediani di miR-21 erano 1.07-fc (IQR 0.84-1.25) nei controlli, 0.77-fc (IQR 0.60-1.15) nei pazienti NAFLD/NASH e 1.01-fc (IQR 0.78-1.50) nei pazienti con CHC. I cirrotici (2.13-fc, IQR 1.15-2.93) avevano livelli significativamente più alti di miR-21 rispetto ai controlli ($p = 0.002$), NAFLD/NASH ($p = 0.001$) e CHC ($p = 0.005$). Nell'HCC, i livelli di miR-21 diminuivano a 1.67-fc (IQR 1.17-2.10) ma rimanevano significativamente più alti rispetto ai controlli ($p = 0.001$), rispetto alla NASH ($p = 0.001$) e rispetto ai pazienti con CHC ($p = 0.03$). Non c'era alcuna differenza statisticamente significativa nel livello di miR-21 tra cirrotici e pazienti con carcinoma epatocellulare ($p = 0.23$) (Figura 5).

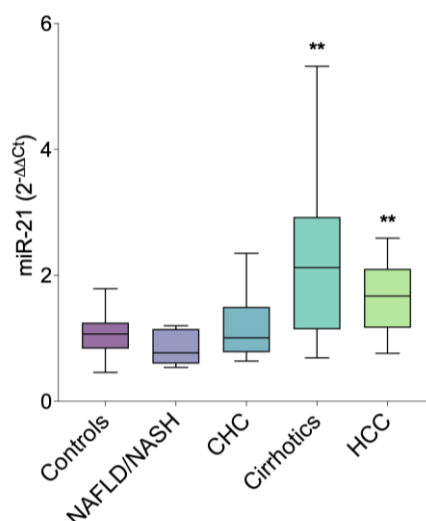


Figura 5. Diagrammi a scatola e baffi rappresentanti i livelli ematici di miR-21 nei controlli, nei pazienti NAFLD/NASH, nei pazienti affetti da CHC, nei pazienti cirrotici e nei pazienti con HCC. I pazienti cirrotici e i pazienti con HCC avevano livelli significativamente più alti di miR-21. (** $p < 0.01$ e ≥ 0.001)

4.3 CORRELAZIONE TRA MIR-21 E PARAMETRI CLINICI

Ipotizzando che i livelli sierici di miR-21 possano essere correlati alla fibrosi epatica, abbiamo valutato la correlazione tra i livelli di questo miRNA e la *stiffness* epatica misurata all'elastografia, trovando una correlazione positiva ($r = 0.44$, IC 95% 0.10-0.68; $p = 0.01$) (Figura 6). Inoltre, questa associazione è stata confermata quando i pazienti sono stati divisi in base al grado di fibrosi (Figura 7). I pazienti con fibrosi F0-F1 avevano un valore mediano di miR-21 di 0.90-fc (IQR 0.73-1.26), che era significativamente inferiore a quello dei pazienti F2-F3 (1.65-fc, IQR 1.23-2.07; $p=0.03$) e pazienti F4 (1.65-fc, IQR 1.23-2.07; $p=0.0009$). Non sono state dimostrate differenze significative tra i pazienti F2-F3 e i pazienti F4.

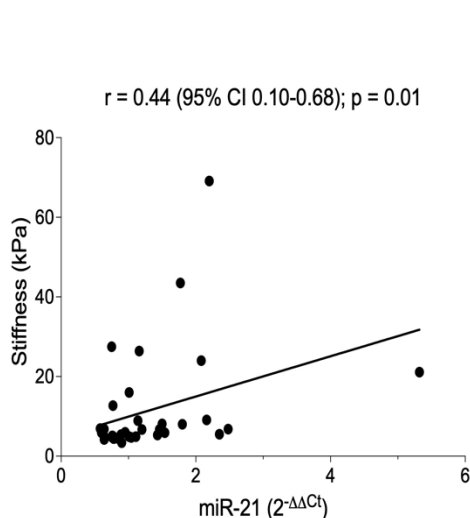


Figura 6. Correlazione tra i livelli di MiR-21 e stiffness epatica.

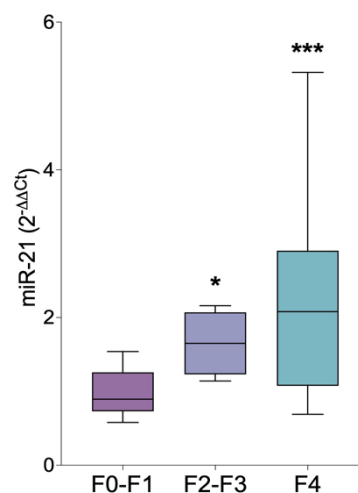


Figura 7. Livelli di miR-21 in base alla fibrosi epatica misurata all'elastografia. Rispetto ai pazienti F0-F1, i livelli di miR-21 erano significativamente più alti nei pazienti F2-F3 e F4. (* $p < 0.05$ e ≥ 0.01 ; *** $p < 0.001$ e ≥ 0.0001)

Nei pazienti con epatite cronica, cirrosi e HCC, i livelli di miR-21 erano correlati positivamente con AST ($r = 0.40$, IC 95% 0.16-0.60; $p=0.001$) e ALP ($r = 0.36$, IC 95% 0.11-0.57; $p= 0.005$), ma non con ALT ($r = 0.14$, IC 95% -0.12-0.38; $p=0.29$), gGT ($r = 0.08$, IC 95% -0.18-0.33; $p=0.54$) e bilirubina ($r = 0.21$, IC 95% -0.05-0.44; $p=0.10$). Inoltre, i livelli di miR-21 erano correlati negativamente con l'albumina ($r = -0.42$, IC 95% -0.62 - -0.18; $p=0.0008$) e positivamente con INR ($r = 0.39$, IC 95% 0.15-0.59; $p= 0.002$) (Figura 8).

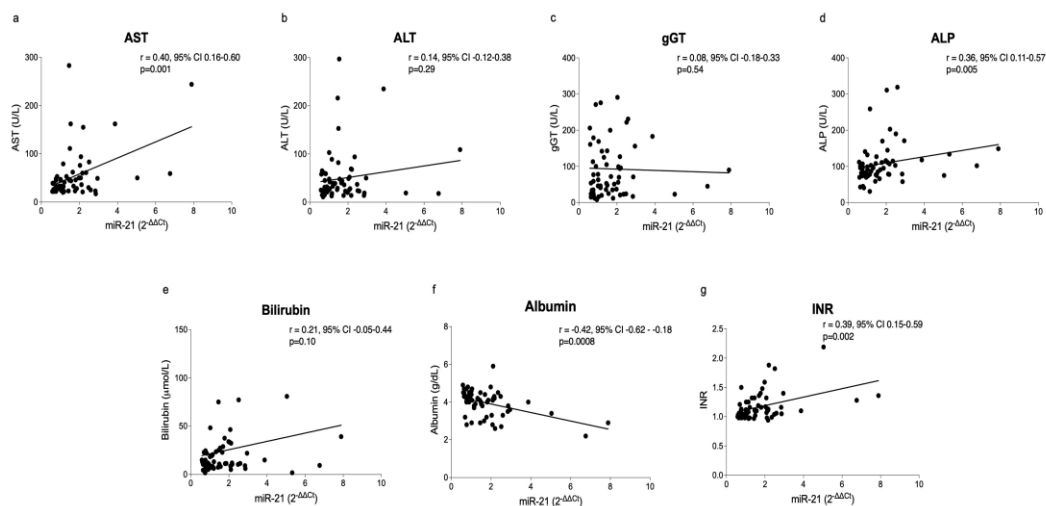


Figura 8. Correlazioni tra i livelli di miR-21 e AST (a), ALT (b), gGT (c), ALP (d), bilirubina (e), albumina (f) e INR (g) nei pazienti con epatite cronica, nei pazienti cirrotici e nei pazienti con carcinoma epatocellulare. È stata dimostrata una correlazione positiva tra i livelli di miR-21 e AST, ALP e INR, mentre è stata mostrata una correlazione negativa con l'albumina.

Un livello significativamente più alto di miR-21 è stato dimostrato nei pazienti con AST anormale (1.89-fc, IQR 1.42-2.39) rispetto ai pazienti senza anomalie (1.03-fc, IQR 0.76-1.66; $p=0.0004$). Al contrario, non sono state dimostrate differenze statisticamente significative tra i pazienti con ALT anormale rispetto a quello normale (rispettivamente 1.52-fc [IQR 1.01-2.19] e 1.18-fc [0.78-2.00]; $p=0.28$) (Figura 9).

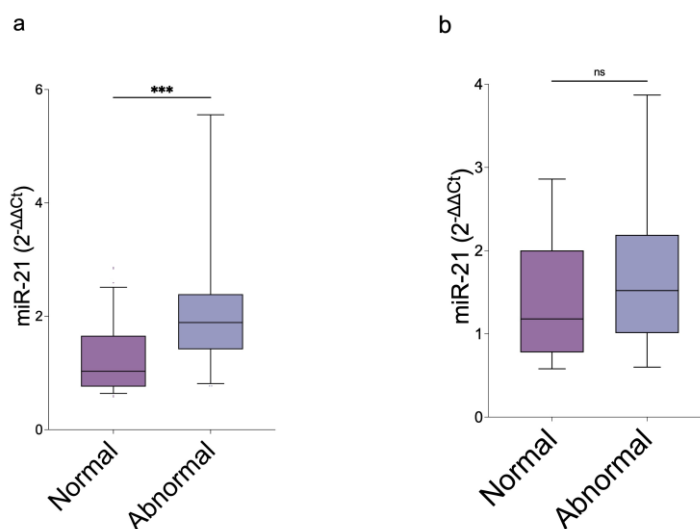


Figura 9. Livelli di miR-21 in pazienti con AST (a) e ALT (b) normali e anormali. I pazienti con AST elevato avevano livelli significativamente più elevati di miR-21 (a).

(*** $p<0.001$ e ≥ 0.0001 ; ns, non significativo)

Risultati simili nelle correlazioni sono stati osservati in un'analisi di sensibilità con l'esclusione dei pazienti con carcinoma epatocellulare (Figura 10).

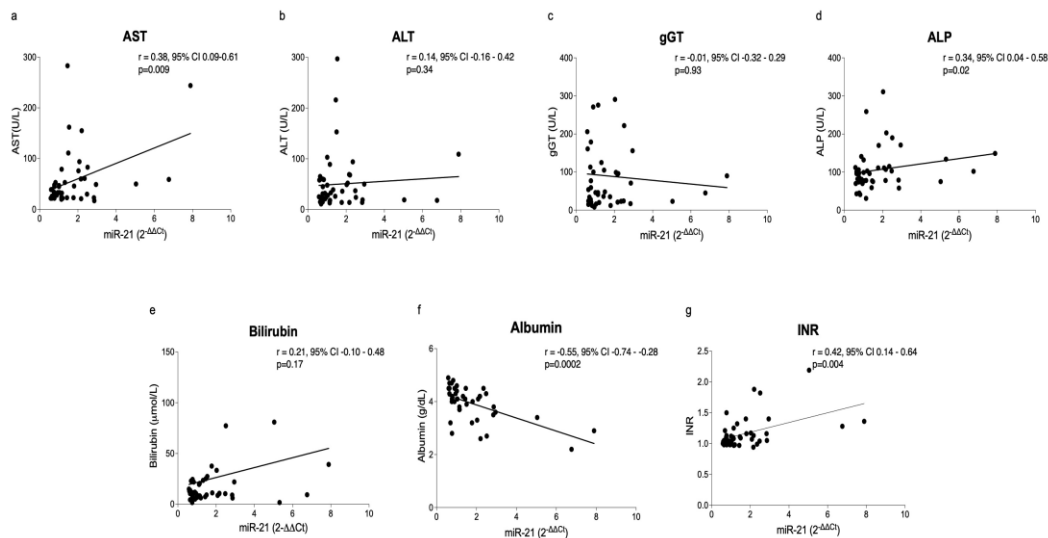


Figura 10. Correlazioni tra i livelli di miR-21 e AST (a), ALT (b), gGT (c), ALP (d), bilirubina (e), albumina (f) e INR (g) nei pazienti con epatite cronica e nei pazienti cirrotici. È stata dimostrata una correlazione positiva tra i livelli di miR-21 e AST, ALP e INR, mentre è stata riscontrata una correlazione negativa con l'albumina.

Nell'analisi riservata ai pazienti con epatite cronica (NAFLD/NASH o CHC), i livelli di miR-21 erano correlati positivamente sia con AST ($r=0.52$, IC 95% 0.17-0.75; $p=0.005$) che con ALT ($r=0.45$, 95% CI 0.08-0.71; $p=0.02$), mentre la correlazione con ALP è diventata non significativa anche se è stato ottenuto un p-value borderline ($r = 0.34$, 95% CI -0.06 - 0.64; $p=0.08$) (Figura 11). Inoltre, nel gruppo CHC, miR-21 era correlato positivamente con i livelli di HCV-RNA ($r = 0.41$, IC 95% 0.14-0.63; $p = 0.003$).

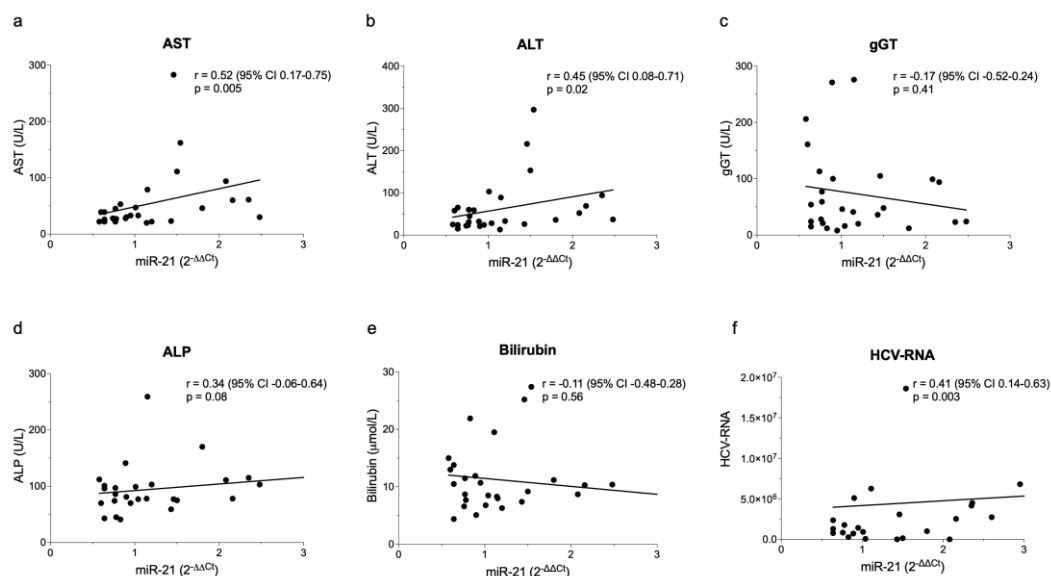


Figura 11. Correlazioni tra i livelli di miR-21 e AST (a), ALT (b), gGT (c), ALP (d), bilirubina (e) e HCV-RNA (f) nei pazienti con epatite cronica. È stata dimostrata una correlazione positiva tra i livelli di miR-21 e i livelli di AST, ALT e HCV-RNA (nei pazienti con CHC).

Al fine di valutare se i livelli di miR-21 possano essere un predittore di fibrosi grave (F4) abbiamo eseguito un'analisi di regressione logistica multivariata, comprese le variabili associate alla fibrosi F4 all'analisi univariata (Tabella III). MiR-21 si è rivelato essere l'unico predittore indipendente di fibrosi grave (OR=5.77, IC 95% 1.04-32.03).

Tabella III. Analisi di regressione logistica univariata e multivariata dei fattori associati alla fibrosi F4.

| Variabile | Analisi Univariata | | Analisi Multivariata | |
|------------|---------------------|-------|----------------------|------|
| | OR (95% CI) | p | OR (95% CI) | p |
| Sesso | 2.25 (0.71-7.14) | 0.17 | | |
| Età | 1.03 (0.98-1.08) | 0.28 | | |
| Albumina | 0.05 (0.01-0.33) | 0.002 | 0.91 (0.05-16.21) | 0.95 |
| Bilirubina | 1.08 (1.01-1.16) | 0.04 | 1.16 (0.97-1.39) | 0.09 |
| logAST | 2.15 (0.28-16.44) | 0.46 | | |
| logALT | 0.08 (0.01-0.71) | 0.02 | 0.01 (0.00-1.27) | 0.06 |
| logGGT | 3.13 (0.73-13.52) | 0.13 | | |
| logALP | 17.04 (0.57-506.86) | 0.10 | | |
| miR-21 | 4.40 (1.62-11.95) | 0.004 | 5.77 (1.04-32.03) | 0.04 |

Abbreviazioni: logAST, logaritmo dell'aspartato aminotransferasi; logALT, logaritmo dell'alanina aminotransferasi; logGGT, logaritmo della gamma-glutamyl transpeptidasi; logALP, logaritmo della fosfatasi alcalina.

5. DISCUSSIONE

Diversi dati hanno dimostrato che i microRNA sono deregolati nelle malattie croniche epatiche e che questi intervengono in numerose *pathways* molecolari, promuovendo o accelerando la progressione del danno epatico. Il miR-21, uno dei miRNA maggiormente iperespressi nel cancro del fegato, ne promuove lo sviluppo e la progressione.^{243,247,264} Alcuni studi hanno riscontrato un aumento significativo dei livelli sierici di miR-21 nei pazienti con carcinoma epatocellulare,^{224,238,239} proponendo quindi la sua determinazione come un valido strumento per la diagnosi.²⁸⁶ Tuttavia, non sono disponibili dati conclusivi riguardo ai cambiamenti di questo miRNA nelle diverse fasi della malattia epatica, in quanto gli studi disponibili hanno utilizzato diversi gruppi di controllo (soggetti sani, pazienti con epatite cronica virale o cirrotici)^{224,238-240,242,296,298,299} e i risultati sono tutt'altro che concordanti. Nonostante nei pazienti con HCC i livelli circolanti di miR-21 siano tendenzialmente elevati, Bihrer et al. non hanno riscontrato differenze significative tra pazienti con HCC e pazienti con epatite C senza cancro.²⁹⁴ Altri studi più recenti condotti in Cina, dove l'HBV è l'eziologia principale dell'epatopatia cronica e dell'HCC, hanno confrontato i livelli di miR-21 tra pazienti con HCC e pazienti con epatite B cronica raggiungendo risultati opposti: Guo et al. hanno riscontrato livelli di miR-21 più elevati nei pazienti con HCC,²³⁸ Pu et al. e Xu et al. riportato il livello più alto nei pazienti con epatite cronica,^{240,242} mentre Qi et al. hanno riscontrato livelli più alti nei pazienti sani e nessuna differenza significativa tra pazienti con epatite e pazienti con HCC.²⁹⁶ Tomimaru et al. hanno mostrato livelli significativamente più elevati di miR-21 nei pazienti con HCC con epatite cronica, ma in questo studio non sono stati inclusi pazienti con cirrosi.²²⁴ Bharali et al. hanno dimostrato che i pazienti con HCC e cirrosi avevano livelli significativamente più alti rispetto ai pazienti con HCC in assenza di cirrosi.²³⁹

Per quanto riguarda i livelli di miR-21 nella NAFLD, i risultati nel confronto con i controlli variavano a seconda degli studi: Sun et al. hanno riscontrato livelli inferiori nei pazienti con NAFLD rispetto ai controlli sani,²⁹¹ Yamada et al. hanno ottenuto il risultato opposto con livelli più elevati nei pazienti con NAFLD rispetto ai soggetti sani.²⁹²

In questo studio i livelli di miR-21 erano più alti nei pazienti con HCC rispetto a soggetti sani e pazienti con malattie epatiche croniche (NAFLD/NASH o CHC). Tuttavia, i valori più alti di miR-21 sono stati trovati nei cirrotici e non sono state dimostrate differenze statisticamente significative tra questo gruppo e i pazienti con cancro. Analogamente ai risultati ottenuti in un nostro precedente studio,²⁴¹ i pazienti con carcinoma epatocellulare avevano livelli di miR-21 inferiori rispetto ai cirrotici, anche se in questo non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa, probabilmente a causa del piccolo numero di pazienti inclusi. Inoltre, non abbiamo riscontrato differenze nei livelli di miR-21 tra pazienti con NAFLD/NASH e pazienti con CHC rispetto ai controlli.

Coerentemente con i nostri risultati, miR-21 è significativamente sovraespresso nella malattia epatica avanzata e nell'HCC. La sovraespressione di questo onco-miRNA sembra essere un evento molto precoce nella carcinogenesi epatica, con questo marcatore pienamente espresso nella cirrosi che è lo stadio precanceroso comune che porta allo sviluppo di HCC. Di conseguenza, miR-21 sembra non essere un biomcatore diagnostico utile per la rilevazione del cancro, almeno nei paesi occidentali dove la grande maggioranza degli HCC deriva da un *background* cirrotico. Ancora più importante, l'adozione di miR-21 come strumento diagnostico sembra essere ostacolata dalla mancanza di procedure operative standard e di metodi uniformi per normalizzare i livelli dei miRNA.²⁶⁸

Un risultato rilevante di questo studio è l'associazione del miR-21 con la fibrosi epatica misurata mediante elastografia. MiR-21 è stato associato alla fibrosi polmonare,³¹³ cardiaca,³¹⁴ ed è già stato dimostrato che il livello di questo miRNA è correlato alla fibrosi epatica.^{257,259,288} Uno stretto legame tra miR-21 e fibrosi epatica è supportato dalla scoperta che il fattore di crescita trasformante β (TGF- β), un mediatore critico della fibrogenesi epatica,^{261,315} promuove l'espressione di miR-21³¹⁶ e che il miR-21 diminuisce l'espressione di SMAD7,²⁸⁸ un regolatore negativo della segnalazione del TGF- β .²⁶¹ In questo studio, abbiamo confermato una correlazione significativa tra i livelli di miR-21 e la *stiffness* epatica. Inoltre, quando i pazienti sono stati divisi in base al grado di fibrosi (da F0 a F4), è stato dimostrato un progressivo aumento dei livelli di miR-21. MiR-21 si è rivelato anche un predittore indipendente di fibrosi F4 all'analisi di regressione logica multivariata, e questo conferma ulteriormente il ruolo centrale di questo miRNA

nella progressione del danno epatico. In effetti, esiste una chiara evidenza di una stretta relazione tra miR-21 e fibrosi epatica. Il livello epatico di miR-21 sembra essere correlato allo stadio della fibrosi epatica²⁸⁸ ed è fortemente espresso non solo nelle cellule tumorali, ma anche nei fibroblasti associati ai tumori.^{317,318} Per quanto riguarda i livelli circolanti, uno studio precedente ha mostrato che, pur non raggiungendo la significatività statistica, i pazienti F4 avevano livelli sierici di miR-21 più elevati rispetto agli stadi precedenti.²⁸⁷

Analogamente ad altri studi presenti in letteratura,^{288,294,295} in questo studio sono state evidenziate anche diverse correlazioni tra miR-21 e test di laboratorio di funzionalità epatica: abbiamo evidenziato come i livelli di miR-21 erano correlati positivamente con AST, ALP e albumina e correlati negativamente con INR in pazienti con epatite cronica, cirrosi e HCC. Un'analisi di sensibilità eseguita escludendo i pazienti con neoplasia epatica, ha confermato questo risultato. Inoltre, quando sono stati considerati solo i pazienti con epatite cronica, i livelli di miR-21 erano correlati ai parametri dell'attività necroinfiammatoria (AST e ALT). Nei pazienti con CHC, miR-21 era correlato positivamente con i livelli di HCV-RNA, e questo è in accordo con i dati precedenti che mostravano che l'espressione di miR-21 nel tessuto epatico era associata alla carica virale.²⁸⁸ I risultati di questo studio suggeriscono che la concentrazione di miR-21 potrebbe essere un parametro utile per differenziare i pazienti con fibrosi epatica lieve rispetto a quella da moderata a grave. Inoltre, considerando anche i risultati precedenti sulla correlazione tra i livelli sierici di miR-21 e il punteggio dell'indice di attività istologica (HAI),²⁹⁴ questo miRNA potrebbe essere in grado di discriminare i pazienti con necroinfiammazione epatica minima rispetto a quelli con necroinfiammazione epatica moderata-grave e tra pazienti con funzionalità epatica conservata rispetto a pazienti con funzionalità epatica compromessa, condizioni che sono di rilevanza clinica.

Nonostante i suoi punti di forza (cioè l'analisi di gruppi di pazienti con diverse fasi di danno epatico), questo studio presenta anche alcuni limiti, il più importante dei quali è la sua natura retrospettiva. Oltre a introdurre potenziali *bias*, questo disegno di studio ci ha impedito di raccogliere alcuni dati rilevanti per le analisi (ad esempio, la *stiffness* epatica all'elastografia era nota solo in 7 pazienti cirrotici). Inoltre, il numero limitato di pazienti per ciascun gruppo probabilmente ci ha impedito di ottenere risultati più solidi.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, abbiamo dimostrato che miR-21 è un biomarcatore adatto per identificare la progressione del danno epatico, con livelli elevati riscontrati nei pazienti con cirrosi e HCC rispetto ai soggetti sani e ai pazienti con malattia epatica cronica. Poiché non sono state osservate differenze significative nei livelli di miR-21 tra cirrotici e pazienti con carcinoma epatocellulare, la valutazione di questo biomarcatore non sembra essere utile nella diagnosi di carcinoma epatocellulare (almeno nei paesi occidentali, dove la stragrande maggioranza dei tumori si sviluppa da un *background* cirrotico).

Coerentemente con i risultati di studi precedenti, miR-21 è correlato alla fibrosi, all'attività necroinfiammatoria epatica e ai parametri di funzionalità epatica.

Pertanto, potrebbe essere un biomarcatore molto utile nel fornire informazioni su diversi aspetti delle malattie croniche del fegato.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Current Biology*. 2017 Nov;27(21):R1147–51.
2. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011 Feb 28;6(1):425–56.
3. Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2010 Aug 13;7(8):448–58.
4. UNIGASTRO - Coordinamento Nazionale Docenti Universitari di Gastroenterologia. *Malattie dell'apparato digerente*. Editrice Gastroenterologica Italiana Roma, editor. 2019.
5. Shashidhar KN, Nallagangula K. Pros and Cons of Existing Biomarkers for Cirrhosis of Liver. 2019 Mar;
6. Kwo PY, Cohen SM, Lim JK. ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries. *American Journal of Gastroenterology*. 2017 Jan;112(1):18–35.
7. Suriawinata AA, Thung SN. Acute and chronic hepatitis. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2006 Aug;23(3–4):132–48.
8. Williams EJ, Iredale JP. Liver cirrhosis. *Postgraduate Medical Journal*. 1998 Apr 1;74(870):193–202.
9. Buob S, Johnston AN, Webster CRL. Portal Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2011 Mar;25(2):169–86.

10. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2019 Oct 22;16(10):589–604.
11. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, Abbas Z, Chan HLY, Chen CJ, Chen DS, Chen HL, Chen PJ, Chien RN, Dokmeci AK, Gane E, Hou JL, Jafri W, Jia J, Kim JH, Lai CL, Lee HC, Lim SG, Liu CJ, Locarnini S, al Mahtab M, Mohamed R, Omata M, Park J, Piratvisuth T, Sharma BC, Sollano J, Wang FS, Wei L, Yuen MF, Zheng SS, Kao JH. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatology International*. 2016 Jan 13;10(1):1–98.
12. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *Journal of Hepatology*. 2008 Feb;48(2):335–52.
13. Tsukuda S, Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Research*. 2020 Oct;182:104925.
14. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, AlMazroa MA, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Abdulhak A bin, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, de Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FGR,

Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J-P, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Memish ZA, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, de León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh P-H, Yip P, Zabetian A, Zheng Z-J, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2012 Dec;380(9859):2095–128.

15. Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao J-H, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clinical Microbiology Reviews*. 2020 Mar 18;33(2).

16. Franco E. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries. *World Journal of Hepatology*. 2012;4(3):74.
17. Zampino R. Hepatitis B virus burden in developing countries. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(42):11941.
18. Mitchell T, Armstrong GL, Hu DJ, Wasley A, Painter JA. The Increasing Burden of Imported Chronic Hepatitis B — United States, 1974–2008. *PLoS ONE*. 2011 Dec 7;6(12):e27717.
19. Chang MS, Nguyen MH. Epidemiology of hepatitis B and the role of vaccination. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2017 Jun;31(3):239–47.
20. Zanetti AR, van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: A historical overview. *Vaccine*. 2008 Nov;26(49):6266–73.
21. Mele A, Stroffolini T, Zanetti AR. Hepatitis B in Italy: Where we are ten years after the introduction of mass vaccination. *Journal of Medical Virology*. 2002 Jul;67(3):440–3.
22. Stevens CE, Beasley RP, Tsui J, Lee W-C. Vertical Transmission of Hepatitis B Antigen in Taiwan. *New England Journal of Medicine*. 1975 Apr 10;292(15):771–4.
23. Saikia N, Talukdar R, Mazumder S, Khanna S, Tandon R. Management of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Postgraduate Medical Journal*. 2007 Jan 1;83(975):32–9.
24. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007 Feb;45(2):507–39.
25. Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2014 Dec;384(9959):2053–63.

26. Chang M-H, You S-L, Chen C-J, Liu C-J, Lee C-M, Lin S-M, Chu H-C, Wu T-C, Yang S-S, Kuo H-S, Chen D-S. Decreased Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis B Vaccinees: A 20-Year Follow-up Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2009 Oct 7;101(19):1348–55.
27. Bertoletti A, Maini MK, Ferrari C. The host–pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antiviral Therapy*. 2010;15(Suppl 3):15–24.
28. Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut*. 2012 Dec;61(12):1754–64.
29. Beasley RP. Rocks Along the Road to the Control of HBV and HCC. *Annals of Epidemiology*. 2009 Apr;19(4):231–4.
30. Candotti D, Lin CK, Belkhir D, Sakuldamrongpanich T, Biswas S, Lin S, Teo D, Ayob Y, Allain J-P. Occult hepatitis B infection in blood donors from South East Asia: molecular characterisation and potential mechanisms of occurrence. *Gut*. 2012 Dec;61(12):1744–53.
31. Hui C-K, Leung N, Yuen S-T, Zhang H-Y, Leung K-W, Lu L, Cheung SKF, Wong W-M, Lau GK. Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase. *Hepatology*. 2007 Aug;46(2):395–401.
32. Chan HL-Y, Wong VW-S, Wong GL-H, Tse C-H, Chan H-Y, Sung JJ-Y. A longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2010 Jul 20;52(4):1232–41.

33. Maruyama T, Iino S, Koike K, Yasuda K, Milich DR. Serology of acute exacerbation in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 1993 Oct;105(4):1141–51.
34. Chen Y-C, Chu C-M, Liaw Y-F. Age-specific prognosis following spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2010 Feb;51(2):435–44.
35. Tai D-I, Lin S-M, Sheen I-S, Chu C-M, Lin D-Y, Liaw Y-F. Long-term outcome of hepatitis B e antigen-negative hepatitis B surface antigen carriers in relation to changes of alanine aminotransferase levels over time. *Hepatology*. 2009 Jun;49(6):1859–67.
36. Chen Y, Sheen I–Shyan, Chu C, Liaw Y. Prognosis following spontaneous HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients with or without concurrent infection. *Gastroenterology*. 2002 Oct;123(4):1084–9.
37. Yuen M, Wong DK, Fung J, Ip P, But D, Hung I, Lau K, Yuen JC, Lai C. HBsAg Seroclearance in Chronic Hepatitis B in Asian Patients: Replicative Level and Risk of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1192–9.
38. Tseng T, Liu C, Yang H, Su T, Wang C, Chen C, Kuo SF, Liu C, Chen P, Chen D, Kao J. High Levels of Hepatitis B Surface Antigen Increase Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Low HBV Load. *Gastroenterology*. 2012 May;142(5):1140-1149.e3.
39. Simonetti J, Bulkow L, McMahon BJ, Homan C, Snowball M, Negus S, Williams J, Livingston SE. Clearance of hepatitis B surface antigen and risk of hepatocellular carcinoma in a cohort chronically infected with hepatitis B virus. *Hepatology*. 2010 May;51(5):1531–7.

40. Trépo C, Amiri M, Guillevin L. Extrahepatic Manifestations of Hepatitis B Infection. In: *Viral Hepatitis*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 154–62.
41. Trepo C, Guillevin L. Polyarteritis Nodosa and Extrahepatic Manifestations of HBV Infection: The Case Against Autoimmune Intervention in Pathogenesis. *Journal of Autoimmunity*. 2001 May;16(3):269–74.
42. Chen C-J. Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. *JAMA*. 2006 Jan 4;295(1):65.
43. Yim HJ, Lok AS-F. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: What we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*. 2006 Feb;43(S1):S173–81.
44. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5):S35–50.
45. Krause A, Haberkorn U, Mier W. Strategies for the treatment of HBV/HDV. *European Journal of Pharmacology*. 2018 Aug;833:379–91.
46. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2013 Jul;58(1):98–107.
47. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C Viral Dynamics in Vivo and the Antiviral Efficacy of Interferon- α Therapy. *Science*. 1998 Oct 2;282(5386):103–7.
48. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. 2001 Jul 5;345(1):41–52.

49. Zignego AL, de Carli M, Monti M, Careccia G, la Villa G, Giannini C, D'Elios MM, Prete G del, Gentilini P. Hepatitis C virus infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in chronically infected patients. *Journal of Medical Virology*. 1995 Sep;47(1):58–64.
50. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver International*. 2009 Jan;29:74–81.
51. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky J-M, Razavi H, Terrault N, Younossi Z. Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017 Dec 21;3(1):17006.
52. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C Paris, 26–28 February 1999. *Journal of Hepatology*. 1999 May;30(5):956–61.
53. Blach S, Zeuzem S, Manns M, Altraif I, Duberg A-S, Muljono DH, Waked I, Alavian SM, Lee M-H, Negro F, Abaalkhail F, Abdou A, Abdulla M, Rached AA, Aho I, Akarca U, al Ghazzawi I, al Kaabi S, al Lawati F, al Namaani K, al Serkal Y, Al-Busafi SA, Al-Dabal L, Aleman S, Alghamdi AS, Aljumah AA, Al-Romaihi HE, Andersson MI, Arendt V, Arkkila P, Assiri AM, Baatarkhuu O, Bane A, Ben-Ari Z, Bergin C, Bessone F, Bihl F, Bizri AR, Blachier M, Blasco AJ, Mello CEB, Bruggmann P, Brunton CR, Calinas F, Chan HLY, Chaudhry A, Cheinquer H, Chen C-J, Chien R-N, Choi MS, Christensen PB, Chuang W-L, Chulanov V, Cisneros L, Clausen MR, Cramp ME, Craxi A, Croes EA, Dalgard O, Daruich JR, de Ledinghen V, Dore GJ, El-Sayed MH, Ergör G, Esmat G, Estes C, Falconer K, Farag E, Ferraz MLG, Ferreira PR, Flisiak R, Frankova S, Gamkrelidze I, Gane E, García-Samaniego J, Khan AG, Gountas I, Goldis A, Gottfredsson M, Grebely J, Gschwantler M, Pessôa MG, Gunter J, Hajarizadeh B, Hajelssedig O, Hamid S, Hamoudi W, Hatzakis A, Himatt SM, Hofer H, Hrstic I,

Hui Y-T, Hunyady B, Idilman R, Jafri W, Jahis R, Janjua NZ, Jarčuška P, Jeruma A, Jonasson JG, Kamel Y, Kao J-H, Kaymakoglu S, Kershenobich D, Khamis J, Kim YS, Kondili L, Koutoubi Z, Krajden M, Krarup H, Lai M, Laleman W, Lao W, Lavanchy D, Lázaro P, Leleu H, Lesi O, Lesmana LA, Li M, Liakina V, Lim Y-S, Luksic B, Mahomed A, Maimets M, Makara M, Malu AO, Marinho RT, Marotta P, Mauss S, Memon MS, Correa MCM, Mendez-Sanchez N, Merat S, Metwally AM, Mohamed R, Moreno C, Mourad FH, Müllhaupt B, Murphy K, Nde H, Njouom R, Nonkovic D, Norris S, Obekpa S, Oguche S, Olafsson S, Oltman M, Omede O, Omuemu C, Opare-Sem O, Øvrehus ALH, Owusu-Ofori S, Oyunsuren TS, Papatheodoridis G, Pasini K, Peltekian KM, Phillips RO, Pimenov N, Poustchi H, Prabdial-Sing N, Qureshi H, Ramji A, Razavi-Shearer D, Razavi-Shearer K, Redae B, Reesink HW, Ridruejo E, Robbins S, Roberts LR, Roberts SK, Rosenberg WM, Roudot-Thoraval F, Ryder SD, Safadi R, Sagalova O, Salupere R, Sanai FM, Avila JFS, Saraswat V, Sarmiento-Castro R, Sarrazin C, Schmelzer JD, Schréter I, Seguin-Devaux C, Shah SR, Sharara AI, Sharma M, Shevaldin A, Shiha GE, Sievert W, Sonderup M, Souliotis K, Speiciene D, Sperl J, Stärkel P, Stauber RE, Stedman C, Struck D, Su T-H, Sypsa V, Tan S-S, Tanaka J, Thompson AJ, Tolmane I, Tomasiewicz K, Valantinas J, van Damme P, van der Meer AJ, van Thiel I, van Vlierberghe H, Vince A, Vogel W, Wedemeyer H, Weis N, Wong VW, Yaghi C, Yosry A, Yuen M, Yuniastuti E, Yusuf A, Zuckerman E, Razavi H. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2017 Mar;2(3):161–76.

54. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling M-H, Cort S, Albrecht JK. Interferon Alfa-2b Alone or in

- Combination with Ribavirin as Initial Treatment for Chronic Hepatitis C. *New England Journal of Medicine*. 1998 Nov 19;339(21):1485–92.
55. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon α 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *The Lancet*. 1998 Oct;352(9138):1426–32.
56. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1335–74.
57. Elwood C, Sauve LJ, Pick N. Preventing vertical transmission of HCV in Canada. *Canadian Medical Association Journal*. 2019 Jun 17;191(24):E650–1.
58. Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, Sacher RA, Shih JW, Purcell RH. Hepatitis C Virus–Associated Fulminant Hepatic Failure. *New England Journal of Medicine*. 1996 Aug 29;335(9):631–4.
59. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C(genotype 1b) single-source outbreak in germany: A 20-year multicenter study. *Hepatology*. 2000 Jul;32(1):91–6.
60. Wiese M, Grüngreiff K, Güthoff W, Lafrenz M, Oesen U, Porst H. Outcome in a hepatitis C (genotype 1b) single source outbreak in Germany—a 25-year multicenter study. *Journal of Hepatology*. 2005 Oct;43(4):590–8.
61. Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical Outcomes after Transfusion-Associated Hepatitis C. *New England Journal of Medicine*. 1995 Jun;332(22):1463–6.

62. Kenny-Walsh E. Clinical Outcomes after Hepatitis C Infection from Contaminated Anti-D Immune Globulin. *New England Journal of Medicine*. 1999 Apr 22;340(16):1228–33.
63. Zignego AL, Bréchet C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *Journal of Hepatology*. 1999 Aug;31(2):369–76.
64. Lee M-H, Yang H-I, Lu S-N, Jen C-L, You S-L, Wang L-Y, Wang C-H, Chen WJ, Chen C-J. Chronic Hepatitis C Virus Infection Increases Mortality From Hepatic and Extrahepatic Diseases: A Community-Based Long-Term Prospective Study. *Journal of Infectious Diseases*. 2012 Aug 15;206(4):469–77.
65. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2015 Dec;44(4):717–34.
66. Jamal MM, Saadi Z, Morgan TR. Alcohol and Hepatitis C. *Digestive Diseases*. 2005;23(3–4):285–96.
67. Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 β -estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*. 2010 Nov;54(11):684–90.
68. Ezhilarasan D. Critical role of estrogen in the progression of chronic liver diseases. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2020 Oct;19(5):429–34.
69. Mavilia MG, Wu GY. HBV-HCV Coinfection: Viral Interactions, Management, and Viral Reactivation. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2018 Sep 28;6(3):1–10.
70. Hu J, Liu K, Luo J. HIV–HBV and HIV–HCV Coinfection and Liver Cancer Development. In 2019. p. 231–50.

71. Liver-Related Deaths in Persons Infected With the Human Immunodeficiency Virus. *Archives of Internal Medicine*. 2006 Aug 14;166(15):1632.
72. Rosenthal E, Pialoux G, Bernard N, Pradier C, Rey D, Bentata M, Michelet C, Pol S, Perronne C, Cacoub P. Liver-related mortality in human-immunodeficiency-virus-infected patients between 1995 and 2003 in the French GERMIVIC Joint Study Group Network (MORTAVIC 2003 Study). *Journal of Viral Hepatitis*. 2007 Mar;14(3):183–8.
73. Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y, Katoh Y, Okita K. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. *Hepatology*. 1999 Jan;29(1):217–22.
74. Sebastiani M, Giuggioli D, Colaci M, Fallahi P, Gragnani L, Antonelli A, Zignego AL, Ferri C. HCV-Related Rheumatic Manifestations and Therapeutic Strategies. *Current Drug Targets*. 2017 Apr 28;18(7):803–10.
75. Horcajada JP, Garcia-bengoechea M, Cilia G, Etxaniz P, Cuadrado E, Arenas JI. Mixed cryoglobulinaemia in patients with chronic hepatitis C infection: prevalence, significance and relationship with different viral genotypes. *Annals of Medicine*. 1999 Jan 8;31(5):352–8.
76. Heckmann JG, Kayser C, Heuss D, Manger B, Blum HE, Neundörfer B. Neurological manifestations of chronic hepatitis C. *Journal of Neurology*. 1999 Jun 25;246(6):486–91.
77. Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A Role for Hepatitis C Virus Infection in Type II Cryoglobulinemia. *New England Journal of Medicine*. 1992 Nov 19;327(21):1490–5.

78. Silvestri F, Pipan C, Barillari G, Zaja F, Fanin R, Infanti L, Russo D, Falasca E, Botta G, Baccarani M. Prevalence of hepatitis C virus infection in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4296–301.
79. Zuckerman E. Hepatitis C Virus Infection in Patients with B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Annals of Internal Medicine*. 1997 Sep 15;127(6):423.
80. Fargion S, Piperno A, Cappellini MD, Sampietro M, Fracanzani AL, Romano R, Caldarelli R, Marcelli R, Vecchi L, Fiorelli G. Hepatitis C virus and porphyria cutanea tarda: Evidence of a strong association. *Hepatology*. 1992 Dec;16(6):1322–6.
81. Haddad J, Trinchet J-C, Pateron D, Mal F, Beaugrand M, Munz-Gotheil C, Callard P, Ambrosini J-C. Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *The Lancet*. 1992 Feb;339(8789):321–3.
82. Tanei R, Watanabe K, Nishiyama S. Clinical and Histopathologic Analysis of the Relationship between Lichen Planus and Chronic Hepatitis C. *The Journal of Dermatology*. 1995 May;22(5):316–23.
83. Adinolfi LE, Restivo L, Zampino R, Guerrera B, Lonardo A, Ruggiero L, Riello F, Loria P, Florio A. Chronic HCV infection is a risk of atherosclerosis. Role of HCV and HCV-related steatosis. *Atherosclerosis*. 2012 Apr;221(2):496–502.
84. Kuna L, Jakab J, Smolic R, Wu GY, Smolic M. HCV Extrahepatic Manifestations. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2019 Mar 28;7(X):1–11.
85. Roed T, Lebech A-M, Kjaer A, Weis N. Hepatitis C virus infection and risk of coronary artery disease: a systematic review of the literature. *Clinical Physiology and Functional Imaging*. 2012 Nov;32(6):421–30.

86. Baumert TF, Berg T, Lim JK, Nelson DR. Status of Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection and Remaining Challenges. *Gastroenterology*. 2019 Jan;156(2):431–45.
87. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018 Jan;67(1):328–57.
88. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016 Jul;64(1):73–84.
89. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology*. 2013 Mar;58(3):593–608.
90. Welsh JA, Karpen S, Vos MB. Increasing Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Among United States Adolescents, 1988-1994 to 2007-2010. *The Journal of Pediatrics*. 2013 Mar;162(3):496-500.e1.
91. Goldberg D, Ditah IC, Saeian K, Lalehzari M, Aronsohn A, Gorospe EC, Charlton M. Changes in the Prevalence of Hepatitis C Virus Infection, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Alcoholic Liver Disease Among Patients With Cirrhosis or Liver Failure on the Waitlist for Liver Transplantation. *Gastroenterology*. 2017 Apr;152(5):1090-1099.e1.
92. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*. 2015 Apr;62(1):S47–64.
93. Sookoian S, Pirola CJ. Genetic predisposition in nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical and Molecular Hepatology*. 2017 Mar 25;23(1):1–12.

94. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*. 2018 Jul 2;24(7):908–22.
95. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*. 2009 Apr 30;2(5–6):231–7.
96. Käräjämäki AJ, Bloigu R, Kauma H, Kesäniemi YA, Koivurova O-P, Perkiömäki J, Huikuri H, Ukkola O. Non-alcoholic fatty liver disease with and without metabolic syndrome: Different long-term outcomes. *Metabolism*. 2017 Jan;66:55–63.
97. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016 Aug;65(8):1038–48.
98. Michelotti GA, Machado M v., Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2013 Nov 1;10(11):656–65.
99. Zelber-Sagi S, Lotan R, Shlomai A, Webb M, Harrari G, Buch A, Nitzan Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up. *Journal of Hepatology*. 2012 May;56(5):1145–51.
100. Chang Y, Ryu S, Sung E, Woo H-Y, Cho S-I, Yoo S-H, Ahn H-Y, Choi N-K. Weight gain within the normal weight range predicts ultrasonographically detected fatty liver in healthy Korean men. *Gut*. 2009 Oct 1;58(10):1419–25.
101. Kim H-K, Lee G-E, Jeon S-H, Kim J-H, Park J-Y, Lee K-U, Kim C-H. Effect of Body Weight and Lifestyle Changes on Long-Term Course of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Koreans. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2009 Feb;337(2):98–102.

102. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016 Jul;64(1):73–84.
103. Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2004 Mar;2(3):262–5.
104. Hossain N, Afendy A, Stepanova M, Nader F, Srishord M, Rafiq N, Goodman Z, Younossi Z. Independent Predictors of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009 Nov;7(11):1224-1229.e2.
105. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2005 May 2;115(5):1343–51.
106. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered Fat Storage and Mobilization in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*. 2002 Apr 1;23(2):201–29.
107. Wiggins D, Gibbons GF. The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. *Biochemical Journal*. 1992 Jun 1;284(2):457–62.
108. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, Johnson RJ, Abdelmalek MF. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2008 Jun;48(6):993–9.

109. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010 Aug;52(2):774–88.
110. Mundi MS, Velapati S, Patel J, Kellogg TA, Abu Dayyeh BK, Hurt RT. Evolution of NAFLD and Its Management. *Nutrition in Clinical Practice*. 2020 Feb;35(1):72–84.
111. Kechagias S, Ernerson A, Dahlqvist O, Lundberg P, Lindstrom T, Nystrom FH. Fast-food-based hyper-alimentation can induce rapid and profound elevation of serum alanine aminotransferase in healthy subjects. *Gut*. 2008 May 1;57(5):649–54.
112. Kawamura Y, Arase Y, Ikeda K, Seko Y, Imai N, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Sezaki H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Ohmoto Y, Amakawa K, Tsuji H, Kumada H. Large-Scale Long-Term Follow-Up Study of Japanese Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease for the Onset of Hepatocellular Carcinoma. *American Journal of Gastroenterology*. 2012 Feb;107(2):253–61.
113. Angulo P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: Is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology*. 2010 Feb;51(2):373–5.
114. Sanyal A, Poklepovic A, Moyneur E, Barghout V. Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. *Current Medical Research and Opinion*. 2010 Sep 1;26(9):2183–91.
115. Stine JG, Wentworth BJ, Zimmet A, Rinella ME, Loomba R, Caldwell SH, Argo CK. Systematic review with meta-analysis: risk of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis without cirrhosis compared to other liver diseases. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2018 Oct;48(7):696–703.

116. Kanwal F, Kramer JR, Mapakshi S, Natarajan Y, Chayanupatkul M, Richardson PA, Li L, Desiderio R, Thrift AP, Asch SM, Chu J, El-Serag HB. Risk of Hepatocellular Cancer in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2018 Dec;155(6):1828-1837.e2.
117. Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):113–21.
118. Dunn W, Xu R, Wingard DL, Rogers C, Angulo P, Younossi ZM, Schwimmer JB. Suspected Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mortality Risk in a Population-Based Cohort Study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2008 Sep;103(9):2263–71.
119. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *Journal of Hepatology*. 2016 Sep;65(3):589–600.
120. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Sanyal A, Neuschwander-Tetri B, Tiribelli C, Kleiner DE, Brunt E, Bugianesi E, Yki-Järvinen H, Grønbaek H, Cortez-Pinto H, George J, Fan J, Valenti L, Abdelmalek M, Romero-Gomez M, Rinella M, Arrese M, Eslam M, Bedossa P, Newsome PN, Anstee QM, Jalan R, Bataller R, Loomba R, Sookoian S, Sarin SK, Harrison S, Kawaguchi T, Wong VW-S, Ratziu V, Yilmaz Y, Younossi Z. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020 May;158(7):1999-2014.e1.
121. Singal AK, Anand BS. Recent trends in the epidemiology of alcoholic liver disease. *Clinical Liver Disease*. 2013 Apr;2(2):53–6.

122. Mandayam S, Jamal MM, Morgan TR. Epidemiology of Alcoholic Liver Disease. *Seminars in Liver Disease*. 2004 Aug;24(3):217–32.
123. Organization WH. Global status report on alcohol and health 2018. World Health Organization; 2019.
124. Gao B, Bataller R. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1572–85.
125. Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, Chaput J-C, Naveau S. Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology*. 2002 Mar;35(3):635–8.
126. Singal AK, Anand BS. Mechanisms of Synergy Between Alcohol and Hepatitis C Virus. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2007 Sep;41(8):761–72.
127. Rocco A. Alcoholic disease: Liver and beyond. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(40):14652.
128. Kamper-Jørgensen M, Grønbaek M, Tolstrup J, Becker U. Alcohol and cirrhosis: dose–response or threshold effect? *Journal of Hepatology*. 2004 Jul;41(1):25–30.
129. Ramstedt M. Per capita alcohol consumption and liver cirrhosis mortality in 14 European countries. *Addiction*. 2001 Feb 15;96(1):19–33.
130. Osna NA, Donohue TM, Kharbanda KK. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol research : current reviews*. 2017;38(2):147–61.
131. Teli MR, Day CP, James OFW, Burt AD, Bennett MK. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *The Lancet*. 1995 Oct;346(8981):987–90.
132. Ishak KG, Zimmerman HJ, Ray MB. Alcoholic Liver Disease: Pathologic, Pathogenetic and Clinical Aspects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1991 Feb;15(1):45–66.

133. Seth D, Haber PS, Syn W-K, Diehl AM, Day CP. Pathogenesis of alcohol-induced liver disease: Classical concepts and recent advances. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2011 Jul;26(7):1089–105.
134. CHEN A. Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor- β 1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells. *Biochemical Journal*. 2002 Dec 15;368(3):683–93.
135. Niemelä O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001 Dec 15;31(12):1533–8.
136. Brooks PJ, Zakhari S. Acetaldehyde and the genome: Beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2014 Mar;55(2):77–91.
137. Kenney WC. Acetaldehyde Adducts of Phospholipids. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1982 Jun;6(3):412–6.
138. Donohue TM, Tuma DJ, Sorrell MF. Acetaldehyde adducts with proteins: Binding of [^{14}C]acetaldehyde to serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1983 Jan;220(1):239–46.
139. Jr TMD. Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(37):4974.
140. Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, Klassen LW, Sorrell MF. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology*. 1996 Apr;23(4):872–80.
141. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *Journal of Hepatology*. 2001 Aug;35(2):297–306.
142. Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol

- abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *Journal of Hepatology*. 2000 May;32(5):742–7.
143. Su GL, Klein RD, Aminlari A, Zhang HY, Steintraesser L, Alarcon WH, Remick DG, Wang SC. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: Role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology*. 2000 Apr;31(4):932–6.
144. Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C. I. TNF-induced liver injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1998 Sep 1;275(3):G387–92.
145. Kang L, Chen X, Sebastian BM, Pratt BT, Bederman IR, Alexander JC, Previs SF, Nagy LE. Chronic Ethanol and Triglyceride Turnover in White Adipose Tissue in Rats. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Sep;282(39):28465–73.
146. Wang Z-G. Adipose tissue-liver axis in alcoholic liver disease. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2016;7(1):17.
147. Wei X, Shi X, Zhong W, Zhao Y, Tang Y, Sun W, Yin X, Bogdanov B, Kim S, McClain C, Zhou Z, Zhang X. Chronic Alcohol Exposure Disturbs Lipid Homeostasis at the Adipose Tissue-Liver Axis in Mice: Analysis of Triacylglycerols Using High-Resolution Mass Spectrometry in Combination with In Vivo Metabolite Deuterium Labeling. *PLoS ONE*. 2013 Feb 6;8(2):e55382.
148. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *The Lancet*. 2008 Mar;371(9615):838–51.
149. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*. 2019 Jan;70(1):151–71.
150. Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, Abbasi-Kangevari M, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M,

Abdollahpour I, Abolhassani H, Aboyans V, Abrams EM, Abreu LG, Abrigo MRM, Abu-Raddad LJ, Abushouk AI, Acebedo A, Ackerman IN, Adabi M, Adamu AA, Adebayo OM, Adekanmbi V, Adelson JD, Adetokunboh OO, Adham D, Afshari M, Afshin A, Agardh EE, Agarwal G, Agesa KM, Aghaali M, Aghamir SMK, Agrawal A, Ahmad T, Ahmadi A, Ahmadi M, Ahmadi H, Ahmadpour E, Akalu TY, Akinyemi RO, Akinyemiju T, Akombi B, Al-Aly Z, Alam K, Alam N, Alam S, Alam T, Alanzi TM, Albertson SB, Alcalde-Rabanal JE, Alema NM, Ali M, Ali S, Alicandro G, Alijanzadeh M, Alinia C, Alipour V, Aljunid SM, Alla F, Allebeck P, Almasi-Hashiani A, Alonso J, Al-Raddadi RM, Altirkawi KA, Alvis-Guzman N, Alvis-Zakzuk NJ, Amini S, Amini-Rarani M, Aminorroaya A, Amiri F, Amit AML, Amugsi DA, Amul GGH, Anderlini D, Andrei CL, Andrei T, Anjomshoa M, Ansari F, Ansari I, Ansari-Moghaddam A, Antonio CAT, Antony CM, Antriyandarti E, Anvari D, Anwer R, Arabloo J, Arab-Zozani M, Aravkin AY, Ariani F, Ärnlov J, Aryal KK, Arzani A, Asadi-Aliabadi M, Asadi-Pooya AA, Asghari B, Ashbaugh C, Atnafu DD, Atre SR, Ausloos F, Ausloos M, Ayala Quintanilla BP, Ayano G, Ayanore MA, Aynalem YA, Azari S, Azarian G, Azene ZN, Babae E, Badawi A, Bagherzadeh M, Bakhshaei MH, Bakhtiari A, Balakrishnan S, Balalla S, Balassyano S, Banach M, Banik PC, Bannick MS, Bante AB, Baraki AG, Barboza MA, Barker-Collo SL, Barthelemy CM, Barua L, Barzegar A, Basu S, Baune BT, Bayati M, Bazmandegan G, Bedi N, Beghi E, Béjot Y, Bello AK, Bender RG, Bennett DA, Bennitt FB, Bensenor IM, Benziger CP, Berhe K, Bernabe E, Bertolacci GJ, Bhageerathy R, Bhala N, Bhandari D, Bhardwaj P, Bhattacharyya K, Bhutta ZA, Bibi S, Biehl MH, Bikbov B, bin Sayeed MS, Biondi A, Birihane BM, Bisanzio D, Bisignano C, Biswas RK, Bohlouli S, Bohluli M, Bolla SRR, Boloor A, Boon-

Dooley AS, Borges G, Borzi AM, Bourne R, Brady OJ, Brauer M, Brayne C, Breitborde NJK, Brenner H, Briant PS, Briggs AM, Briko NI, Britton GB, Bryazka D, Buchbinder R, Bumgarner BR, Busse R, Butt ZA, Caetano dos Santos FL, Cámara LLA, Campos-Nonato IR, Car J, Cárdenas R, Carreras G, Carrero JJ, Carvalho F, Castaldelli-Maia JM, Castañeda-Orjuela CA, Castelpietra G, Castle CD, Castro F, Catalá-López F, Causey K, Cederroth CR, Cercy KM, Cerin E, Chandan JS, Chang AR, Charlson FJ, Chattu VK, Chaturvedi S, Chimed-Ochir O, Chin KL, Cho DY, Christensen H, Chu D-T, Chung MT, Cicuttini FM, Ciobanu LG, Cirillo M, Collins EL, Compton K, Conti S, Cortesi PA, Costa VM, Cousin E, Cowden RG, Cowie BC, Cromwell EA, Cross DH, Crowe CS, Cruz JA, Cunningham M, Dahlawi SMA, Damiani G, Dandona L, Dandona R, Darwesh AM, Daryani A, Das JK, das Gupta R, das Neves J, Dávila-Cervantes CA, Davletov K, de Leo D, Dean FE, DeCleene NK, Deen A, Degenhardt L, Dellavalle RP, Demeke FM, Demsie DG, Denova-Gutiérrez E, Dereje ND, Dervenis N, Desai R, Desalew A, Dessie GA, Dharmaratne SD, Dhungana GP, Dianatinasab M, Diaz D, Dibaji Forooshani ZS, Dingels Z v, Dirac MA, Djalalinia S, Do HT, Dokova K, Dorostkar F, Doshi CP, Doshmangir L, Douiri A, Doxey MC, Driscoll TR, Dunachie SJ, Duncan BB, Duraes AR, Eagan AW, Ebrahimi Kalan M, Edvardsson D, Ehrlich JR, el Nahas N, el Sayed I, el Tantawi M, Elbarazi I, Elgendy IY, Elhabashy HR, El-Jaafary SI, Elyazar IR, Emamian MH, Emmons-Bell S, Erskine HE, Eshrati B, Eskandarieh S, Esmaeilnejad S, Esmaeilzadeh F, Esteghamati A, Estep K, Etemadi A, Etisso AE, Farahmand M, Faraj A, Fareed M, Faridnia R, Farinha CS e S, Farioli A, Faro A, Faruque M, Farzadfar F, Fattahi N, Fazlzadeh M, Feigin VL, Feldman R, Fereshtehnejad S-M, Fernandes E, Ferrari AJ, Ferreira ML, Filip I, Fischer F, Fisher JL, Fitzgerald R,

Flohr C, Flor LS, Foigt NA, Folayan MO, Force LM, Fornari C, Foroutan M, Fox JT, Freitas M, Fu W, Fukumoto T, Furtado JM, Gad MM, Gakidou E, Galles NC, Gallus S, Gamkrelidze A, Garcia-Basteiro AL, Gardner WM, Geberemariyam BS, Gebrehiwot AM, Gebremedhin KB, Gebreslassie AAAA, Gershberg Hayoon A, Gething PW, Ghadimi M, Ghadiri K, Ghafourifard M, Ghajar A, Ghamari F, Ghashghaee A, Ghiasvand H, Ghith N, Gholamian A, Gilani SA, Gill PS, Gitimoghaddam M, Giussani G, Goli S, Gomez RS, Gopalani SV, Gorini G, Gorman TM, Gottlich HC, Goudarzi H, Goulart AC, Goulart BNG, Grada A, Grivna M, Grosso G, Gubari MIM, Gugnani HC, Guimaraes ALS, Guimarães RA, Guled RA, Guo G, Guo Y, Gupta R, Haagsma JA, Haddock B, Hafezi-Nejad N, Hafiz A, Hagins H, Haile LM, Hall BJ, Halvaei I, Hamadeh RR, Hamagharib Abdullah K, Hamilton EB, Han C, Han H, Hankey GJ, Haro JM, Harvey JD, Hasaballah AI, Hasanzadeh A, Hashemian M, Hassanipour S, Hassankhani H, Havmoeller RJ, Hay RJ, Hay SI, Hayat K, Heidari B, Heidari G, Heidari-Soureshjani R, Hendrie D, Henrikson HJ, Henry NJ, Herteliu C, Heydarpour F, Hird TR, Hoek HW, Hole MK, Holla R, Hoogar P, Hosgood HD, Hosseinzadeh M, Hostiuc M, Hostiuc S, Househ M, Hoy DG, Hsairi M, Hsieh VC, Hu G, Huda TM, Hugo FN, Huynh CK, Hwang B-F, Iannucci VC, Ibitoye SE, Ikuta KS, Ilesanmi OS, Ilic IM, Ilic MD, Inbaraj LR, Ippolito H, Irvani SSN, Islam MM, Islam M, Islam SMS, Islami F, Iso H, Ivers RQ, Iwu CCD, Iyamu IO, Jaafari J, Jacobsen KH, Jadidi-Niaragh F, Jafari H, Jafarinia M, Jahagirdar D, Jahani MA, Jahanmehr N, Jakovljevic M, Jalali A, Jalilian F, James SL, Janjani H, Janodia MD, Jayatilleke AU, Jeemon P, Jenabi E, Jha RP, Jha V, Ji JS, Jia P, John O, John-Akinola YO, Johnson CO, Johnson SC, Jonas JB, Joo T, Joshi A, Jozwiak JJ, Jürisson M, Kabir A, Kabir Z, Kalani H, Kalani R, Kalankesh LR, Kalhor R,

Kamiab Z, Kanchan T, Karami Matin B, Karch A, Karim MA, Karimi SE, Kassa GM, Kassebaum NJ, Katikireddi SV, Kawakami N, Kayode GA, Keddie SH, Keller C, Kereselidze M, Khafaie MA, Khalid N, Khan M, Khatab K, Khater MM, Khatib MN, Khayamzadeh M, Khodayari MT, Khundkar R, Kianipour N, Kieling C, Kim D, Kim Y-E, Kim YJ, Kimokoti RW, Kisa A, Kisa S, Kissimova-Skarbek K, Kivimäki M, Kneib CJ, Knudsen AKS, Kocarnik JM, Kolola T, Kopec JA, Kosen S, Koul PA, Koyanagi A, Kravchenko MA, Krishan K, Krohn KJ, Kuate Defo B, Kucuk Bicer B, Kumar GA, Kumar M, Kumar P, Kumar V, Kumares G, Kurmi OP, Kusuma D, Kyu HH, la Vecchia C, Lacey B, Lal DK, Laloo R, Lam JO, Lami FH, Landires I, Lang JJ, Lansingh VC, Larson SL, Larsson AO, Lasrado S, Lassi ZS, Lau KM-M, Lavados PM, Lazarus J v, Ledesma JR, Lee PH, Lee SWH, LeGrand KE, Leigh J, Leonardi M, Lescinsky H, Leung J, Levi M, Lewington S, Li S, Lim L-L, Lin C, Lin R-T, Linehan C, Linn S, Liu H-C, Liu S, Liu Z, Looker KJ, Lopez AD, Lopukhov PD, Lorkowski S, Lotufo PA, Lucas TCD, Lugo A, Lunevicius R, Lyons RA, Ma J, MacLachlan JH, Maddison ER, Maddison R, Madotto F, Mahasha PW, Mai HT, Majeed A, Maled V, Maleki S, Malekzadeh R, Malta DC, Mamun AA, Manafi A, Manafi N, Manguerra H, Mansouri B, Mansournia MA, Mantilla Herrera AM, Maravilla JC, Marks A, Martins-Melo FR, Martopullo I, Masoumi SZ, Massano J, Massenburg BB, Mathur MR, Maulik PK, McAlinden C, McGrath JJ, McKee M, Mehndiratta MM, Mehri F, Mehta KM, Meitei WB, Memiah PTN, Mendoza W, Menezes RG, Mengesha EW, Mengesha MB, Mereke A, Meretoja A, Meretoja TJ, Mestrovic T, Miazgowski B, Miazgowski T, Michalek IM, Mihretie KM, Miller TR, Mills EJ, Mirica A, Mirrakhimov EM, Mirzaei H, Mirzaei M, Mirzaei-Alavijeh M, Misganaw AT, Mithra P, Moazen B, Moghadaszadeh M, Mohamadi E,

Mohammad DK, Mohammad Y, Mohammad Gholi Mezerji N, Mohammadian-Hafshejani A, Mohammadifard N, Mohammadpourhodki R, Mohammed S, Mokdad AH, Molokhia M, Momen NC, Monasta L, Mondello S, Mooney MD, Moosazadeh M, Moradi G, Moradi M, Moradi-Lakeh M, Moradzadeh R, Moraga P, Morales L, Morawska L, Moreno Velásquez I, Morgado-da-Costa J, Morrison SD, Mosser JF, Mouodi S, Mousavi SM, Mousavi Khaneghah A, Mueller UO, Munro SB, Muriithi MK, Musa KI, Muthupandian S, Naderi M, Nagarajan AJ, Nagel G, Naghshtabrizi B, Nair S, Nandi AK, Nangia V, Nansseu JR, Nayak VC, Nazari J, Negoï I, Negoï RI, Netsere HBN, Ngunjiri JW, Nguyen CT, Nguyen J, Nguyen M, Nguyen M, Nichols E, Nigatu D, Nigatu YT, Nikbakhsh R, Nixon MR, Nnaji CA, Nomura S, Norrving B, Noubiap JJ, Nowak C, Nunez-Samudio V, Oțoiu A, Oancea B, Odell CM, Ogbo FA, Oh I-H, Okunga EW, Oladnabi M, Olagunju AT, Olusanya BO, Olusanya JO, Oluwasanu MM, Omar Bali A, Omer MO, Ong KL, Onwujekwe OE, Orji AU, Orpana HM, Ortiz A, Ostroff SM, Otstavnov N, Otstavnov SS, Øverland S, Owolabi MO, P A M, Padubidri JR, Pakhare AP, Palladino R, Pana A, Panda-Jonas S, Pandey A, Park E-K, Parmar PGK, Pasupula DK, Patel SK, Paternina-Caicedo AJ, Pathak A, Pathak M, Patten SB, Patton GC, Paudel D, Pazoki Toroudi H, Peden AE, Pennini A, Pepito VCF, Peprah EK, Pereira A, Pereira DM, Perico N, Pham HQ, Phillips MR, Pigott DM, Pilgrim T, Pilz TM, Pirsahab M, Plana-Ripoll O, Plass D, Pokhrel KN, Polibin R v, Polinder S, Polkinghorne KR, Postma MJ, Pourjafar H, Pourmalek F, Pourmirza Kalhori R, Pourshams A, Poznańska A, Prada SI, Prakash V, Pribadi DRA, Pupillo E, Quazi Syed Z, Rabiee M, Rabiee N, Radfar A, Rafiee A, Rafiei A, Raggi A, Rahimi-Movaghar A, Rahman MA, Rajabpour-Sanati A, Rajati F, Ramezanzadeh K, Ranabhat CL, Rao PC, Rao SJ, Rasella D, Rastogi P, Rathi P,

Rawaf DL, Rawaf S, Rawal L, Razo C, Redford SB, Reiner RC, Reinig N, Reitsma MB, Remuzzi G, Renjith V, Renzaho AMN, Resnikoff S, Rezaei N, Rezai M sadegh, Rezapour A, Rhinehart P-A, Riahi SM, Ribeiro ALP, Ribeiro DC, Ribeiro D, Rickard J, Roberts NLS, Roberts S, Robinson SR, Roever L, Rolfe S, Ronfani L, Roshandel G, Roth GA, Rubagotti E, Rumisha SF, Sabour S, Sachdev PS, Saddik B, Sadeghi E, Sadeghi M, Saeidi S, Safi S, Safiri S, Sagar R, Sahebkar A, Sahraian MA, Sajadi SM, Salahshoor MR, Salamati P, Salehi Zahabi S, Salem H, Salem MRR, Salimzadeh H, Salomon JA, Salz I, Samad Z, Samy AM, Sanabria J, Santomauro DF, Santos IS, Santos JV, Santric-Milicevic MM, Saraswathy SYI, Sarmiento-Suárez R, Sarrafzadegan N, Sartorius B, Sarveazad A, Sathian B, Sathish T, Sattin D, Sbarra AN, Schaeffer LE, Schiavolin S, Schmidt MI, Schutte AE, Schwebel DC, Schwendicke F, Senbeta AM, Senthilkumaran S, Sepanlou SG, Shackelford KA, Shadid J, Shahabi S, Shaheen AA, Shaikh MA, Shalash AS, Shams-Beyranvand M, Shamsizadeh M, Shannawaz M, Sharafi K, Sharara F, Sheena BS, Sheikhtaheri A, Shetty RS, Shibuya K, Shiferaw WS, Shigematsu M, Shin J il, Shiri R, Shirkoohi R, Shrim MG, Shuval K, Siabani S, Sigfusdottir ID, Sigurvinsdottir R, Silva JP, Simpson KE, Singh A, Singh JA, Skiadaresi E, Skou STS, Skryabin VY, Sobngwi E, Sokhan A, Soltani S, Sorensen RJD, Soriano JB, Sorrie MB, Soyiri IN, Sreeramareddy CT, Stanaway JD, Stark BA, Ştefan SC, Stein C, Steiner C, Steiner TJ, Stokes MA, Stovner LJ, Stubbs JL, Sudaryanto A, Sufiyan MB, Sulo G, Sultan I, Sykes BL, Sylte DO, Szócska M, Tabarés-Seisdedos R, Tabb KM, Tadakamadla SK, Taherkhani A, Tajdini M, Takahashi K, Taveira N, Teagle WL, Teame H, Tehrani-Banihashemi A, Teklehaimanot BF, Terrason S, Tessema ZT, Thankappan KR, Thomson AM, Tohidinik HR, Tonelli M, Topor-Madry R, Torre

AE, Touvier M, Tovani-Palone MRR, Tran BX, Travillian R, Troeger CE, Truelsen TC, Tsai AC, Tsatsakis A, Tudor Car L, Tyrovolas S, Uddin R, Ullah S, Undurraga EA, Unnikrishnan B, Vacante M, Vakilian A, Valdez PR, Varughese S, Vasankari TJ, Vasseghian Y, Venketasubramanian N, Violante FS, Vlassov V, Vollset SE, Vongpradith A, Vukovic A, Vukovic R, Waheed Y, Walters MK, Wang J, Wang Y, Wang Y-P, Ward JL, Watson A, Wei J, Weintraub RG, Weiss DJ, Weiss J, Westerman R, Whisnant JL, Whiteford HA, Wiangkham T, Wiens KE, Wijeratne T, Wilner LB, Wilson S, Wojtyniak B, Wolfe CDA, Wool EE, Wu A-M, Wulf Hanson S, Wunrow HY, Xu G, Xu R, Yadgir S, Yahyazadeh Jabbari SH, Yamagishi K, Yaminfirooz M, Yano Y, Yaya S, Yazdi-Feyzabadi V, Yearwood JA, Yeheyis TY, Yeshitila YG, Yip P, Yonemoto N, Yoon S-J, Yoosefi Lebni J, Younis MZ, Younker TP, Yousefi Z, Yousefifard M, Yousefinezhadi T, Yousuf AY, Yu C, Yusefzadeh H, Zahirian Moghadam T, Zaki L, Zaman S bin, Zamani M, Zamanian M, Zandian H, Zangeneh A, Zastrozhin MS, Zewdie KA, Zhang Y, Zhang Z-J, Zhao JT, Zhao Y, Zheng P, Zhou M, Ziapour A, Zimsen SRM, Naghavi M, Murray CJL. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2020 Oct;396(10258):1204–22.

151. Ginès P, Krag A, Abraldes JG, Solà E, Fabrellas N, Kamath PS. Liver cirrhosis. *The Lancet*. 2021 Oct;398(10308):1359–76.
152. Sepanlou SG, Safiri S, Bisignano C, Ikuta KS, Merat S, Saberifiroozi M, Poustchi H, Tsoi D, Colombara D v, Abdoli A, Adedoyin RA, Afarideh M, Agrawal S, Ahmad S, Ahmadian E, Ahmadpour E, Akinyemiju T, Akunna CJ, Alipour V, Almasi-Hashiani A, Almulhim AM, Al-Raddadi RM, Alvis-Guzman N, Anber

NH, Angus C, Anoushiravani A, Arabloo J, Araya EM, Asmelash D, Ataeinia B, Ataro Z, Atout MMW, Ausloos F, Awasthi A, Badawi A, Banach M, Bejarano Ramirez DF, Bhagavathula AS, Bhala N, Bhattacharyya K, Biondi A, Bolla SR, Boloor A, Borzi AM, Butt ZA, Cámara LLA, Campos-Nonato IR, Carvalho F, Chu D-T, Chung S-C, Cortesi PA, Costa VM, Cowie BC, Daryani A, de Courten B, Demoz GT, Desai R, Dharmaratne SD, Djalalinia S, Do HT, Dorostkar F, Drake TM, Dubey M, Duncan BB, Effiong A, Eftekhari A, Elsharkawy A, Etemadi A, Farahmand M, Farzadfar F, Fernandes E, Filip I, Fischer F, Gebremedhin KBB, Geta B, Gilani SA, Gill PS, Gutierrez RA, Haile MT, Haj-Mirzaian A, Hamid SS, Hasankhani M, Hasanzadeh A, Hashemian M, Hassen HY, Hay SI, Hayat K, Heidari B, Henok A, Hoang CL, Hostiuc M, Hostiuc S, Hsieh VC, Igumbor EU, Ilesanmi OS, Irvani SSN, Jafari Balalami N, James SL, Jeemon P, Jha RP, Jonas JB, Jozwiak JJ, Kabir A, Kasaeian A, Kassaye HG, Kefale AT, Khalilov R, Khan MA, Khan EA, Khater A, Kim YJ, Koyanagi A, la Vecchia C, Lim L-L, Lopez AD, Lorkowski S, Lotufo PA, Lozano R, Magdy Abd El Razek M, Mai HT, Manafi N, Manafi A, Mansournia MA, Mantovani LG, Mazzaglia G, Mehta D, Mendoza W, Menezes RG, Mengesha MM, Meretoja TJ, Mestrovic T, Miazgowski B, Miller TR, Mirrakhimov EM, Mithra P, Moazen B, Moghadaszadeh M, Mohammadian-Hafshejani A, Mohammed S, Mokdad AH, Montero-Zamora PA, Moradi G, Naimzada MD, Nayak V, Negoï I, Nguyen TH, Ofori-Asenso R, Oh I-H, Olagunju TO, Padubidri JR, Pakshir K, Pana A, Pathak M, Pourshams A, Rabiee N, Radfar A, Rafiei A, Ramezanzadeh K, Rana SMM, Rawaf S, Rawaf DL, Reiner RC, Roever L, Room R, Roshandel G, Safari S, Samy AM, Sanabria J, Sartorius B, Schmidt MI, Senthilkumaran S, Shaikh MA, Sharif M, Sharifi A, Shigematsu M, Singh JA, Soheili A, Suleria HAR,

- Teklehaimanot BF, Tesfay BE, Vacante M, Vahedian-Azimi A, Valdez PR, Vasankari TJ, Vu GT, Waheed Y, Weldegewergs KG, Werdecker A, Westerman R, Wondafrash DZ, Wondmienen AB, Yeshitila YG, Yonemoto N, Yu C, Zaidi Z, Zarghi A, Zelber-Sagi S, Zewdie KA, Zhang Z-J, Zhao X-J, Naghavi M, Malekzadeh R. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2020 Mar;5(3):245–66.
153. Pose E, Pera G, Torán P, Gratacós-Ginès J, Avitabile E, Expósito C, Díaz A, Graupera I, Rubio AB, Ginès P, Fabrellas N, Caballeria L. Interaction between metabolic syndrome and alcohol consumption, risk factors of liver fibrosis: A population-based study. *Liver International*. 2021 Jul 11;41(7):1556–64.
154. Szabo G, Saha B, Bukong TN. Alcohol and HCV: Implications for Liver Cancer. In 2015. p. 197–216.
155. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. In: *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2013. p. 1473–92.
156. Zhou W-C. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(23):7312.
157. Jung YK, Yim HJ. Reversal of liver cirrhosis: current evidence and expectations. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2017 Mar 1;32(2):213–28.
158. Hytioglou P, Theise ND. Regression of human cirrhosis: an update, 18 years after the pioneering article by Wanless et al. *Virchows Archiv*. 2018 Jul 27;473(1):15–22.
159. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression

- is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 1996 Jul;24(1):176–84.
160. Campana L, Iredale J. Regression of Liver Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*. 2017 Feb 15;37(01):001–10.
161. Roderfeld M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix Biology*. 2018 Aug;68–69:452–62.
162. Acute-on-Chronic Liver Failure. *New England Journal of Medicine*. 2020 Aug 27;383(9):892–4.
163. D’Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *Journal of Hepatology*. 2006 Jan;44(1):217–31.
164. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*. 2018 Mar;391(10127):1301–14.
165. Peng Y, Qi X, Guo X. Child–Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis. *Medicine*. 2016 Feb;95(8):e2877.
166. <https://digestivedashboard.nl/2020/06/06/child-pugh-score/>. *Digestive Disease Dashboard*.
167. Kim MY, Baik SK. Hyperdynamic Circulation in Patients with Liver Cirrhosis and Portal Hypertension. *The Korean Journal of Gastroenterology*. 2009;54(3):143.
168. Gunarathne LS, Rajapaksha H, Shackel N, Angus PW, Herath CB. Cirrhotic portal hypertension: From pathophysiology to novel therapeutics. *World Journal of Gastroenterology*. 2020 Oct 28;26(40):6111–40.

169. García-Pagán J-C, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2012 Aug;57(2):458–61.
170. Bloom S, Kemp W, Lubel J. Portal hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. *Internal Medicine Journal*. 2015 Jan;45(1):16–26.
171. Moore KP. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis. *Gut*. 2006 Oct 1;55(suppl_6):vi1–12.
172. Lieberman FL, Denison EK, Reynolds TB. THE RELATIONSHIP OF PLASMA VOLUME, PORTAL HYPERTENSION, ASCITES, AND RENAL SODIUM RETENTION IN CIRRHOSIS: THE OVERFLOW THEORY OF ASCITES FORMATION. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1970 Jul;170(1 The Hepatic C):202–12.
173. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: A proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology*. 1988 Sep;8(5):1151–7.
174. Schrier R, Niederberger M, Weigert A, Ginés P. Peripheral Arterial Vasodilation: Determinant of Functional Spectrum of Cirrhosis. *Seminars in Liver Disease*. 1994 Feb 16;14(01):14–22.
175. Gioia S, Nardelli S, Ridola L, Riggio O. Causes and Management of Non-cirrhotic Portal Hypertension. *Current Gastroenterology Reports*. 2020 Dec 17;22(12):56.
176. Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: An update. *Hepatology*. 2009 Jun;49(6):2087–107.

177. Rector WG, Reynolds TB. Superiority of the serum-ascites albumin difference over the ascites total protein concentration in separation of “transudative” and “exudative” ascites. *The American Journal of Medicine*. 1984 Jul;77(1):83–5.
178. Runyon BA. The Serum-Ascites Albumin Gradient Is Superior to the Exudate-Transudate Concept in the Differential Diagnosis of Ascites. *Annals of Internal Medicine*. 1992 Aug 1;117(3):215.
179. Marciano S, Díaz JM, Dirchwolf M, Gadano A. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis: incidence, outcomes, and treatment strategies. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*. 2019 Jan;Volume 11:13–22.
180. Evans L. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology*. 2003 Apr;37(4):897–901.
181. Bal CK, Daman R, Bhatia V. Predictors of fifty days in-hospital mortality in decompensated cirrhosis patients with spontaneous bacterial peritonitis. *World Journal of Hepatology*. 2016;8(12):566.
182. Lim KHJ, Potts JR, Chetwood J, Goubet S, Verma S. Long-term outcomes after hospitalization with spontaneous bacterial peritonitis. *Journal of Digestive Diseases*. 2015 Apr;16(4):228–40.
183. Ryerson AB, Ehemann CR, Altekruse SF, Ward JW, Jemal A, Sherman RL, Henley SJ, Holtzman D, Lake A, Noone A-M, Anderson RN, Ma J, Ly KN, Cronin KA, Penberthy L, Kohler BA. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer*. 2016 May 1;122(9):1312–37.
184. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011 Mar;61(2):69–90.

185. Park J, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen P, Kudo M, Johnson P, Wagner S, Orsini LS, Sherman M. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the <scp>BRIDGE</scp> Study. *Liver International*. 2015 Sep 25;35(9):2155–66.
186. Chang M-H, Chen C-J, Lai M-S, Hsu H-M, Wu T-C, Kong M-S, Liang D-C, Shau W-Y, Chen D-S. Universal Hepatitis B Vaccination in Taiwan and the Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Children. *New England Journal of Medicine*. 1997 Jun 26;336(26):1855–9.
187. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, Everson GT, Lindsay KL, Lee WM, Bonkovsky HL, Dienstag JL, Ghany MG, Morishima C, Goodman ZD. Incidence of Hepatocellular Carcinoma and Associated Risk Factors in Hepatitis C-Related Advanced Liver Disease. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):138–48.
188. Niederau C, Lange S, Heintges T, Erhardt A, Buschkamp M, Hürter D, Nawrocki M, Kruska L, Hensel F, Petry W, Häussinger D. Prognosis of chronic hepatitis c: Results of a large, prospective cohort study. *Hepatology*. 1998 Dec;28(6):1687–95.
189. Giordano TP, Kramer JR, Soucek J, Richardson P, El-Serag HB. Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in HIV-Infected Veterans With and Without the Hepatitis C Virus. *Archives of Internal Medicine*. 2004 Nov 22;164(21):2349.
190. Cammà C, Giunta M, Andreone P, Craxì A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *Journal of Hepatology*. 2001 Apr;34(4):593–602.

191. Morgan RL, Baack B, Smith BD, Yartel A, Pitasi M, Falck-Ytter Y. Eradication of Hepatitis C Virus Infection and the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Annals of Internal Medicine*. 2013 Mar 5;158(5_Part_1):329.
192. Yu M-W. Familial Risk of Hepatocellular Carcinoma Among Chronic Hepatitis B Carriers and Their Relatives. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000 Jul 19;92(14):1159–64.
193. SUNG JJY, TSOI KKF, WONG VWS, LI KCT, CHAN HLY. Meta-analysis: treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2008 Nov;28(9):1067–77.
194. Yang JD, Ahmed Mohammed H, Harmsen WS, Enders F, Gores GJ, Roberts LR. Recent Trends in the Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in Olmsted County, Minnesota. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2017 Sep;51(8):742–8.
195. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S, May SB, Kramer JR, Richardson PA, Davila JA. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans Is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2016 Jan;14(1):124-131.e1.
196. Park J, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen P, Kudo M, Johnson P, Wagner S, Orsini LS, Sherman M. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the <sc>BRIDGE</sc> Study. *Liver International*. 2015 Sep 25;35(9):2155–66.
197. Sagnelli E, Macera M, Russo A, Coppola N, Sagnelli C. Epidemiological and etiological variations in hepatocellular carcinoma. *Infection*. 2020 Feb 25;48(1):7–17.

198. Ogunwobi OO, Harricharran T, Huaman J, Galuza A, Odumuwagun O, Tan Y, Ma GX, Nguyen MT. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World Journal of Gastroenterology*. 2019 May 21;25(19):2279–93.
199. Villanueva A, Luedde T. The transition from inflammation to cancer in the liver. *Clinical Liver Disease*. 2016 Oct;8(4):89–93.
200. Couri T, Pillai A. Goals and targets for personalized therapy for HCC. *Hepatology International*. 2019 Mar 1;13(2):125–37.
201. Cleary SP, Jeck WR, Zhao X, Chen K, Selitsky SR, Savich GL, Tan T-X, Wu MC, Getz G, Lawrence MS, Parker JS, Li J, Powers S, Kim H, Fischer S, Guindi M, Ghanekar A, Chiang DY. Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology*. 2013 Nov;58(5):1693–702.
202. Schulze K, Nault J-C, Villanueva A. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *Journal of Hepatology*. 2016 Nov;65(5):1031–42.
203. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras M-C, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nature Genetics*. 2014 Dec 2;46(12):1267–73.
204. World Health Organization (WHO). World Health Organization. WHO-UNICEF estimates of HepB_BD coverage. 2020.

205. Smith BD, Morgan RL, Beckett GA, Falck-Ytter Y, Holtzman D, Ward JW. Hepatitis C Virus Testing of Persons Born During 1945–1965: Recommendations From the Centers for Disease Control and Prevention. *Annals of Internal Medicine*. 2012 Dec 4;157(11):817.
206. Petrick JL, Campbell PT, Koshiol J, Thistle JE, Andreotti G, Beane-Freeman LE, Buring JE, Chan AT, Chong DQ, Doody MM, Gapstur SM, Gaziano JM, Giovannucci E, Graubard BI, Lee I-M, Liao LM, Linet MS, Palmer JR, Poynter JN, Purdue MP, Robien K, Rosenberg L, Schairer C, Sesso HD, Sinha R, Stampfer MJ, Stefanick M, Wactawski-Wende J, Zhang X, Zeleniuch-Jacquotte A, Freedman ND, McGlynn KA. Tobacco, alcohol use and risk of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: The Liver Cancer Pooling Project. *British Journal of Cancer*. 2018 Apr 9;118(7):1005–12.
207. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J-L, Schirmacher P, Vilgrain V. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2018 Jul;69(1):182–236.
208. Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, la Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology*. 2008 Jul;48(1):137–45.
209. Vitale A, Farinati F, Finotti M, di Renzo C, Brancaccio G, Piscaglia F, Cabibbo G, Caturelli E, Missale G, Marra F, Sacco R, Giannini E, Trevisani F, Cillo U. Overview of Prognostic Systems for Hepatocellular Carcinoma and ITA.LI.CA External Validation of MESH and CNLC Classifications. *Cancers*. 2021 Apr 2;13(7):1673.
210. Vitale A, Farinati F, Noaro G, Burra P, Pawlik TM, Bucci L, Giannini EG, Faggiano C, Ciccarese F, Rapaccini GL, di Marco M, Caturelli E, Zoli M, Borzio

- F, Sacco R, Cabibbo G, Virdone R, Marra F, Felder M, Morisco F, Benvegnù L, Gasbarrini A, Svegliati-Baroni G, Foschi FG, Olivani A, Masotto A, Nardone G, Colecchia A, Fornari F, Marignani M, Vicari S, Bortolini E, Cozzolongo R, Grasso A, Aliberti C, Bernardi M, Frigo AC, Borzio M, Trevisani F, Cillo U. Restaging Patients With Hepatocellular Carcinoma Before Additional Treatment Decisions: A Multicenter Cohort Study. *Hepatology*. 2018 Oct 5;68(4):1232–44.
211. Vitale A, Farinati F, Pawlik TM, Frigo AC, Giannini EG, Napoli L, Ciccarese F, Rapaccini GL, di Marco M, Caturelli E, Zoli M, Borzio F, Sacco R, Cabibbo G, Virdone R, Marra F, Felder M, Morisco F, Benvegnù L, Gasbarrini A, Svegliati-Baroni G, Foschi FG, Missale G, Masotto A, Nardone G, Colecchia A, Bernardi M, Trevisani F, Cillo U. The concept of therapeutic hierarchy for patients with hepatocellular carcinoma: A multicenter cohort study. *Liver International*. 2019 Aug 26;39(8):1478–89.
212. Sharma S. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(45):16820.
213. Machado M v., Cortez-Pinto H. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *Journal of Hepatology*. 2013 May;58(5):1007–19.
214. di Lelio A, Cestari C, Lomazzi A, Beretta L. Cirrhosis: diagnosis with sonographic study of the liver surface. *Radiology*. 1989 Aug;172(2):389–92.
215. Aubé C, Oberti F, Koralı N, Namour M-A, Loisel D, Tanguy J-Y, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Rifflet H, Maïga MY, Penneau-Fontbonne D, Caron C, Calès P. Ultrasonographic diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 1999 Mar;30(3):472–8.

216. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ. Comparison of Noninvasive Markers of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009 Oct;7(10):1104–12.
217. Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells*. 2020 Apr 17;9(4):1005.
218. Wang X, He Y, Mackowiak B, Gao B. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Gut*. 2021 Apr;70(4):784–95.
219. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Research*. 2004 Jan 1;32(90001):109D – 111.
220. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2006 Nov;6(11):857–66.
221. Croce CM, Calin GA. miRNAs, Cancer, and Stem Cell Division. *Cell*. 2005 Jul;122(1):6–7.
222. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Jul 29;105(30):10513–8.
223. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang C-Y. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*. 2008 Oct 2;18(10):997–1006.

224. Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Tomokuni A, Takemasa I, Umeshita K, Kanto T, Doki Y, Mori M. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2012 Jan;56(1):167–75.
225. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016 Oct 13;17(10):1712.
226. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*. 2018 Aug 3;9.
227. Akgül B, Erdoğan İ. Intracytoplasmic Re-localization of miRISC Complexes. *Frontiers in Genetics*. 2018 Sep 20;9.
228. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009 Jan;136(2):215–33.
229. Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y. Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. *Molecular Cell*. 2010 Jul;39(2):292–9.
230. Breving K, Esquela-Kerscher A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010 Aug;42(8):1316–29.
231. Liu C, Yu J, Yu S, Lavker RM, Cai L, Liu W, Yang K, He X, Chen S. MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2010 Jul;53(1):98–107.

232. Zhao J, Tang N, Wu K, Dai W, Ye C, Shi J, Zhang J, Ning B, Zeng X, Lin Y. MiR-21 Simultaneously Regulates ERK1 Signaling in HSC Activation and Hepatocyte EMT in Hepatic Fibrosis. *PLoS ONE*. 2014 Oct 10;9(10):e108005.
233. Caviglia JM, Yan J, Jang M-K, Gwak G-Y, Affo S, Yu L, Olinga P, Friedman RA, Chen X, Schwabe RF. MicroRNA-21 and Dicer are dispensable for hepatic stellate cell activation and the development of liver fibrosis. *Hepatology*. 2018 Jun;67(6):2414–29.
234. Meng F, Henson R, Wehbe-Jane H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer. *Gastroenterology*. 2007 Aug;133(2):647–58.
235. Zeng W, van den Berg A, Huitema S, Gouw ASH, Molema G, de Jong KP. Correlation of MicroRNA-16, MicroRNA-21 and MicroRNA-101 Expression with Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenic Factors in Cirrhotic and Noncirrhotic Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE*. 2014 Apr 23;9(4):e95826.
236. Yoon JS, Kim G, Lee YR, Park SY, Tak WY, Kweon Y-O, Park JG, Lee HW, Han YS, Ha HT, Chun JM, Jang SY, Hur K. Clinical significance of microRNA-21 expression in disease progression of patients with hepatocellular carcinoma. *Biomarkers in Medicine*. 2018 Oct;12(10):1105–14.
237. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Molecular Carcinogenesis*. 2013 Apr;52(4):297–303.

238. Guo X, Lv X, Lv X, Ma Y, Chen L, Chen Y. Circulating miR-21 serves as a serum biomarker for hepatocellular carcinoma and correlated with distant metastasis. *Oncotarget*. 2017 Jul 4;8(27):44050–8.
239. Bharali D, Banerjee BD, Bharadwaj M, Husain SA, Kar P. Expression Analysis of MicroRNA-21 and MicroRNA-122 in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2019 May;9(3):294–301.
240. Pu C, Huang H, Wang Z, Zou W, Lv Y, Zhou Z, Zhang Q, Qiao L, Wu F, Shao S. Extracellular Vesicle-Associated mir-21 and mir-144 Are Markedly Elevated in Serum of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Physiology*. 2018 Jul 17;9.
241. Pelizzaro F, Cardin R, Sartori A, Imondi A, Penzo B, Aliberti C, Ponzoni A, Vitale A, Cillo U, Farinati F. Circulating MicroRNA-21 and MicroRNA-122 as Prognostic Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma Patients Treated with Transarterial Chemoembolization. *Biomedicines*. 2021 Jul 25;9(8):890.
242. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, Huang L, Li H, Tan W, Wang C, Lin D. Circulating MicroRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Molecular Carcinogenesis*. 2011 Feb;50(2):136–42.
243. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biology*. 2011 Sep 5;8(5):706–13.
244. Sarnow P, Jopling CL, Norman KL, Schütz S, Wehner KA. MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2006 Sep;4(9):651–9.
245. Lupberger J. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(1):74.

246. Qiu X, Dong S, Qiao F, Lu S, Song Y, Lao Y, Li Y, Zeng T, Hu J, Zhang L, Zhang L, Fan H. HBx-mediated miR-21 upregulation represses tumor-suppressor function of PDCD4 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2013 Jul 22;32(27):3296–305.
247. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer. *Gastroenterology*. 2007 Aug;133(2):647–58.
248. Yin D, Wang Y, Sai W, Zhang L, Miao Y, Cao L, Zhai X, Feng X, Yang L. HBx-induced miR-21 suppresses cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-12. *Oncology Reports*. 2016 Oct;36(4):2305–12.
249. Dundar HZ, Aksoy F, Aksoy SA, Tasar P, Ugras N, Tunca B, Egeli U, Cecener G, Yerci O, Kaya E. Overexpression of miR-21 Is Associated With Recurrence in Patients With Hepatitis B Virus–Mediated Hepatocellular Carcinoma Undergoing Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2019 May;51(4):1157–61.
250. Chen Y, Chen J, Wang H, Shi J, Wu K, Liu S, Liu Y, Wu J. HCV-Induced miR-21 Contributes to Evasion of Host Immune System by Targeting MyD88 and IRAK1. *PLoS Pathogens*. 2013 Apr 25;9(4):e1003248.
251. Wu H, Ng R, Chen X, Steer CJ, Song G. MicroRNA-21 is a potential link between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma via modulation of the HBP1-p53-Srebp1c pathway. *Gut*. 2016 Nov;65(11):1850–60.
252. Vinciguerra M, Sgroi A, Veyrat-Durebex C, Rubbia-Brandt L, Buhler LH, Foti M. Unsaturated fatty acids inhibit the expression of tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN) via microRNA-21 up-regulation in hepatocytes. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1176–84.

253. Calo N, Ramadori P, Sobolewski C, Romero Y, Maeder C, Fournier M, Rantakari P, Zhang F-P, Poutanen M, Dufour J-F, Humar B, Nef S, Foti M. Stress-activated *miR-21/miR-21** in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. *Gut*. 2016 Nov;65(11):1871–81.
254. Loyer X, Paradis V, Hénique C, Vion A-C, Colnot N, Guerin CL, Devue C, On S, Scetbun J, Romain M, Paul J-L, Rothenberg ME, Marcellin P, Durand F, Bedossa P, Prip-Buus C, Baugé E, Staels B, Boulanger CM, Tedgui A, Rautou P-E. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPAR α expression. *Gut*. 2016 Nov;65(11):1882–94.
255. Kennedy LL, Meng F, Venter JK, Zhou T, Karstens WA, Hargrove LA, Wu N, Kyritsi K, Greene J, Invernizzi P, Bernuzzi F, Glaser SS, Francis HL, Alpini G. Knockout of microRNA-21 reduces biliary hyperplasia and liver fibrosis in cholestatic bile duct ligated mice. *Laboratory Investigation*. 2016 Dec 24;96(12):1256–67.
256. Francis H, McDaniel K, Han Y, Liu X, Kennedy L, Yang F, McCarra J, Zhou T, Glaser S, Venter J, Huang L, Levine P, Lai J-M, Liu C-G, Alpini G, Meng F. Regulation of the Extrinsic Apoptotic Pathway by MicroRNA-21 in Alcoholic Liver Injury. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Oct;289(40):27526–39.
257. Zhang Z, Zha Y, Hu W, Huang Z, Gao Z, Zang Y, Chen J, Dong L, Zhang J. The Autoregulatory Feedback Loop of MicroRNA-21/Programmed Cell Death Protein 4/Activation Protein-1 (MiR-21/PDCD4/AP-1) as a Driving Force for Hepatic Fibrosis Development. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Dec;288(52):37082–93.

258. Wang Z. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*. 2012 Feb 9;
259. Ning Z-W, Luo X-Y, Wang G-Z, Li Y, Pan M-X, Yang R-Q, Ling X-G, Huang S, Ma X-X, Jin S-Y, Wang D, Li X. *MicroRNA-21* Mediates Angiotensin II-Induced Liver Fibrosis by Activating NLRP3 Inflammasome/IL-1 β Axis *via* Targeting *Smad7* and *Spry1*. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017 Jul;27(1):1–20.
260. Rodrigues PM, Afonso MB, Simão AL, Carvalho CC, Trindade A, Duarte A, Borralho PM, Machado M v, Cortez-Pinto H, Rodrigues CM, Castro RE. miR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Cell Death & Disease*. 2017 Apr 13;8(4):e2748–e2748.
261. Dooley S, Hamzavi J, Ciuculan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, Ueberham E, Gebhardt R, Kanzler S, Geier A, Breitkopf K, Weng H, Mertens PR. Hepatocyte-Specific *Smad7* Expression Attenuates TGF- β -Mediated Fibrogenesis and Protects Against Liver Damage. *Gastroenterology*. 2008 Aug;135(2):642-659.e46.
262. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo Y-Y. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Research*. 2008 Mar 12;18(3):350–9.
263. Selcuklu SD, Donoghue MTA, Spillane C. *miR-21* as a key regulator of oncogenic processes. *Biochemical Society Transactions*. 2009 Aug 1;37(4):918–25.
264. Pan X, Wang Z-X, Wang R. MicroRNA-21: A novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2010 Dec 15;10(12):1224–32.
265. Feiersinger F, Nolte E, Wach S, Rau TT, Vassos N, Geppert C, Konrad A, Merkel S, Taubert H, Stürzl M, Croner RS. MiRNA-21 Expression Decreases from

- Primary Tumors to Liver Metastases in Colorectal Carcinoma. *PLOS ONE*. 2016 Feb 4;11(2):e0148580.
266. Szabó Z, Szegedi K, Gombos K, Mahua C, Flaskó T, Harda K, Halmos G. Expression of miRNA-21 and miRNA-221 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and their possible role in the development of ccRCC. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2016 Dec;34(12):533.e21-533.e27.
267. Lianidou E, Markou A, Zavridou M. miRNA-21 as a novel therapeutic target in lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy*. 2016 Mar;19.
268. Zhang T, Yang Z, Kusumanchi P, Han S, Liangpunsakul S. Critical Role of microRNA-21 in the Pathogenesis of Liver Diseases. *Frontiers in Medicine*. 2020 Jan 31;7.
269. Gao W, Shen H, Liu L, Xu J, Xu J, Shu Y. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2011 Apr 28;137(4):557–66.
270. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered Expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 Is Related to Clinicopathologic Features of Colorectal Cancer. *Oncology*. 2007;72(5–6):397–402.
271. Si M-L, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y-Y. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007 Apr 30;26(19):2799–803.
272. Kim RH, Mak TW. Tumours and tremors: how PTEN regulation underlies both. *British Journal of Cancer*. 2006 Mar 21;94(5):620–4.

273. Akahane T, Akahane M, Shah A, Connor CM, Thorgeirsson UP. TIMP-1 inhibits microvascular endothelial cell migration by MMP-dependent and MMP-independent mechanisms. *Experimental Cell Research*. 2004 Dec;301(2):158–67.
274. Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Tomokuni A, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. MicroRNA-21 induces resistance to the anti-tumour effect of interferon- α /5-fluorouracil in hepatocellular carcinoma cells. *British Journal of Cancer*. 2010 Nov 26;103(10):1617–26.
275. He C, Dong X, Zhai B, Jiang X, Dong D, Li B, Jiang H, Xu S, Sun X. MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):28867–81.
276. Xu G, Zhang Y, Wei J, Jia W, Ge Z, Zhang Z, Liu X. MicroRNA-21 promotes hepatocellular carcinoma HepG2 cell proliferation through repression of mitogen-activated protein kinase-kinase 3. *BMC Cancer*. 2013 Dec 10;13(1):469.
277. Jiang J, Yang P, Guo Z, Yang R, Yang H, Yang F, Li L, Xiang B. Overexpression of microRNA-21 strengthens stem cell-like characteristics in a hepatocellular carcinoma cell line. *World Journal of Surgical Oncology*. 2016 Dec 28;14(1):278.
278. Liu L-Z, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung H-F, Lai L, Jiang B-H. MiR-21 Induced Angiogenesis through AKT and ERK Activation and HIF-1 α Expression. *PLoS ONE*. 2011 Apr 22;6(4):e19139.
279. Donnem T, Fenton CG, Lonvik K, Berg T, Eklo K, Andersen S, Stenvold H, Al-Shibli K, Al-Saad S, Bremnes RM, Busund L-T. MicroRNA Signatures in Tumor Tissue Related to Angiogenesis in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*. 2012 Jan 25;7(1):e29671.

280. Sabry D, El-Deek SEM, Maher M, El-Baz MAH, El-Bader HM, Amer E, Hassan EA, Fathy W, El-Deek HEM. Role of miRNA-210, miRNA-21 and miRNA-126 as diagnostic biomarkers in colorectal carcinoma: impact of HIF-1 α -VEGF signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2019 Apr 24;454(1–2):177–89.
281. Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2019 Apr;1871(2):455–68.
282. Zhou Y, Ren H, Dai B, Li J, Shang L, Huang J, Shi X. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018 Dec 27;37(1):324.
283. Wang J, Chu Y, Xu M, Zhang X, Zhou Y, Xu M. miR-21 promotes cell migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting KLF5. *Oncology Letters*. 2018 Dec 18;
284. Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Blleloch RH, Frandsen NM, Willenbring H. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology*. 2010 May;51(5):1735–43.
285. Ng R, Song G, Roll GR, Frandsen NM, Willenbring H. A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration. *Journal of Clinical Investigation*. 2012 Mar 1;122(3):1097–108.
286. Liao Q, Han P, Huang Y, Wu Z, Chen Q, Li S, Ye J, Wu X. Potential Role of Circulating microRNA-21 for Hepatocellular Carcinoma Diagnosis: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 2015 Jun 26;10(6):e0130677.

287. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE*. 2011 Aug 23;6(8):e23937.
288. Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, Keck K, Hoffer BA, Icardi MS, Christensen RN, Schmidt WN, McCaffrey AP. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Laboratory Investigation*. 2010 Dec 12;90(12):1727–36.
289. Wu H-C, Huang C-L, Wang H-W, Hsu W-F, Tsai T-Y, Chen S-H, Peng C-Y. Serum miR-21 correlates with the histological stage of chronic hepatitis B-associated liver fibrosis. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2019;12(10):3819–29.
290. Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, Kellum JM, Min H, Luketic VA, Sanyal AJ. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology*. 2008 Dec;48(6):1810–20.
291. SUN C, HUANG F, LIU X, XIAO X, YANG M, HU G, LIU H, LIAO L. miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. *International Journal of Molecular Medicine*. 2015 Mar;35(3):847–53.
292. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, Sugimoto K, Ohashi K, Teradaira R, Inoue T, Hamajima N, Hashimoto S. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clinica Chimica Acta*. 2013 Sep;424:99–103.
293. Takeuchi-Yorimoto A, Yamaura Y, Kanki M, Ide T, Nakata A, Noto T, Matsumoto M. MicroRNA-21 is associated with fibrosis in a rat model of

nonalcoholic steatohepatitis and serves as a plasma biomarker for fibrotic liver disease. *Toxicology Letters*. 2016 Sep;258:159–67.

294. Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, Forestier N, Susser S, Hauptenthal J, Welker M, Shi Y, Peveling-Oberhag J, Polta A, von Wagner M, Radeke HH, Sarrazin C, Trojan J, Zeuzem S, Kronenberger B, Piiper A. Serum MicroRNA-21 as Marker for Necroinflammation in Hepatitis C Patients with and without Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE*. 2011 Oct 31;6(10):e26971.
295. El-Hefny M, Fouad S, Hussein T, Abdel-Hameed R, Effat H, Mohamed H, Abdel Wahab AH. Circulating microRNAs as predictive biomarkers for liver disease progression of chronic hepatitis C (genotype-4) Egyptian patients. *Journal of Medical Virology*. 2019 Jan 24;91(1):93–101.
296. Qi P, Cheng S, Wang H, Li N, Chen Y, Gao C. Serum MicroRNAs as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Chinese Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *PLoS ONE*. 2011 Dec 8;6(12):e28486.
297. Ding Y, Yan J-L, Fang A-N, Zhou W-F, Huang L. Circulating miRNAs as novel diagnostic biomarkers in hepatocellular carcinoma detection: a meta-analysis based on 24 articles. *Oncotarget*. 2017 Sep 12;8(39):66402–13.
298. Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, Wang J-F, Zhang Z, Lu S, Huang X, Wang Z, Qiu S, Wang X, Yang G, Sun H, Tang Z, Wu Y, Zhu H, Fan J. Plasma MicroRNA Panel to Diagnose Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Dec 20;29(36):4781–8.
299. Zhuang C, Jiang W, Huang D, Xu L, Yang Q, Zheng L, Wang X, Hu L. Serum miR-21, miR-26a and miR-101 as potential biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2016 Sep;40(4):386–96.

300. Zhang N, Hu Z, Qiang Y, Zhu X. Circulating miR-130b- and miR-21-based diagnostic markers and therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. 2019 Dec 29;7(12).
301. Chen X, Song M, Chen W, Dimitrova-Shumkovska J, Zhao Y, Cao Y, Song Y, Yang W, Wang F, Xiang Y, Yang C. MicroRNA-21 Contributes to Liver Regeneration by Targeting PTEN. *Medical Science Monitor*. 2016;22:83–91.
302. Yi PS, Li JS. High expression of miR-21 is not a predictor of poor prognosis in all patients with hepatocellular carcinoma. *Molecular and clinical oncology*. 2018 Jun;8(6):733–9.
303. Huang C-S, Yu W, Cui H, Wang Y-J, Zhang L, Han F, Huang T. Increased expression of miR-21 predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(6):7234–8.
304. Yan SR, Liu ZJ, Yu S, Bao YX. Investigation of the value of miR-21 in the diagnosis of early stage HCC and its prognosis: a meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(3):11573–86.
305. Wang X, Zhang J, Zhou L, Lu P, Zheng Z-G, Sun W, Wang J-L, Yang X-S, Li X-L, Xia N, Zhang N, Dou K-F. Significance of serum microRNA-21 in diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC): clinical analyses of patients and an HCC rat model. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(2):1466–78.
306. Zhang Y, Wei C, Guo C-C, Bi R-X, Xie J, Guan D-H, Yang C-H, Jiang Y-H. Prognostic value of microRNAs in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Dec 5;8(63):107237–57.

307. Qu J, Yang J, Chen M, Cui L, Wang T, Gao W, Tian J, Wei R. MicroRNA-21 as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2019 Aug 22;35(5).
308. Corvalan AH. Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma by MicroRNAs: Shining a Light from the Genome's "Dark Matter." *Digestive Diseases and Sciences*. 2012 Nov 28;57(11):2737–9.
309. Wang W-Y, Zhang H-F, Wang L, Ma Y-P, Gao F, Zhang S-J, Wang L-C. miR-21 expression predicts prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2014 Dec;38(6):715–9.
310. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2016 Jun;64(6):1388–402.
311. Roayaie S, Jibara G, Tabrizian P, Park J-W, Yang J, Yan L, Schwartz M, Han G, Izzo F, Chen M, Blanc J-F, Johnson P, Kudo M, Roberts LR, Sherman M. The role of hepatic resection in the treatment of hepatocellular cancer. *Hepatology*. 2015 Aug;62(2):440–51.
312. Llovet J, Brú C, Bruix J. Prognosis of Hepatocellular Carcinoma: The BCLC Staging Classification. *Seminars in Liver Disease*. 1999 Mar 17;19(03):329–38.
313. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, Kaminski N, Abraham E. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*. 2010 Aug 2;207(8):1589–97.
314. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial

- disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008 Dec 30;456(7224):980–4.
315. Matsuzaki K, Murata M, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, Kaibori M, Kamiyama Y, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K, Seki T. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor β signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007 Jul;46(1):48–57.
316. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*. 2008 Jul 11;454(7200):56–61.
317. Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, Fujita S, Mizutani T, Furukawa C, Fujishiro M, Ichinose M, Shiogama K, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H. Locked Nucleic Acid *In situ* Hybridization Analysis of miR-21 Expression during Colorectal Cancer Development. *Clinical Cancer Research*. 2009 Jun 15;15(12):4009–16.
318. Li Q, Zhang D, Wang Y, Sun P, Hou X, Lerner J, Xiong W, Mi J. MiR-21/Smad 7 signaling determines TGF- β 1-induced CAF formation. *Scientific Reports*. 2013 Dec 20;3(1):2038.