

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

CLINICA MEDICA 5

Direttore: Ch.mo Prof. Paolo Angeli

TESI DI LAUREA

SCORE PROGNOSTICO PER LO SVILUPPO DI EPATOCARCINOMA NEI SOGGETTI CON CIRROSI EPATICA

RELATORE: Prof.ssa Patrizia Pontisso

CORRELATORI: Dott.ssa Alessandra Biasiolo, Dott. Andrea Martini

LAUREANDO:

Davide Stefanelli

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO

Capitolo 1 - Introduzione..... pag.5

- 1.1 Cirrosi epatica pag.5
 - 1.1.1 Epidemiologia..... pag.5
 - 1.1.2 Eziologia e fattori di rischio pag.5
 - 1.1.3 Patogenesi della cirrosi epatica e delle sue complicanze pag.8
 - 1.1.4 Manifestazioni cliniche pag.11
 - 1.1.5 Diagnosi..... pag.16
 - 1.1.6 Prognosi..... pag.18
- 1.2 Epatocarcinoma pag.19
 - 1.2.1 Epidemiologia..... pag.20
 - 1.2.2 Eziologia e fattori di rischio pag.20
 - 1.2.3 Patogenesi molecolare..... pag.22
 - 1.2.4 Manifestazioni cliniche pag.26
 - 1.2.5 Screening pag.28
 - 1.2.6 Stadiazione e terapia pag.31
- 1.3 SerpinB3 pag.33
 - 1.3.1 Caratteristiche e funzioni fisiologiche di SerpinB3/B4..... pag.33
 - 1.3.2 Ruolo di SerpinB3 nella patogenesi dell'epatocarcinoma ... pag.33
 - 1.3.3 Ruolo di SerpinB3/B4 nella pratica clinica pag.36

Capitolo 2 - Scopo dello studio pag.39

Capitolo 3 - Materiali e Metodi pag.41

- 3.1 Disegno dello studio pag.41
- 3.2 Pazienti..... pag.41
- 3.3 Follow-up..... pag.42
- 3.4 Variabili pag.43
- 3.5 Analisi Statistica..... pag.45

| | |
|--|---------------|
| Capitolo - 4 Risultati | pag.47 |
| 4.1 Statistica descrittiva e analisi univariata | pag.47 |
| 4.1.1 Pazienti affetti da cirrosi epatica | pag.47 |
| 4.1.2 Pazienti affetti da epatocarcinoma | pag.49 |
| 4.1.3 Confronto tra pazienti affetti da cirrosi epatica e pazienti affetti da epatocarcinoma | pag.52 |
| 4.1.4 Pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva..... | pag.52 |
| 4.1.5 Pazienti affetti da cirrosi epatica non evolutiva..... | pag.55 |
| 4.1.6 Confronto tra pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva e pazienti affetti da cirrosi epatica non evolutiva | pag.59 |
| 4.2 Classificatori per soggetti affetti da cirrosi epatica e da epato- carcinoma | pag.59 |
| 4.2.1 Analisi Random Forest | pag.59 |
| 4.2.2 Classificazione Random Ferns (rFerns) | pag.63 |
| 4.2.3 Confronto tra Random Forest e rFerns..... | pag.64 |
| 4.3 Classificatori per soggetti affetti da cirrosi epatica evolutiva e da cirrosi epatica non evolutiva | pag.64 |
| 4.3.1 Analisi Random Forest | pag.64 |
| 4.3.2 Classificazione Random Ferns (rFerns) | pag.67 |
| 4.3.3 Approccio Ensemble | pag.67 |
| | |
| Capitolo - 5 Discussione | pag.71 |
| 5.1 Pazienti affetti da cirrosi epatica | pag.72 |
| 5.2 Pazienti affetti da epatocarcinoma..... | pag.74 |
| 5.3 Algoritmi di machine learning | pag.76 |
| 5.4 Rilevanza del biomarcatore SCCA-IgM..... | pag.78 |
| 5.5 Prospettive future..... | pag.79 |
| | |
| Capitolo 6 - Conclusioni | pag.81 |
| | |
| Bibliografia | pag.83 |

Ringraziamenti

RIASSUNTO

Presupposti dello studio: l'epatocarcinoma è la principale neoplasia primitiva del fegato ed è una neoplasia che si sviluppa nel 90% dei casi in pazienti affetti da malattia epatica cronica evolutiva. Per tale motivo i soggetti affetti da cirrosi epatica ed epatopatia evolutiva correlata ad infezione cronica da virus dell'epatite B sono sottoposti a screening ogni sei mesi mediante ecografia epatica. A livello biomorale il marcatore correntemente utilizzato nella pratica clinica è l' α FP, che tuttavia presenta una mediocre accuratezza diagnostica. Nel tentativo di implementare la diagnosi precoce e non invasiva di malattia si stanno studiando altri marcatori sierici, quali ad esempio α FP-L3, PIVKA-II, GP73 e SCCA-IgM.

Scopo dello studio: con il nostro lavoro ci siamo proposti di creare un modello matematico-statistico che, mediante l'integrazione di informazioni cliniche e di laboratorio, permetta di prevedere lo sviluppo di epatocarcinoma nei soggetti affetti da cirrosi epatica.

Materiali e metodi: lo studio si compone di 217 pazienti (suddivisi in quattro gruppi), 92 affetti da sola cirrosi epatica; 28 affetti da cirrosi epatica e che hanno sviluppato epatocarcinoma nel corso dello studio; 28 affetti da cirrosi epatica e che non hanno sviluppato epatocarcinoma nel corso dello studio; 69 pazienti affetti da cirrosi epatica complicata da epatocarcinoma già al momento dell'arruolamento. I sottogruppi del campione sono stati utilizzati per addestrare dei classificatori di cui si sono poi studiate le caratteristiche. In particolare i sottogruppi di pazienti affetti da sola cirrosi epatica (n=92) ed i soggetti affetti da epatocarcinoma (n=69) sono stati usati per creare un classificatore basato su modello Random Forest e uno basato su Random Ferns. I sottogruppi di pazienti affetti da cirrosi epatica complicata da epatocarcinoma nel corso di follow-up (n=28) e non complicata da epatocarcinoma nel corso del follow-up (n=28) sono stati usati per creare un classificatore basato su modello Random Forest, uno basato su Random Ferns e uno secondo approccio Ensemble.

Risultati: i modelli Random Forest e Random Ferns addestrati con i dati dei pazienti affetti da sola cirrosi epatica e affetti da epatocarcinoma insorto su cirrosi

epatica hanno mostrato prestazioni simili nel classificare in modo corretto i pazienti utilizzati per il loro addestramento. Il modello Random Forest ha mostrato un'accuratezza di 0,6770 (F1 score 0,7283). Il modello Random Ferns ha mostrato un'accuratezza di 0,7143 (F1 score 0,7326). I modelli Random Forest e Random Ferns addestrati con i set di dati dei pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva e non evolutiva non hanno dato risultati accettabili. L'approccio *Ensemble* ha generato un algoritmo *superlearner* (con *v-fold cross validation* v:20) in grado di discriminare con accuratezza 1,0 i pazienti a rischio di evoluzione da quelli non a rischio di evoluzione. La validazione esterna sul campione di pazienti affetti da sola cirrosi epatica ha confermato in parte la validità dell'algoritmo, mostrando una specificità dello 83,7%.

Conclusioni: gli algoritmi utilizzati in questo studio hanno permesso di creare modelli innovativi per la diagnosi di epatocarcinoma e per la prognosi dei pazienti affetti da cirrosi epatica. Questi sfruttano caratteristiche cliniche e variabili laboratoristiche che permettono una valutazione d'insieme del singolo paziente. In questo senso tali modelli rientrano in quello che è l'ormai accettato concetto di medicina personalizzata. Essi inoltre hanno permesso di corroborare l'importanza di SCCA-IgM nel contesto della malattia epatica cronica e dell'epatocarcinoma.

ABSTRACT

Background: hepatocellular carcinoma is the first primary liver cancer and it develops in 90% in a background of progressive chronic liver disease. Therefore, patients suffering from liver cirrhosis and from liver chronic disease related to chronic HBV infection should be evaluated every 6 months by liver ultrasound as screening program. At serological level, the marker currently used in clinical practice is α FP, which however has poor diagnostic accuracy. In order to achieve an early and non-invasive diagnosis, other serum biomarkers are currently studied such as α FP-L3, PIVKA-II, GP73 and SCCA-IgM.

Aim: this study aims to create a statistical-mathematical model that find out which patients suffering from cirrhosis will develop hepatocellular carcinoma, using clinical and laboratory information.

Materials and Methods: the study has included 217 patients, 92 suffering from liver cirrhosis; 28 with liver cirrhosis complicated by hepatocellular carcinoma during the follow-up; 28 with liver cirrhosis not complicated by hepatocellular carcinoma during the follow-up; 69 with hepatocellular carcinoma. The different groups of patients were used as training set, in particular, the groups of patients with liver cirrhosis alone ($n = 92$) and those with hepatocarcinoma ($n = 69$) were used to create a classifier based on the Random Forest model and one based on Random Ferns. The groups of patients with liver cirrhosis who developed hepatocarcinoma during follow-up ($n = 28$) and with cirrhosis without hepatocarcinoma development during follow-up ($n = 28$) were used to create a classifier based on the Random Forest model, a model based on Random Ferns and an additional Ensemble approach.

Results: Random Forest and Random Ferns models, trained with data from patients with liver cirrhosis and from patients with hepatocarcinoma, showed similar performance and were able to correctly classify the patients used for their training. Random Forest Model showed an accuracy of 0,6770 (F1 score 0,7283). Random Ferns showed an accuracy of 0,7143 (F1 score 0,7326). When Random Forest and Random Ferns Models were used to train datasets of evolutive liver cirrhosis and

non-evolutive liver cirrhosis, they were not able to correctly classify these two different groups of patients. However, Superlearner, generated by Ensemble approach and validated with v-fold cross validation (v: 20), was able to correctly classify patients with cancer development from those who did not develop liver cancer with accuracy of 1,0. External validation on patients suffering from liver cirrhosis showed a Specificity of 83,7%, proving the good algorithm's potentiality.

Conclusions: the algorithms used in this study have allowed the development of innovative models both for the diagnosis of hepatocellular carcinoma and for the prognosis of liver cirrhosis. These models exploit clinical features and laboratory variables, leading to personalized assessment of each patient. For this reason they are part of the worldwide accepted notion of tailored medicine. They also corroborate the relevance of the biomarker SCCA-IgM in the management of chronic liver disease and hepatocarcinoma.

Capitolo 1 – Introduzione

1.1 Cirrosi epatica

La cirrosi epatica è una malattia cronica caratterizzata dalla contemporanea presenza di fibrosi e noduli rigenerativi a livello del parenchima epatico. Queste alterazioni possono derivare dall'azione di svariati fattori epatolesivi, come alcol, infezioni virali o problemi metabolici, che sono andati perpetuandosi nel tempo.

1.1.1 Epidemiologia

La cirrosi epatica è causa di circa un milione di morti all'anno (nel 2017 ne sono state registrate circa 1,32 milioni), posizionandosi all'undicesimo posto tra le cause di morte a livello globale (2,4% di tutte le morti), al terzo posto se si valutano le persone di età compresa tra i 45-64 anni(1,2). Se si considerano invece anche le morti per epatocarcinoma, le morti attribuibili alla cirrosi raggiungono il 3,5% delle morti a livello globale(2). L'Egitto, in virtù dell'alta prevalenza di infezione da parte di HBV e HCV, è il paese con la più alta incidenza di morti per cirrosi, con ben 103 morti per 100.000 abitanti all'anno(1). La cirrosi epatica è poi causa di 41,4 milioni di DALYs (*disability-associated (adjusted) life years*): la settima causa di DALYs nei soggetti di età compresa tra i 50-74 anni(1,3).

1.1.2 Eziologia e fattori di rischio

Gli agenti eziologici della cirrosi epatica sono molteplici e sono riassunti nella Tabella I(4). Verranno qui discusse unicamente le principali eziologie, ossia quella alcolica, quelle virali e quella metabolica. La coesistenza di più agenti epatolesivi provoca una più rapida insorgenza di cirrosi epatica, come ad esempio in pazienti che abusano di alcol e sono anche infettati da HCV o affetti da sindrome metabolica(5,6). Altra comorbilità abbastanza frequente (1-15% dei casi) è la co-infezione tra HBV e HCV(7).

Abuso di sostanze alcoliche. È la principale causa di cirrosi epatica. Globalmente sono stimati 2,4 miliardi di consumatori di bevande alcoliche (il 32,5% della popolazione mondiale), dei quali 75 milioni sono considerati a rischio di epatopatia alcol-relata in virtù dell'elevato consumo alcolico, indipendentemente dalle modalità di assunzione(4,8). Il pattern di consumo alcolico maggiormente associato

a cirrosi è l'assunzione di più di 3 UA/die (Unità Alcoliche) per l'uomo e 2 UA/die per la donna per un periodo di almeno 10 anni. Per 1 UA si intendono 10g di etanolo puro(9,10).

| Agenti eziologici di cirrosi epatica | |
|--|--|
| Virali | HBV* HCV* HDV (co-infezione con HBV) |
| Alcol-relati | Epatopatia alcol-relata* |
| Metabolici e genetici | Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)* Emocromatosi Malattia di Wilson Deficit di α_1 -anti-tripsina Fibrosi cistica Deficit di lipasi acida lisosomiale Colestasi intraepatica familiare progressiva Tirosinemia tipo I Malattia di Andersen |
| Autoimmuni | Epatite autoimmune Colangite biliare primitiva Colangite biliare sclerosante |
| Biliari | Atresia biliare Stenosi biliari |
| Vascolari | Sindrome di Budd-Chiari Malattia veno-occlusiva Malattia epatica associata all'intervento di Fontan Cirrosi di origine cardiaca |
| Farmaco-relati (utilizzo a lungo termine) | Metotrexato Amiodarone Metil-dopa Vitamina A |
| Criptogenetici | Causa incerta |

Tabella I. Principali agenti eziologici della cirrosi epatica, raggruppati in otto macro-gruppi.
HBV: Virus dell'epatite B; HCV: Virus dell'epatite C; HDV Virus dell'epatite D. *Principali agenti eziologici. Tratta da (4)

Infezione da HBV. I soggetti affetti da infezione cronica da HBV sono circa 300 milioni in tutto il mondo (prevalenza mondiale 3,9%)(11). A sviluppare infezioni croniche da HBV sono il 90% dei bambini che contrae il virus e il 5-10% degli adulti(4). Tuttavia non tutti i soggetti con un'infezione cronica da HBV hanno il

medesimo rischio di evoluzione, infatti la maggior parte dei soggetti non sviluppa cirrosi, bensì solo una percentuale variabile del 15-40%(12). Il rischio annuo di sviluppare cirrosi essendo affetti è del 1,6%(13,14). Ciò è dovuto al fatto che i pazienti con infezione cronica da HBV possono essere: i portatori sani, che non hanno evidenza di danno epatico e non sono pertanto a rischio di evoluzione; pazienti con epatite B cronica attiva, in cui c'è flogosi epatica e c'è pertanto il rischio di evoluzione in cirrosi epatica.

Infezione da HCV. È la seconda causa eziologica per frequenza di cirrosi epatica. Al mondo, nel 2017, si contavano circa 184 milioni di soggetti aventi l'infezione, anche se probabilmente la prevalenza è variata di molto negli ultimi anni, soprattutto nei paesi occidentali, in virtù dello sviluppo di protocolli terapeutici efficaci(15). Il virus è noto per indurre una forte infiammazione a livello epatico in tutti i soggetti in cui replica, con conseguente fibrosi, cirrosi o epatocarcinoma. I pazienti infetti hanno un rischio di evoluzione a cirrosi del 0,6%-1,4% annuo(15). Un problema rilevante nel contesto dei pazienti affetti da HCV è la coinfezione con HIV. Si contano circa 2,3 milioni di soggetti con co-infezione HCV-HIV, più del 50% dei quali fanno uso di sostanze per via parenterale(16).

NAFLD/NASH. La steatosi epatica non-alcolica (NAFLD) e la steato-epatite non-alcolica (NASH) sono condizioni patologiche associate a malattie metaboliche. La frequenza di associazione è riportata in Tabella II(17). Inoltre va sottolineato che il danno epatico in corso di dismetabolismi dipende non solo dall'assetto metabolico del paziente, ma

| Patologia | Frequenza di associazione |
|------------------------|---------------------------|
| Obesità | 51% |
| Diabete mellito tipo 2 | 23% |
| Iperensione arteriosa | 39% |
| Iperlipidemia | 69% |
| Sindrome metabolica | 43% |

Tabella II. Frequenza delle patologie che si riscontrano in comorbilità con la NAFLD e la NASH.

anche dalla genetica del soggetto: è stato osservato che polimorfismi di specifici geni, come Ile148Met del gene PNPLA3, aumentano il rischio di sviluppare NAFLD o NASH fino a tre volte rispetto ai portatori del gene non mutato(18). D'altro canto sono stati individuati polimorfismi protettivi verso il danno metabolico a livello epatico, come quelli al gene HSD17B13(19). Recentemente, inoltre, si è iniziato a parlare di MAFLD (ossia *Metabolic Associated Fatty Liver*

Disease), piuttosto che di NAFLD/NASH, in quanto permette di raggruppare tutti i pazienti sotto un unico agente lesivo: il danno metabolico(20). Inoltre in questo modo non si esclude che alla componente metabolica possa associarsi anche una componente alcolica oppure una componente virale(20). Il danno epatico su base metabolica è destinato a divenire il principale agente eziologico di cirrosi epatica e questo pone delle grandi problematiche in termini di screening, in quanto la diagnosi spesso necessita di metodiche invasive come la biopsia epatica(21). Si stima inoltre che in futuro diventerà la principale indicazione al trapianto di fegato(22).

1.1.3 Patogenesi della cirrosi epatica e delle sue complicanze

Alterazione della struttura epatica. Il *primum movens* per lo sviluppo di cirrosi epatica è il danno cronico a carico del parenchima epatico e dei vasi del fegato, mediato da uno o più agenti eziologici(23,24). Questo danno porta al rilascio, come in ogni contesto infiammatorio, di citochine pro-infiammatorie (TNF α ; IL-2; IL-6; PDGF β ; TGF β). Nel parenchima epatico queste sono responsabili della trasformazione delle cellule stellate di Ito, che normalmente sono semplici depositi di vitamina A, in cellule in grado di sintetizzare collagene. Esse assumono dunque un fenotipo simil-fibroblastico(23). La matrice prodotta da queste cellule occupa dapprima lo spazio sub-endoteliale di Disse, portando a capillarizzazione dei sinusoidi epatici, per poi estendersi alle zone di necrosi, determinando la formazione di setti porto-portali e porto-centrali. Questi inglobano segmenti di parenchima epatico portando alla formazione di noduli di rigenerazione.

Aumento della pressione portale e apertura dei circoli collaterali. La distorsione della struttura dei vasi e la presenza dei noduli di rigenerazione determinano un progressivo aumento delle resistenze intraepatiche, fino all'instaurarsi di ipertensione portale. L'aumento della pressione portale è uno dei fenomeni cardine nella patogenesi e nell'evoluzione del quadro clinico. Fisiologicamente il gradiente tra vene sovra-epatiche e vena porta è di 1-5 mmHg. Si parla di ipertensione portale, quando il gradiente supera i 5 mmHg, di ipertensione portale clinicamente significativa quando supera i 10 mmHg (25,26). A determinare ipertensione inoltre è l'instaurarsi, sempre a livello intraepatico, di uno squilibrio tra agenti

vasodilatatori e vasocostrittori, con un aumento dell'effetto di quest'ultimi(27). Un aspetto particolare è la diminuita produzione di ossido nitrico nei sinusoidi epatici a livello basale, che può tuttavia decrescere ulteriormente durante eventi acuti come le infezioni(28). In questi casi si assiste ad un rapido incremento della pressione in vena porta. L'aumento della pressione portale determina l'apertura di circoli collaterali, ossia le anastomosi porto-cavali, normalmente collassate in virtù delle loro più elevate resistenze. Il sangue che si impegna in questi vasi evita il filtro epatico e si riversa nel sistema cavale ricco di sostanze tossiche di derivazione intestinale (primo tra tutti l'ammonio). L'apertura delle anastomosi ha dunque due principali effetti: il primo è la formazione di varici, tipicamente a livello esofageo, ma anche a livello rettale e addominale; il secondo è l'instaurarsi di uno shunt porto-sistemico.

Vasodilatazione splancnica e circolazione iperdinamica. L'aumento delle resistenze intraepatiche e l'aumento della pressione portale inducono vasodilatazione splancnica(29). È un fenomeno diametralmente opposto a quello che si osserva nella circolazione intraepatica. Le cellule endoteliali degli organi

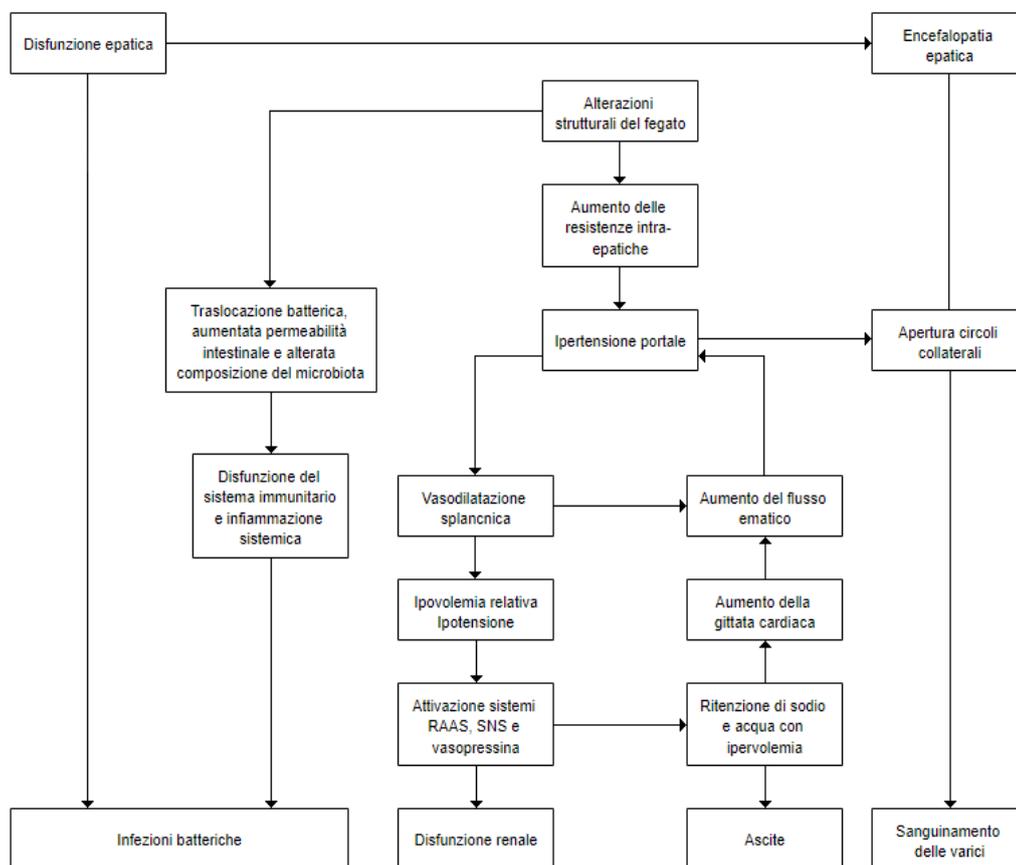


Figura 1. Riassunto della fisiopatologia delle complicanze della cirrosi e delle sue complicanze. Immagine tradotta e modificata dall'articolo (4)

splanchnici infatti aumentano la produzione di ossido nitrico in risposta dapprima alle *sollecitazioni di taglio* sulle pareti vascolari, in un secondo momento in risposta ad altri stimoli, quali la traslocazione batterica e lo stato pro-infiammatorio del paziente affetto da cirrosi(30,31). Il ridotto tono delle arteriole splanchniche fa sì che una maggior quota di gittata cardiaca venga veicolata agli organi addominali. Si è calcolato ad esempio che il flusso in arteria mesenterica superiore triplichi nei soggetti affetti da cirrosi epatica rispetto ai soggetti sani(29). Tale “furto di gittata” ha due principali effetti: il primo è quello di aumentare ulteriormente la pressione in vena porta per aumento del flusso di sangue. Il secondo è quello di determinare un calo del volume effettivo circolante, con conseguente ipotensione e attivazione dei sistemi vasocostrittori (sistema nervoso autonomo simpatico; sistema renina-angiotensina-aldosterone; rilascio non osmotico di vasopressina)(29). I meccanismi di compenso permettono di integrare la quota di sangue che viene sottratta dalla circolazione splanchnica, in particolare di mantengono stabile il flusso di sangue attraverso le carotidi, ma le ripercussioni a livello cardiocircolatorio sono importanti. Il cuore pompa anche fino a 8-10L di sangue al minuto a frequenze mediamente più elevate, in quella che è nota come circolazione iperdinamica(29).

Microbiota, traslocazione batterica e infiammazione sistemica. Sono tutti aspetti di recente scoperta, in quanto è stato evidenziato che l’alterazione del microbiota e la progressione della cirrosi sono fenomeni intrinsecamente legati gli uni gli altri. Si è riusciti a dimostrare infatti che i soggetti affetti da cirrosi hanno un impoverimento delle specie autoctone e un parallelo aumento di specie patologiche, quali ad esempio *Enterococcus spp* e *Peptostreptococcus Spp*(32,33). L’alterato microbiota induce poi uno stato di flogosi intestinale, con rottura della barriera intestinale e traslocazione batterica. Una volta in circolo i batteri non vengono filtrati a livello epatico, sia per la disfunzione del fegato intrinseca alla condizione di cirrosi epatica, sia per lo shunt dovuto alle anastomosi porto-cavali(34). Si avrà dunque l’induzione di uno stato infiammatorio sistemico supportata da PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) e DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*), con una disfunzione del sistema immunitario associata. Questa condizione è nota per favorire fenomeni infettivi di varia natura, nonché episodi di scompenso acuto e danno multiorgano(35).

L'inflammation sistemica è inoltre aggravata dall'aumento delle endotossine, prodotte e riversate in circolo dall'alterato microbiota intestinale(36).

1.1.4 Manifestazioni cliniche

Le manifestazioni cliniche della cirrosi epatica compensata sono difficili da evidenziare, soprattutto perché non necessariamente alterano la qualità di vita del paziente. È molto frequente infatti osservare come prima manifestazione clinica quelle che vengono definite come le complicanze della cirrosi epatica. Tali complicanze tuttavia possono associarsi ad altri segni obiettivabili, che compaiono comunque in fasi tardive della cirrosi epatica. La Tabella III riporta alcuni di questi segni clinici, apprezzabili durante un esame obiettivo correttamente svolto (4). Non è chiaro che correlazione ci sia tra i segni riportati e la condizione di cirrosi epatica, ma

| Segni di cirrosi epatica |
|-------------------------------|
| Eritema palmare |
| Unghia di Terry |
| Morbo di Dupuytren* |
| Ingrandimento della parotide* |
| Subittero |
| Prurito |
| Ginecomastia |
| Ipogonadismo |
| Nevi aracniformi |
| Splenomegalia |
| <i>Caput medusae</i> |
| Epatomegalia |

Tabella III. Segni visibili nei pazienti cirrotici con relativa frequenza. *: condizione principalmente legata ad abuso alcolico.

per alcuni vi sono delle ipotesi. I nevi aracniformi (piccoli angiomi cutanei) sembrano dipendere da un aumento dell'espressione di VEGF-A circolanti (una volta si pensavano dipendere unicamente dagli estrogeni), mentre la comparsa di ginecomastia e ipogonadismo sembrano dipendere da un alterato metabolismo degli ormoni sessuali a livello epatico, in particolare degli estrogeni(37,38).

Ascite. Accumulo di liquido libero nella cavità peritoneale(39). Vede le sue basi fisiopatologiche nell'ipertensione portale e nella ritenzione idrica caratteristica della circolazione iperdinamica. Può essere infine favorita da condizioni di ipoalbuminemia, anch'esse tipiche della cirrosi epatica e secondarie all'insufficienza d'organo. L'ascite rappresenta la principale complicanza della cirrosi, tant'è che il 5-10% di tutti i pazienti affetti da cirrosi la sviluppa almeno una volta all'anno(40). L'esame gold standard che permette di attribuire l'ascite all'ipertensione portale è lo studio del gradiente siero-ascite di albumina (SAAG): un valore $\geq 1,1$ g/dL ha un'accuratezza diagnostica del 97%(41). Clinicamente si

riconoscono tre gradi di ascite (Tabella IV)(42). I segni e i sintomi dipendono dal grado di ascite. Quando il liquido ascitico raggiunge una quantità di 1-2 litri, il paziente nota un aumento della circonferenza addominale, associato ad edemi declivi(43). L'aumento della pressione intra-addominale comporta inoltre un senso di sazietà precoce, legata alla compressione dello stomaco, con possibile malnutrizione del paziente. Se il versamento si fa più importante iniziano a comparire anche complicanze respiratorie(43). Oltre al grado di ascite è importante specificare se l'ascite è:

- non complicata: ossia quando la si può mobilizzare con la restrizione del sodio e l'utilizzo di diuretici e non si accompagna a infezioni o ad insufficienza renale acuta;
- ricorrente: ossia quando questa, nonostante ottimale terapia medica, si ripresenta sotto forma di ascite di grado III fino ad un massimo di tre o quattro volte all'anno;
- refrattaria: ossia quando questa non può essere mobilizzata con la terapia medica per ridotta risposta alla terapia medica ottimale (ascite refrattaria resistente) o per comparsa di effetti collaterali della terapia diuretica, per cui bisogna ridurre il dosaggio di quest'ultimi (ascite refrattaria intrattabile).

| Classificazione dell'ascite | |
|-----------------------------|--|
| Grado | Descrizione |
| Grado I | Ascite apprezzabile solo all'esame ultrasonografico dell'addome. |
| Grado II | Ascite apprezzabile all'esame obiettivo come ottusità addominale che varia al variare della posizione. |
| Grado III | Ascite apprezzabile all'ispezione per importante tensione addominale e segno del fiotto positivo. |

Tabella IV. Classificazione dell'ascite per gradi.

Peritonite batterica spontanea e altre infezioni. La peritonite batterica spontanea (PBS) è un'infezione batterica del liquido ascitico senza un evidente sorgente addominale di infezione trattabile chirurgicamente(39). La clinica è molto eterogenea e varia dall'asintomaticità a quadri clinici caratterizzati da nausea e vomito, dolore addominale, diarrea o altri sintomi aspecifici(4). È una complicanza grave della cirrosi, con una mortalità intraospedaliera che arriva al 20%(44). Per tale motivo tutti i pazienti affetti da cirrosi epatica che vengono ricoverati per un evento acuto e che presentano ascite sono sottoposti a paracentesi diagnostica al

fine di escludere l'infezione del liquido ascitico. La diagnosi di PBS è effettuata mediante conta dei polimorfonucleati nel liquido ascitico (>250 polimorfonucleati/ μL), indipendentemente dal risultato delle colture, poiché queste sono falsamente negative nel 50% dei pazienti(39). Oltre a poter essere soggetti a PBS, i soggetti cirrotici, in virtù della disfunzione del sistema immunitario e della traslocazione intestinale di batteri, hanno un maggior rischio di sviluppare infezioni, tant'è che il 25-46% dei pazienti cirrotici ammessi in ospedale è portatore, anche asintomatico, di infezione batterica(45,46). Esse sono uno dei principali fattori precipitanti di: uno scompenso acuto della malattia (comparsa di una o più complicanze della cirrosi epatica); un episodio di insufficienza renale acuta; un episodio di insufficienza epatica acuta su cronica (comparsa di insufficienza epatica associata ad insufficienza d'organo)(47). Insieme alla PBS, la più frequente infezione nei soggetti cirrotici è quella delle vie urinarie, seguita poi dalle polmoniti, dalle infezioni della cute e dei tessuti molli(39).

Sanguinamento gastrointestinale da varici esofagee. Presenza nel tratto gastrointestinale di sangue o sue componenti dovuta a rottura delle varici e che manifesta clinicamente con ematemesi, ematochezia o melena. È la seconda complicanza più frequente dopo lo sviluppo di ascite(39). Le varici, che si formano per apertura delle anastomosi porto-cavali, sanguinano spontaneamente nel momento in cui la pressione all'interno delle varici stesse supera la resistenza elastica della parete vasale e questo tipicamente avviene per gradienti pressori tra vene sovra-epatiche e vena porta superiori ai 12 mmHg(48). La loro rottura può essere un evento drammatico ed impatta negativamente sulla prognosi dei pazienti con cirrosi epatica, con un rischio di mortalità a 6 settimane del 20% dopo l'evento acuto.

Encefalopatia epatica. L'encefalopatia epatica (HE) è definita come una disfunzione cerebrale causata da insufficienza epatica e/o shunt portale-sistemico, che si manifesta come un ampio spettro di disturbi neurologici o psichiatrici che vanno dalle alterazioni subcliniche al coma(49). La classificazione in gradi secondo West Haven Criteria (WHC) dell'encefalopatia epatica è riportata in Tabella V(49). Risulta utile inoltre la classificazione secondo ISHEN (International Society of Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism) in:

- encefalopatia silente (minima e grado I): alterazioni subcliniche valutabili unicamente mediate test neuropsichiatrici; alcuni test utilizzati per la diagnosi di encefalopatia epatica nelle fasi più precoci sono il PHES (*Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*) e, di più recente introduzione, l'ANT (*Animal Naming Test*)(50).
- encefalopatia manifesta (grado II-III-IV): alterazioni clinicamente evidenti, anche senza l'utilizzo di test neuropsichiatrici.

La prevalenza di encefalopatia manifesta al momento della diagnosi di cirrosi è del 10-14%, mentre sale al 16-21% in caso di scompenso acuto. Stime della prevalenza di encefalopatia epatica minima (MEE) nei pazienti con cirrosi suggeriscono una prevalenza che va dal 20% all'80%(51). Tra tutte le complicanze, è quella che maggiormente impatta sulla qualità di vita non solo del paziente, ma anche delle persone che del malato si prendono cura(52).

| Gradi di encefalopatia epatica | | |
|--------------------------------|-------------------|--|
| Gradi WHC, inclusa MEE | ISHEN | Descrizione |
| Assente | - | Nessuna anomalia. |
| Minima | Silente (Covert) | Alterazioni neuropsicologiche o psicometriche ai test che esplorano la velocità psicomotoria o le funzioni esecutive; alterazioni neurofisiologiche senza evidenza clinica di cambiamento dello stato mentale. |
| Grado I | | Lieve riduzione della consapevolezza; euforia od ansia; riduzione della capacità attentiva; inadeguatezza nell'esecuzione di addizioni e sottrazioni. |
| Grado II | Manifesta (Overt) | Letargia o apatia; disorientamento temporale; palese cambiamento di personalità; comportamento inappropriato. |
| Grado III | | Dalla sonnolenza al semi-stupor; responsivo agli stimoli; confuso; grossolanamente disorientato; comportamento bizzarro. |
| Grado IV | | Coma |

Tabella V. Gradi di encefalopatia e descrizione. WHC: *West Haven Criteria*. MEE: Minima Encefalopatia Epatica; ISHEN: *International Society of Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism*.

Insufficienza renale acuta (IRA) e sindrome epato-renale (HRS). Nei pazienti con cirrosi epatica l'insufficienza renale acuta è definita come un aumento della creatinina sierica $\geq 0,3$ mg/dL ($\geq 26,5$ $\mu\text{mol/L}$) in 48 ore oppure un aumento della creatinina sierica $\geq 50\%$ in 7 giorni(39). Va sottolineato però che la creatinina sierica

non è un parametro affidabile per la diagnosi di IRA nei soggetti affetti da cirrosi, poiché le formule che estraggono la velocità di filtrazione glomerulare, in questi soggetti, tendono a sovrastimarla. C'è dunque il rischio di avere falsi negativi(53–55). Inoltre non è opportuno utilizzare l'output urinario come mezzo per la diagnosi, poiché i pazienti affetti da cirrosi sono spesso in terapia con farmaci diuretici(56). Definita l'insufficienza renale acuta, si può poi classificare la stessa secondo quanto riportato nella Tabella VI. Tanto maggiore sarà l'incremento della creatinina, tanto peggiore sarà la prognosi(39). Le più comuni cause di danno renale nel paziente affetto da cirrosi sono le infezioni batteriche, i farmaci diuretici e/o nefrotossici e il sanguinamento gastro-intestinale. La più frequente forma di insufficienza renale acuta è quella a genesi pre-renale (68% delle IRA nei pazienti cirrotici ospedalizzati)(4). La sindrome epatorenale invece viene definita come un'insufficienza renale funzionale causata da vasocostrizione intra-renale che si verifica in pazienti con malattia epatica allo stadio terminale, così come nei pazienti con insufficienza epatica acuta o epatite alcolica(57,58). I criteri per la diagnosi sono stati rivisti nel 2015 e sono riportati nella Tabella VII.

| Definizioni e diagnosi di insufficienza renale acuta nei pazienti affetti da cirrosi epatica | | | |
|--|--|--|---|
| Valore di s-Cr di riferimento | Un qualsiasi valore di s-Cr ottenuto nei tre mesi precedenti, quando disponibile, può essere utilizzato come valore di s-Cr di riferimento. Nei pazienti con più di un valore di s-Cr nei tre mesi precedenti deve essere utilizzato il valore più vicino al momento del ricovero in ospedale. Nei pazienti senza un precedente valore di s-Cr, può essere considerato come valore di s-Cr di riferimento quello ottenuto al momento del ricovero. | | |
| Definizione di IRA | <ul style="list-style-type: none"> - Aumento di s-Cr $\geq 0,3$ mg/dL ($\geq 26,5$ $\mu\text{mol/L}$) entro 48 h; - Aumento percentuale s-Cr $\geq 50\%$, noto o presunto, che si sia verificato in 7 giorni. | | |
| Stadiazione di IRA | Stadio 1 | Stadio 1A: S-Cr $< 1,5$ mg/dL | Aumento di s-Cr $\geq 0,3$ mg/dL ($\geq 26,5$ $\mu\text{mol/L}$) oppure aumento di s-Cr da $\geq 1,5$ volte a 2 volte rispetto al basale. |
| | | Stadio 1B: S-Cr $\geq 1,5$ mg/dL | |
| | Stadio 2 | Aumento di s-Cr da > 2 volte a 3 volte rispetto al basale. | |
| Stadio 3 | Aumento di s-Cr > 3 volte rispetto al basale; s-Cr $\geq 4,0$ mg/dL (353,6 $\mu\text{mol/L}$) con un aumento acuto $\geq 0,3$ mg/dL ($\geq 26,5$ $\mu\text{mol/L}$); inizio della terapia renale sostitutiva. | | |
| Tabella VI. Tabella ricavata, tradotta e modificata da ICA-AKI. S-Cr: creatinina sierica. | | | |

| Criteri per la diagnosi di sindrome epato-renale | |
|--|--|
| HRS-AKI | (1) Aumento di s-Cr $\geq 0,3$ mg/dL ($\geq 26,5$ $\mu\text{mol/L}$) entro 48 h o aumento percentuale s-Cr $\geq 50\%$ rispetto al valore di riferimento della creatinina (considerare come valore di riferimento una qualsiasi msurazione della creatinina nei 3 mesi precedenti. Se sono presenti più valori di riferimento utilizzare quello più recente); (2) Assenza di risposta alla sospensione dei diuretici e all'infusione di albumina 1 g/kg/die per due giorni; (3) Presenza di ascite; (4) Assenza di shock; (5) Non recente assunzione di farmaci nefrotossici (ad esempio FANS, mezzo di contrasto iodato); (6) Assenza di danno renale strutturale confermato da: assenza di proteinuria (proteine $< 0,5$ g/die); assenza di ematuria (< 50 globuli rossi per campo ad alto ingrandimento); assenza di alterazioni all'ecografia dei reni. |
| HRS-AKD | eGFR < 60 mL/min/1,73m ² per < 3 mesi in assenza di altre potenziali cause di danno renale oppure incremento della creatinina sierica $< 50\%$ rispetto ad un valore di riferimento della creatinina misurato nei 3 mesi precedenti. |
| HRS-CKD | eGFR < 60 mL/min/1,73m ² per ≥ 3 mesi in assenza di altre potenziali cause di danno renale. |

Tabella VII. Criteri per la diagnosi di sindrome epato-renale. HRS: sindrome epato-renale; AKI: *Acute Kidney Injury*; AKD: *Acute Kidney Disease*; CKD: *Chronic Kidney Disease*; FANS: farmaci anti-infiammatori non steroidei.

1.1.5 Diagnosi

Gli elementi che permettono di porre diagnosi di cirrosi epatica dipendono molto dal momento in cui si intercetta il paziente. Se il paziente non è un epatopatico noto e se la cirrosi epatica si mantiene asintomatica è improbabile riuscire a porre diagnosi prima che esso sviluppi almeno una delle complicanze della malattia. Manifestatasi la complicanza la diagnosi può essere abbastanza agevole. Per porre una diagnosi completa invece è necessario eseguire comunque diversi esami, sia laboratoristici, che di imaging. Gli obiettivi della diagnosi devono essere:

- Valutare il grado di fibrosi epatica: il gold standard per la quantificazione della fibrosi resta la biopsia epatica, tuttavia le indicazioni di quest'ultima si sono notevolmente ridotte negli anni e, ad oggi, non è più consigliata per tale scopo. Possono essere invece sfruttate altre tecniche, come l'elastografia. Questa permette di studiare in modo rapido e non invasivo la rigidità, e dunque la fibrosi, epatica. Posto il cut-off al 14,5 kPa, l'elastografia come test per l'identificazione della cirrosi epatica ha una sensibilità 0,83 e una specificità 0,89(59).

-
- Valutare il grado di ipertensione portale: l'esame gold standard per quantificare la pressione portale è il cateterismo trans-giugulare, con misurazione del gradiente tra vena porta e vene sovra-epatiche. Tuttavia tale metodica è invasiva e pertanto non utilizzabile di routine nella pratica clinica. Come suo surrogato si stanno studiando molti approcci non invasivi, anche se nessuno è in grado di stimare con sufficiente precisione il gradiente pressorio trans-epatico. Un esame di imaging che può essere utilizzato per valutare i segni indiretti di ipertensione portale è l'ecografia. Quello che si va ad osservare è la presenza di dilatazione della vena porta, la variazione del diametro della vena stessa con gli atti respiratori, la splenomegalia, l'ascite e la presenza di circoli collaterali(60). Sempre mediante ecografia, utilizzando la modalità Doppler, è possibile andare a studiare il flusso di sangue in vena porta (rallentamento del flusso ematico sino ad inversione - flusso epatofugo)(60). Se il paziente ha già sviluppato complicanze della cirrosi epatica, possiamo già supporre che la pressione in vena porta sia aumentata, poiché esse sono correlate ad ipertensione portale.
 - Determinare l'eziologia della cirrosi epatica: sebbene la cirrosi sia una condizione non reversibile, andare a trattare la causa e le possibili concause aiuta a mantenere stabile il danno epatico e ad evitare lo sviluppo di complicanze. Per le più frequenti eziologie di cirrosi esistono infatti efficaci terapie: per l'epatite C sono disponibili farmaci in grado di eradicare l'infezione; per l'epatite B farmaci in grado di sopprimere la replicazione virale; per le cirrosi di natura alcolica e metabolica si possono adottare modifiche dello stile di vita che limitano il sovraccarico del fegato. La determinazione dell'eziologia necessita di una buona raccolta anamnestica e di esami ematochimici dedicati.
 - Valutare lo stato generale del paziente e la funzionalità epatica residua: esami di laboratorio devono essere volti a comprendere lo stato generale del paziente (in particolare lo stato nutrizionale), la funzionalità renale, la funzionalità epatica, l'assetto coagulativo e lo stato infiammatorio del paziente. Essi devono inoltre essere funzionali al calcolo degli score prognostici quali ad esempio lo score Child-Pugh e il MELD score.

1.1.6 Prognosi

I pazienti affetti da cirrosi epatica hanno un'aspettativa di vita ridotta rispetto alla popolazione generale. Ad influire sul rischio di morte è anche lo stato di compenso di malattia. Pazienti con cirrosi epatica in stato di compenso hanno un rischio di mortalità cinque volte superiore alla popolazione generale, mentre tale rischio aumenta a dieci volte se la cirrosi epatica inizia a mostrare episodi di scompenso acuto. La mediana di sopravvivenza dei pazienti con cirrosi in fase di compenso è di 9-12 anni, mentre scende a 2 anni se il paziente ha una cirrosi decompensata(40,61). La probabilità che un paziente affetto da cirrosi epatica vada incontro ad un episodio di scompenso acuto in un anno dipende dall'eziologia: pazienti con cirrosi epatica da HCV hanno un rischio pari al 4% annuo; pazienti con cirrosi epatica su base alcolica hanno un rischio pari al 6-10% annuo (ancora più alto se continuano ad assumere bevande alcoliche); pazienti con cirrosi epatica da HBV hanno un rischio pari al 10% annuo. Tuttavia la sopravvivenza non dipende unicamente dalle caratteristiche della malattia epatica, ma, visto anche l'aumentare dell'età media dei pazienti affetti da cirrosi epatica, dalle comorbilità dei pazienti. Ci si aspetta che patologie cardiovascolari, patologie neoplastiche, diabete, sarcopenia e fragilità diventino i principali fattori che contribuiscono all'exitus del paziente. Per determinare il rischio di mortalità di un paziente ad oggi si predilige l'utilizzo di score utilizzabili direttamente a letto del malato (o in corso di

| Child-Pugh | | | |
|---------------------------|--------------------------------|--|--|
| | 1 punto | 2 punti | 3 punti |
| Albumina (g/L) | > 35 | 28 - 35 | < 28 |
| Bilirubina (mg/dL) | < 2 | 2 - 3 | > 3 |
| INR | < 1,7 | 1,7 - 2,3 | > 2,3 |
| Ascite | Assente | Lieve o Moderata Responsiva ai diuretici | Severa Non responsiva ai diuretici |
| Encefalopatia | Assente | Grado 1 o Grado 2 | Grado 3 o Grado 4 |
| Calcolo della classe | Rischio di mortalità a 12 mesi | Rischio di mortalità a 24 mesi | |
| 5-6 punti: Classe A | 0% | 15% | |
| 7-9 punti: Classe B | 20% | 40% | |
| 10-15 punti: Classe C | 55% | 65% | |

Tabella VIII. Child-Pugh score. Calcolo e rischio associato. INR: *International Normalized Ratio*

valutazione ambulatoriale). Il Child-Pugh, in Tabella VIII, score utilizza albumina, bilirubina, INR (oppure tempo di protrombina), presenza di ascite e presenza di encefalopatia epatica per classificare il paziente in tre diverse classi (A; B; C). Il rischio di mortalità aumenta all'aumentare della classe(62,63). Il Child-Pugh ha lo svantaggio di basarsi su due parametri soggettivi, quali la presenza di ascite e di encefalopatia.

| MELD Score – Rischio di mortalità a 3 mesi | | | | | |
|--|---|---------|---------|---------|-------|
| MELD score | $9,57 \times \ln(\text{creatinina}) + 3,78 \times \ln(\text{bilirubina totale}) + 11,2 \times \ln(\text{INR}) + 6,43$ | | | | |
| Punteggio MELD | <9 | 10 - 19 | 20 - 29 | 30 - 39 | 40 |
| Rischio mortalità | 1,9% | 6,0% | 19,6% | 52,6% | 71,3% |

Tabella IX. Algoritmo per il calcolo del MELD e rischio di mortalità a 3 mesi per ogni intervallo di punteggio del MELD score.

Il MELD score (*Model for End-stage Liver Disease*) utilizza solo variabili oggettivabili quali creatinina sierica, bilirubina e INR. Esso valuta il rischio di mortalità a 3 mesi mediante un algoritmo matematico (Tabella IX). Il risultato di tale algoritmo è un numero compreso tra 6 e 40, cui corrisponde un sempre più elevato rischio di mortalità(64). Nella Tabella IX è riportato il rischio di mortalità a tre mesi per ogni intervallo di MELD(65). Il MELD è stato poi aggiornato con l'aggiunta di una quarta variabile, predittrice indipendente di mortalità, ossia il sodio (MELD-Na)(66). Il MELD score viene utilizzato anche per decidere quando inserire un paziente in lista d'attesa per il trapianto di fegato. In particolare un paziente che sviluppa una complicanza della cirrosi e ha un MELD score ≥ 15 dovrebbe iniziare l'iter per la selezione(67,68). Esistono tuttavia situazioni in cui la valutazione del rischio di mortalità mediante MELD score non risulta affidabile (sottostima il rischio di mortalità). Tali condizioni sono l'insufficienza epatica acuta su cronica (soprattutto se insorge insufficienza respiratoria), epatocarcinoma, sindrome epato-polmonare e ipertensione porto-polmonare(4).

1.2 Epatocarcinoma

L'epatocarcinoma è la principale neoplasia primitiva del fegato(69,70). È una neoplasia che si sviluppa nel 90% dei casi in pazienti affetti da malattia epatica cronica(71). I principali fattori di rischio alla base di questa neoplasia sono dunque

gli stessi che conducono a cirrosi epatica, come l'abuso di alcol, le infezioni virali (HBV, HCV, HDV) e, in occidente, la NAFLD/NASH(69). Recentemente sono stati fatti grossi passi avanti nella determinazione del profilo molecolare dell'epatocarcinoma, ma molto resta ancora da definire sulla sua carcinogenesi anche perché le principali mutazioni implicate nello sviluppo del tumore non sono facili bersagli da colpire farmacologicamente(72).

1.2.1 Epidemiologia

L'epatocarcinoma nel 2020 ha registrato 905.677 [IC95% 884.695,0 – 927.157,0] nuovi casi a livello mondiale, posizionandosi al sesto posto per incidenza tra le malattie neoplastiche. È invece al terzo posto per mortalità correlata a tumore. L'Est Asiatico e l'Africa hanno incidenza e mortalità più elevate, in particolare, il paese con il maggior numero di nuovi casi è stata la Mongolia, con un'incidenza stimata standardizzata per età di 85,6 casi/100.000/anno nel 2020. Negli USA e in Europa l'incidenza e la mortalità sono inferiori, infatti l'epatocarcinoma non rientra nemmeno tra le dieci neoplasie più frequenti ed è al sesto e all'ottavo posto per mortalità neoplastica negli USA e in Europa rispettivamente(73). L'incidenza e la mortalità hanno visto un trend in continuo aumento, tant'è che si è stimato che nel 2030 l'epatocarcinoma sarà la terza causa di morte per malattia tumorale anche nei paesi occidentali(74,75). In Italia invece l'epatocarcinoma rappresenta la tredicesima neoplasia per incidenza, con 11.739 [IC95% 11.099,2-12.415,7] nuove diagnosi nel 2020, e la quinta per mortalità(73,76).

1.2.2 Eziologia e fattori di rischio

I principali fattori di rischio per lo sviluppo di epatocarcinoma sono le patologie croniche evolutive del fegato, in particolare la cirrosi epatica(77,78). Le principali cause di malattia evolutiva del fegato in Europa e negli USA sono l'abuso di sostanze alcoliche, l'infezione da HCV e l'infezione da HBV(1). Cause minoritarie risultano essere invece la colangite biliare primitiva, l'emocromatosi e il deficit di α_1 -antitripsina(73). Un ruolo sempre più rilevante è assunto invece dalla NAFLD (*Non-Alcoholic-Fatty-Liver-Disease*) e dalla NASH (*Non-Alcoholic-Steato-Hepatitis*), che nei paesi industrializzati è in progressivo aumento e può evolvere in epatocarcinoma(79,80).

Abuso di sostanze alcoliche. L'abuso di sostanze alcoliche è tra i principali fattori di rischio per lo sviluppo di malattia cronica evolutiva del fegato, cirrosi epatica e epatocarcinoma. È stato dimostrato che il rischio di sviluppare epatocarcinoma è cinque volte maggiore in chi assume più di 80 g/die di alcol per più di 10 anni (equivalente a 6,7 unità alcoliche/die)(81) e che il 15-30% degli epatocarcinomi insorge in soggetti affetti da cirrosi alcol-correlata(82). Il rischio di sviluppare epatocarcinoma aumenta ulteriormente se questo si associa ad altri fattori di rischio come l'infezione da HBV o l'infezione da HCV(83,84).

Infezione da HBV. Fino al 45% dei tumori primitivi del fegato nei paesi dell'Est Asiatico, dell'America Latina e dell'Africa riconosce come causa HBV, mentre è meno rilevante come fattore di rischio in Europa e negli USA(1). Tale differenza è da ricercarsi sia nelle campagne vaccinali contro l'infezione da HBV, che ha portato ad una discreta prevenzione primaria, sia nella terapia antivirale (85,86). Questa ad oggi permette il controllo della replicazione virale nei pazienti affetti da infezione cronica attiva da HBV e si è dimostrata efficace nel ridurre non solo la progressione di malattia, ma anche il rischio di insorgenza di epatocarcinoma(87). Tuttavia tale rischio nei soggetti con infezione cronica da HBV non è completamente annullato. HBV infatti favorisce l'insorgenza di epatocarcinoma sia mediante l'induzione di infiammazione e cirrosi, sia mediante l'integrazione del genoma virale nel DNA della cellula infetta, con possibile comparsa di mutazioni pro-oncogeniche (mutagenesi inserzionale)(88-90). Per tale motivo anche soggetti con infezione cronica da HBV, ma non affetti da cirrosi epatica, sono da considerarsi ad aumentato rischio di sviluppare epatocarcinoma. Nei paesi in via di sviluppo, spesso gli epatocarcinomi da HBV riconoscono come cofattore l'esposizione all'Aflatossina B1, che agisce in modo sinergico all'infezione stessa(91). Infine va ricordato che esiste la possibilità di co-infezioni con HDV, che aumentano in modo considerevole il rischio di evoluzione neoplastica(92).

Infezione da HCV. L'infezione da HCV è tra i principali fattori di rischio di sviluppo di epatocarcinoma nei paesi occidentali, in particolare in Europa, negli USA e in Giappone(1,73). Tale primato è tuttavia destinato a finire, in quanto sempre più pazienti riescono a raggiungere una risposta virologica sostenuta grazie alle terapie con farmaci antivirali diretti, i quali hanno determinato una riduzione

del rischio di sviluppare epatocarcinoma del 50-80%(93–96). Va precisato che, a differenza di HBV, HCV non si integra nel genoma ospite (poiché è un virus a ssRNA) e pertanto sono da considerarsi a rischio di evoluzione ad epatocarcinoma solo i soggetti HCV positivi affetti da epatite cronica con fibrosi a ponte o da cirrosi. Per tale motivo tuttavia, anche se un paziente HCV+ positivo viene efficacemente trattato, permane comunque un rischio residuo di sviluppare epatocarcinoma, pari al 2% annuo, legato al danno che si è instaurato(97). Infine, la co-infezione di HCV con HIV è una situazione che porta ad un incremento del rischio di sviluppare cirrosi, di scompenso epatico e di epatocarcinoma(98).

NAFLD/NASH. La frequenza dell'eziologia metabolica come causa del danno epatico, della cirrosi e del conseguente sviluppo di epatocarcinoma è in costante aumento, tanto che, nel mondo occidentale, il 15-20% degli epatocarcinomi si sviluppa nel contesto di NASH, sia questa associata o meno a cirrosi(99). La crescita è tale per cui le previsioni indicano che gli epatocarcinomi che si svilupperanno in un quadro di danno metabolico supereranno in numero quelli dovuti ad abuso di sostanze alcoliche(100). Tra le malattie implicate nel danno metabolico, il diabete mellito di tipo 2, l'obesità e la sindrome metabolica sono le più considerate. Inoltre il diabete mellito di tipo 2 rappresenta un fattore di rischio indipendente e noto per lo sviluppo di epatocarcinoma(101,102). Un BMI elevato alla diagnosi di neoplasia, invece, correla con una mortalità cinque volte più elevata rispetto a chi, alla diagnosi, aveva un BMI normale(103). È stato infine dimostrato che adeguarsi ad una dieta e ad uno stile di vita sano, riduce il rischio di sviluppare epatocarcinoma(104).

Età e Genere. È stato osservato che i soggetti con epatocarcinoma hanno un'età avanzata, superiore ai 65-70 anni, e tendono ad essere soggetti di sesso maschile (M:F 2-3:1)(105,106).

1.2.3 Patogenesi molecolare

La patogenesi dell'epatocarcinoma è un fenomeno multi-step, che prevede l'accumulo progressivo di mutazioni che conferiscono alle cellule coinvolte un vantaggio in termini di proliferazione, invasività e sopravvivenza. Non vi è unanimità su quale sia effettivamente la cellula da cui origina la neoplasia. Alcuni

sostengono origini dalle cellule staminali epatiche, altri dagli epatociti maturi(107). A svolgere un ruolo determinante in questo contesto è il micro-ambiente in cui il tumore si sviluppa: nel 90% dei casi infatti la malattia nasce nel contesto di una flogosi cronica, spesso direttamente nella condizione di cirrosi epatica. Questo contesto pro-infiammatorio precede e accompagna il tumore in tutte le sue fasi(71). Gli epatocarcinomi che si sviluppano in un fegato pressoché sano possono essere dovuti all'integrazione del DNA di HBV nel genoma umano o da tossine specifiche (come Aflatossina B1).

Mutazioni driver. Sono state studiate alcune delle mutazioni più frequentemente riscontrate nei genomi dell'epatocarcinoma, considerate rilevanti nella carcinogenesi:

- hTERT: è la mutazione più frequente, osservata addirittura nel 60% delle lesioni. Nella maggior parte dei casi la mutazione è a livello del promotore (60%), più raramente è un'amplificazione del gene (5%) o un'alterazione dovuta ad inserzione del genoma virale di HBV (5%)(72). Nonostante quest'ultima evenienza sia rara, il promotore di hTERT rappresenta uno dei siti di elezione dell'integrazione di HBV con il genoma umano(90).
- Pathway di Wnt- β -Catenina: alterazioni di questa via del segnale sono state riscontrate nel 30-50% degli epatocarcinomi. Possono essere dovute a mutazioni al gene CTNNB1 (codificante per la β -Catenina) oppure, più raramente, a inattivazione dei geni AXIN1 o APC (inibitori della via di traduzione mediata da Wnt)(72,108).
- TP53: la sua mutazione è riscontrata nel 30% degli epatocarcinomi(72). Va ricordato che l'assunzione di Aflatossina B1 favorisce la comparsa di epatocarcinoma nei soggetti infetti da HBV e non infetti proprio perché favorisce la mutazione di questo gene (la mutazione è specifica ed è la R249S)(109).
- Geni per il rimodellamento della cromatina: sono state evidenziate mutazioni ai geni ARID1A (10%) e ARID2 (5%)(72).
- Altri geni coinvolti: altre alterazioni descritte sono a carico dei geni CCNA2, CCNE1, PTEN, RB1, RPS6KA3 e NFE2L2, tutti coinvolti nel controllo del ciclo cellulare. CCNA2 e CCNE1 sono altre sequenze in cui avviene frequentemente l'integrazione di HBV(110). Vi sono poi geni coinvolti

nell'epigenetica, nel controllo dello stress ossidativo e in altre vie di trasduzione del segnale (pathway di PI3K-AKT-mTOR; pathway che convergono sulle MAPK; pathway di JAK-STAT). Infine vi sono alcune amplificazioni ricorrenti, come quelle ai geni FGF19/CCND1 e VEGFA, che danno una spinta alla genesi tumorale mediante varie pathway pro-oncogene(72).

Nonostante i progressi nella conoscenza di mutazioni driver e del loro possibile coinvolgimento nella carcinogenesi epatica, queste sono state identificate solo nel 25% di tutti gli epatocarcinomi(72,111,112).

| Classi molecolari dell'epatocarcinoma | | | | |
|---|---|-----------------------------|---|------------------------|
| | Proliferation Class | | Non Proliferation Class | |
| Classi/Sottoclassi Molecolari Lee (Cluster A/B); Hoshida (S1-S3); TCGA (iCluster 1-3) | Cluster A | | Cluster B/S3/iCluster 2 | |
| | S2/iCluster 1 (Progenitor-like) | S1/iCluster 3 (TGFβ-Wnt) | | |
| Differenziazione delle cellule | Indifferenziate | | Moderatamente differenziate | |
| Eziologia più frequente | HBV | | HCV, alcol, NASH | |
| Caratteristiche genetiche | Instabilità cromosomica Mutazioni a TP53 Amplificazione FGF19/CCND1 Mutazioni al promotore hTERT | | Stabilità cromosomica Mutazioni al promotore hTERT | |
| Principali Pathway | mTOR, RAS-MAPK, MET signalling | | IL6-JAK-STAT | Wnt-β-Catenina (CNNB1) |
| | - | TGFβ e Wnt | | |
| Caratteristiche immunologiche | “active” | “exhausted” | “active” | “excluded” |
| Prognosi | Tumori più aggressivi | | Tumori meno aggressivi | |
| Invasione vascolare | Molto frequente | | Meno frequente | |
| Livelli sierici di αFP | Elevati | | Bassi | |

Tabella X. Classificazione molecolare dell'epatocarcinoma. αFP: α-Feto-Proteina; HBV: hepatitis B Virus; HCV: hepatitis C Virus; NASH: Non Alcoholic Steato-Hepatitis; TCGA: The Cancer Genome Atlas.

Classi molecolari dell'epatocarcinoma. Sulla base di studi genomici, epigenomici, istopatologici e immunologici è stata proposta una classificazione molecolare e immunologica dell'epatocarcinoma (Tabella X)(113–120). Si riconoscono principalmente due classi:

- Proliferation Class (50%): anche detta Cluster A, raccoglie forme di tumore dal comportamento clinico aggressivo, indifferenziate all'istologia e accompagnate da rapida invasione vascolare e livelli elevati di α FP circolanti. Tipicamente sono lesioni correlate all'infezione da HBV. Il genoma si caratterizza per una spiccata instabilità cromosomica e mostra mutazioni al gene TP53, amplificazioni dei geni FGF19/CCND1 e iperattivazione delle vie di segnale di mTOR, RAS-MAPK e MET. Esistono due sottoclassi:
 - S2/iCluster1: si caratterizza per cellule “progenitor-like”, che esprimono marcatori tipici delle cellule staminali (CK19+; EPCAM+; pERK+). Immunologicamente è un tumore “active”, ossia circondato da cellule infiammatorie, soprattutto linfociti T CD4+ e linfocito T CD8+.
 - S1/iCluster3: si caratterizza per un'attivazione anomala della via di Wnt e per una maggior produzione di TGF β , che porta ad un fenotipo immunologico “exhausted”: TGF β infatti inibisce l'attività dei linfociti T CD8+ e recluta linfociti T_{reg} (linfociti T regolatori). È un tumore che va facilmente incontro a transizione epitelio-mesenchimale e che si caratterizza per una maggiore espressione di SerpinB3(121).
- Non Proliferation Class (50%): raccoglie forme clinicamente meno aggressive, moderatamente differenziate all'istologia (cellule epatociti-like) e raramente accompagnate da invasione vascolare o da livelli elevati di α FP. Sono definiti anche tumori Cluster B/S3/iCluster2. Sono lesioni tipicamente associate a infezione da HCV, abuso di alcol e NASH. Il genoma mostra stabilità cromosomica, con frequenti mutazioni ad hTERT. Anche qui sono riconoscibili due sottoclassi:
 - Wnt- β -Catenina mutati: raccoglie forme di tumore in cui la mutazione ai geni della pathway di Wnt (più frequentemente al gene CTNNB1) esitano in un tumore immuno “excluded”, ossia con basso infiltrato di cellule immunitarie e un aumento delle cellule T_{reg} (linfociti T regolatori);

-
- Interferon-subclass: presenta mutazioni alla pathway IL6-JAK-STAT, che portano ad un micro-ambiente tumorale estremamente infiammato, con un eccesso di cellule T CD4+ e T CD8+.

1.2.4 Diagnosi

La diagnosi di epatocarcinoma avviene frequentemente nel contesto di un programma di screening, in quanto, come già detto precedentemente, esso tende a svilupparsi in una specifica popolazione a rischio, ossia coloro che sono affetti da cirrosi epatica di qualsiasi eziologia e coloro che hanno un'epatopatia cronica da HBV(122,123). La sorveglianza di questi pazienti fa sì che spesso il tumore venga riscontrato in fasi precoci, quando è ancora asintomatico. Più raramente, e soprattutto laddove i programmi di screening non sono efficaci, l'epatocarcinoma può manifestarsi con perdita di peso, sviluppo di dolore addominale o peggioramento della funzionalità epatica. Infine esso può manifestarsi come incidentaloma, ossia come una massa accidentalmente riscontrata durante un esame di imaging eseguito per altri motivi. Va tuttavia ricordato che gli incidentalomi epatici sono più frequentemente lesioni benigne, come accumuli focali di tessuto adiposo, cisti semplici oppure emangiomi(124). In alternativa, nella diagnosi differenziale degli incidentalomi epatici, vanno considerati anche i secondarismi di patologie neoplastiche extraepatiche, quali tumori al polmone, alla mammella o al colon-retto. La diagnosi di epatocarcinoma viene classicamente effettuata mediante esami di imaging. Nei casi dubbi si integra l'imaging con una biopsia e dunque con l'analisi istopatologica.

- Ecografia addome superiore: in mani esperte, raggiunge una sensibilità del 60-80% e una specificità superiore al 90% nel riscontro di masse epatiche(125). Non è tuttavia adatta alla diagnosi di certezza in quanto è una metodica operatore dipendente e potrebbe non essere possibile esplorare in modo ottimale il fegato del paziente (ad esempio in pazienti obesi), rischiando dunque falsi negativi(126). L'utilizzo dell'ecografia con mezzo di contrasto non è invece indicato, poiché, indipendentemente dal pattern della lesione dopo iniezione del contrasto, esami di imaging più approfonditi sono comunque necessari per stadiare la patologia prima del trattamento.
- TC/RM con mezzo di contrasto: la tomografia computerizzata (TC) è l'esame di scelta per lo studio delle masse epatiche sospette per epatocarcinoma nei

soggetti cirrotici, in quanto queste rispondono in modo particolare, e patognomonicamente, alla somministrazione del mezzo di contrasto. Si parla infatti di *Radiological Hallmark of HCC (HepatoCellular Carcinoma)*, ossia la precoce assunzione di mezzo di contrasto in fase arteriosa (*wash-in*) e la precoce perdita dello stesso in fase portale e/o *delayed (wash-out)* nel contesto di cirrosi epatica(127–130). Questo comportamento è dovuto al fatto che le lesioni maligne ricevono apporto ematico da rami dell'arteria epatica e per tale motivo sono raggiunti più rapidamente dal mezzo di contrasto. Al contrario invece i noduli rigenerativi sono vascolarizzati principalmente dal sistema portale e pertanto assumeranno il mezzo di contrasto più tardivamente, quando le lesioni maligne lo stanno invece perdendo. Con questi criteri l'imaging si dimostra la tecnica migliore per porre diagnosi di epatocarcinoma con una sensibilità anche del 89% e una specificità del 96% per masse di diametro maggiore di 1 centimetro e senza bisogno di biopsia(131). Tuttavia è importante sapere che questo comportamento è considerato patognomonicamente solo se il paziente è cirrotico, o comunque ad elevato rischio di epatocarcinoma (come nel caso di un'epatite cronica da HBV): negli altri casi dovrebbe essere fatta una biopsia epatica per confermare la diagnosi. La risonanza magnetica (RM) con mezzo di contrasto ha pari accuratezza diagnostica, ma aggiunge informazioni anche riguardo la steatosi epatica, la presenza di pseudo-capsula, la comparsa di eventuali lesioni che si mostrano solo ipointense in fase venosa ed eventuali iperintensità nelle sequenze DWI(132,133). Tuttavia, vista la non superiorità e il costo maggiore, anche se può fornire molte altre informazioni, di solito viene preferita la TC con mezzo di contrasto come esame diagnostico. Indipendentemente da quale esame si decide di usare per primo, è possibile, in caso di negatività, eseguire l'altro esame radiografico prima di candidare il paziente alla biopsia epatica(78).

- Biopsia epatica: viene utilizzata quando la massa sospetta per epatocarcinoma non presenta il *Radiological Hallmark of HCC*. Il 10% degli epatocarcinomi (ma fino al 30% se di diametro di 1-2 centimetri) hanno una presentazione radiologica atipica. Sono stati proposti dei criteri per la diagnosi istopatologica di epatocarcinoma, tuttavia la sensibilità di tali criteri è di circa il 70%, addirittura minore per lesioni di diametro inferiore ai 2 centimetri(134). In virtù della scarsa accuratezza diagnostica, un nodulo sospetto negativo alla biopsia

deve comunque essere seguito nel tempo con esami di imaging ed eventualmente essere biopsiato di nuovo(127).

1.2.5 Screening

I pazienti affetti da cirrosi epatica sono considerati a rischio di sviluppare epatocarcinoma e pertanto sono sottoposti a screening (vedi Figura 2 - (135)). In particolare le popolazioni target sono i pazienti affetti da cirrosi epatica in fase di compenso, indipendentemente dalla causa, e coloro che sono affetti da epatite cronica da HBV(135,136). Va sottolineato che lo studio con il più alto livello di evidenza è stato fatto su quest'ultima categoria. Si tratta di uno studio cinese randomizzato e controllato, che reclutò 17.920 persone HBV+ ed osservò un calo della mortalità per epatocarcinoma del 37% nei soggetti che venivano sottoposti a regolare screening(137). Lo studio randomizzato-controllato che avrebbe dovuto dare il massimo livello di evidenza allo screening dei soggetti cirrotici fu invece interrotto, poiché coloro che erano disposti ad accettare il rischio di non sottoporsi a screening erano troppo pochi(138). La raccomandazione di screening in soggetti cirrotici ha dunque un livello di evidenza minore (livello II). Modelli decisionali supportano comunque il costo-beneficio dei programmi di screening nei soggetti a rischio, indipendentemente dal livello di evidenza(139). Lo screening deve essere effettuato ad intervalli di 6 mesi. Intervalli più lunghi (12 mesi) danno risultati peggiori in termini di sopravvivenza, mentre intervalli più brevi (3 mesi) non si sono dimostrati più efficaci(140,141). Gli esami che si utilizzano nello screening dei pazienti sono:

- Ecografia epatica: è l'esame di scelta nel monitoraggio dei pazienti a rischio, per via della sua facile esecuzione, della bassa invasività e del basso costo.
- α -FetoProteina (α FP): è il più comune marker tumorale utilizzato, ma non tutte le linee guida lo raccomandano in egual modo. Anche considerando il cut-off più efficiente (10-20 ng/mL) le sue caratteristiche restano scarse (Sensibilità: 60%; Specificità: 80%)(142).

Le raccomandazioni dunque ad oggi sono quelle di combinare l'utilizzo di ecografia epatica e di α FP, in modo da aumentare la percentuale di rilevazioni dello screening, anche a costo di aumentare i falsi positivi(125,143). È importante sottolineare che non tutti i soggetti affetti da cirrosi epatica o da infezione cronica da HBV devono

essere sottoposti a screening. Ci sono pazienti che, per importanti comorbidità o per funzione epatica estremamente compromessa, non potrebbero essere trattati per epatocarcinoma una volta avvenuta la diagnosi. In questi casi lo screening non deve essere proposto. L'algoritmo per lo screening dei soggetti cirrotici è riportato in figura 2(144). Nel campo dello screening per l'epatocarcinoma ci sono tuttavia anche altri marcatori in corso di studio. Questi sono un'importante campo di ricerca nell'ambito della prevenzione, in virtù della loro bassa invasività e facile replicabilità, ma nessuno ha dimostrato una effettiva superiorità rispetto alla più comune α FP(142). Tra i marcatori studiati troviamo α FP-L3. Questa è una delle tre isoforme di α FP, in particolare quella in grado di legare la lectina agglutinina di *Lens culinaris*. Questa isoforma di α FP è prodotta unicamente da cellule di epatocarcinoma e per tale motivo è più specifica dell' α FP stessa(145). Nella diagnosi di epatocarcinoma in qualsiasi stadio, α FP-L3 ha una sensibilità del 48% e una specificità del 93%(146). Nella diagnosi di epatocarcinoma nelle sue fasi più precoci invece, α FP-L3 ha una specificità del 97%, a discapito però di una sensibilità del 28% (142). Nuovi metodi per la misurazione di questo parametro sembrano migliorare la sua sensibilità, anche se questa raggiunge valori comunque non ottimali(147). La *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato α FP-L3 come biomarcatore di epatocarcinoma. Tra i marcatori studiati vi è poi des- γ carbossiprotrombina (DCP). Essa è definita anche protrombina indotta dall'assenza di vitamina K II (PIVKA-II), in virtù del meccanismo con il quale si viene a creare. Nel contesto della carcinogenesi epatica infatti gli enzimi vitamina K dipendenti deputati alla carbossilazione sono alterati e non avviene una corretta modifica post-traduzionale della protrombina, che porta alla formazione di DCP(148). Essa sembra poter aumentare la sensibilità dell' α FP fino al 91% nella diagnosi di epatocarcinoma(149). Vi è poi *Golgi Protein 73* (GP73), una molecola espressa in modo crescente dallo stadio di malattia epatica cronica a quello di epatocarcinoma(150). Nella diagnosi di epatocarcinoma GP73 ha mostrato una sensibilità del 77% e una specificità del 91% ed anche in questo caso l'associazione con α FP ha dimostrato una miglior capacità diagnostica rispetto ai singoli marcatori(151). Oltre ai tre citati, altri marcatori studiati sono glicoproteina-3, osteopontina, Dickkopf-1 (DKK-1), alcuni acidi nucleici (miRNA, lcnRNA, ctDNA)(152). Nonostante i numerosi studi disponibili per ciascuno di questi marcatori, nessuno è ancora stato accettato come marcatore da utilizzare nello

screening per epatocarcinoma(135). Nell'ambito degli score invece, il GALAD score ha mostrato grandi potenzialità, ma senza riuscire poi ad entrare nel programma di screening per epatocarcinoma. Esso tiene conto di cinque variabili: genere, età, α FP-L3, α FP, Des- γ carbossiprotrombina(153). GALAD score ha mostrato eccellenti capacità di diagnosi di epatocarcinoma nelle fasi precoci in soggetti affetti da cirrosi epatica di origine virale e non virale(154). Il suo utilizzo era stato proposto sia da solo, che in combinazione con l'ecografia addominale, poiché quest'ultima migliorava ulteriormente le sue caratteristiche come test di screening. GALAD-US (GALAD score associato ad ecografia) ha mostrato una sensibilità del 95% e una specificità del 91%(155). Tuttavia, uno studio prospettico di fase III ha dimostrato che il GALAD score portava un notevole miglioramento della sensibilità per il rilevamento dell'HCC, a costo di un aumento dei falsi positivi(156). Ciò comporterebbe, nella pratica clinica, un aumento dei costi per gli accertamenti che seguono la positività al GALAD score e una maggior ansia per il paziente(157). Si è provato a correggere i falsi positivi, portandoli al 10%, ma si è perso il vantaggio che il GALAD score dimostrava nei confronti dell'attuale screening(157). Inoltre α FP-L3 non è disponibile in tutti i laboratori, in particolare in quei paesi dove c'è la maggior prevalenza di epatite virale, per l'alto costo(157). Per questi motivi non si è riusciti ad inserire il GALAD score nell'attuale programma di screening.

1.2.6 Stadiazione e terapia

La stadiazione viene fatta principalmente seguendo la *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) riportata in Figura 3(77,158). Questa si basa sul numero e sulla dimensione delle lesioni, sulla classificazione Child-Pugh e sulla scala ECOG. Essa divide i pazienti in cinque stadi e permette di scegliere l'intervento terapeutico più adatto per ciascun paziente. Sostanzialmente i pazienti stadiati come BCLC-0 e BCLC-A vengono trattati con l'intento di guarire il paziente. Dal BCLC-B in poi la terapia è invece palliativa. In ultima analisi dunque la prognosi dipende dallo stadio in cui si pone la diagnosi. Per ulteriori informazioni sulla stadiazione e sulla terapia si rimanda ad articoli dedicati, in quanto l'obiettivo della tesi è primariamente la prognosi dei pazienti cirrotici e la prevenzione dell'epatocarcinoma.

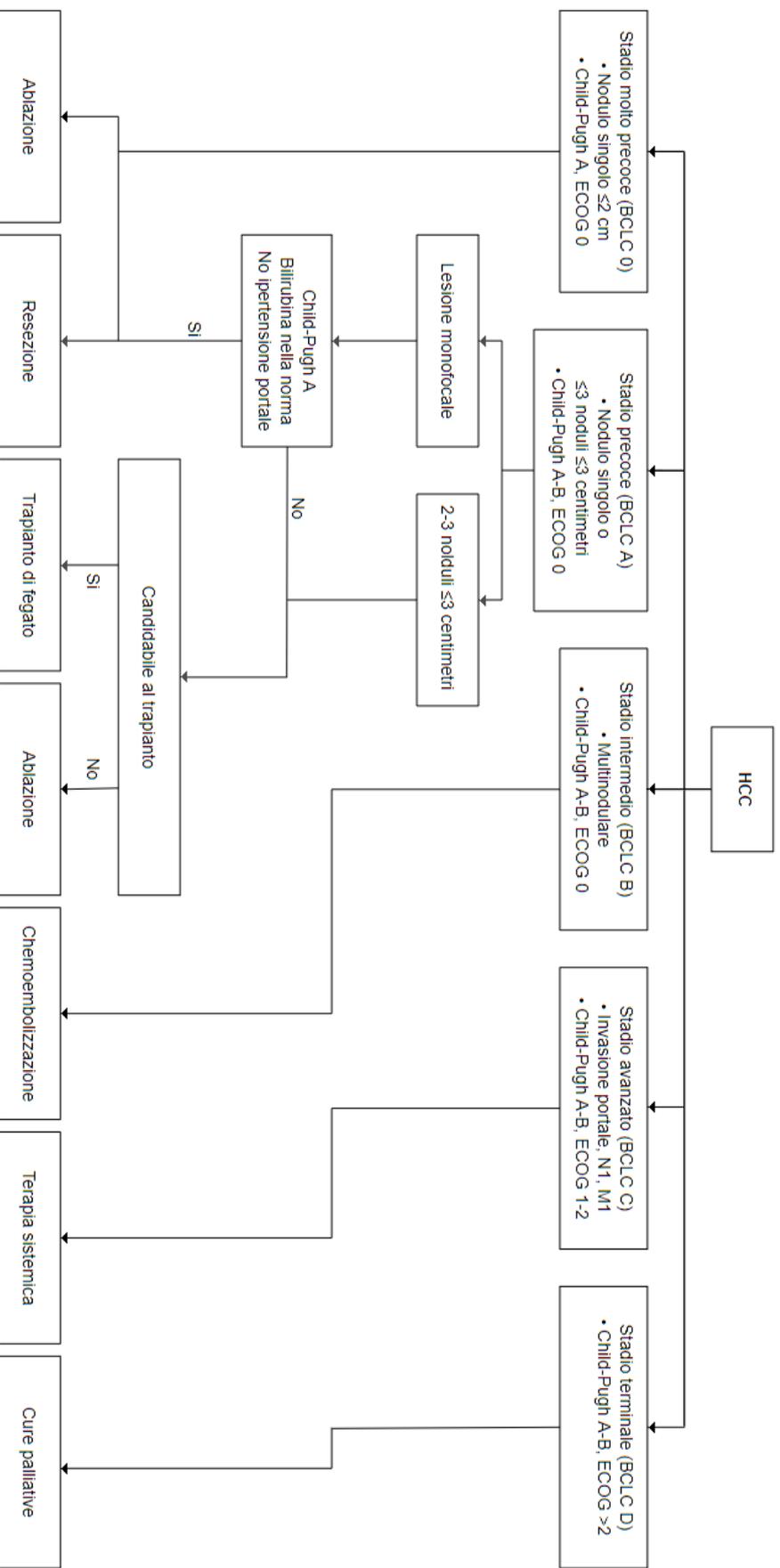


Figura 3. Stadiazione secondo *Barcelona Classification of Liver Cancer* (BCLC). Il sistema di stadiazione del cancro al fegato della clinica di Barcellona (BCLC) prevede la suddivisione in cinque stadi a seconda dell'estensione della malattia, della funzionalità epatica e del performance status. Pazienti asintomatici con basso carico tumorale e buona funzionalità epatica (BCLC 0/A) devono essere trattati con trattamenti locali ed intento curativo (resezione, ablazione o trapianto, a seconda della presenza di ipertensione portale, numero di noduli e funzionalità epatica). I pazienti asintomatici con malattia multifocale e funzionalità epatica adeguata (BCLC B) devono ricevere la chemoembolizzazione, mentre i pazienti con trombosì portale o diffusione extraepatica (BCLC C) devono essere trattati con terapie sistemiche. Pazienti con malattia epatica allo stadio terminale Child-Pugh classe C dovrebbero essere prima considerati per il fegato trapianto, poi in caso inviati alle terapie palliative. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; HCC: carcinoma epatocellulare; M1: presenza di metastasi a distanza; N1: metastasi linfonodali.

1.3 SerpinB3

SerpinB3 (SCCA-1) è un inibitore delle serin-proteasi, codificato nel locus 18q21.3(159,160). È un membro delle ovalbumin-serin protease inhibitor (ov-serpin), un sottogruppo di serpine maggiormente attivo a livello intracellulare e solo raramente secreto nell'ambiente extracellulare(159,161,162). Tale molecola fu scoperta nel 1977 da H. Kato e T. Torigoe, estratta da cellule del carcinoma della cervice uterina insieme alla sua isoforma SerpinB4 (SCCA-2)(163). Con il nome SCCA, ormai obsoleto, si fa riferimento all'insieme delle due isoforme.

1.3.1 Caratteristiche e funzioni fisiologiche di SerpinB3/B4

Come già accennato, SerpinB3, così come SerpinB4, è un inibitore di proteasi. Le due glico-proteine sono composte da 390 aminoacidi, con una omologia di sequenza del 98% e il 92% degli aminoacidi in comune(164). Il sito catalitico mostra invece minor grado di omologia, con soli 7 aminoacidi su 13 uguali. Tale differenza rende conto dei diversi bersagli che hanno SerpinB3 e SerpinB4. La prima infatti è nota per andare ad inibire le cistein-proteasi papain-like, mentre la seconda inibisce serin-proteasi chimotripsina-like(165). Sebbene la loro attività sia svolta prevalentemente nell'ambiente citosolico, la loro presenza è stata evidenziata anche a livello di lisosomi, mitocondri e nucleo(164). Quest'ultima localizzazione si pensa possa dipendere dallo *status* della cellula, in particolare quando questa si trova a dover rispondere a stimoli, quali ad esempio l'irradiazione con raggi UV. Altre situazioni in cui aumenta la localizzazione nucleare di SerpinB3/B4 è in condizioni di stress, come nelle cellule di svariate neoplasie, delle placche psoriasiche e della fibrosi polmonare idiopatica(164). Fisiologicamente, le serpine oggetto di discussione vengono espresse nell'epitelio squamoso, soprattutto nello strato basale e parabasale(166). Ad oggi poco si sa sulle funzioni di SerpinB3/B4 in termini di sviluppo e omeostasi cellulare, tuttavia il loro ruolo nella genesi tumorale è oggetto di intenso studio(164).

1.3.2 Ruolo di SerpinB3 nella patogenesi dell'epatocarcinoma

Nell'ambito della carcinogenesi dell'epatocarcinoma, SerpinB3 sta rivestendo un ruolo di interesse crescente negli ultimi anni(167). Questa molecola non è espressa nelle cellule di fegato sano, ma la sua espressione aumenta progressivamente in corso di danno epatico cronico, nei noduli displastici e nell'epatocarcinoma

(168,169). L'ambiente pro-infiammatorio e di stress ossidativo che si viene a creare nel fegato in corso di danno cronico concorre ad indurre un aumento di espressione di questa proteina(160). In particolare, i fattori che ne aumentano la trascrizione/traduzione sono:

- stimoli pro-apoptotici: mediati da citochine, soprattutto da TNF α : in questo senso l'espressione avrebbe significato primariamente anti-apoptotico (170,171);
- attivazione di fattori di trascrizione particolari: recentemente si è osservato che HIF-2 α , indotto dallo stato di ipossia tipico della cirrosi epatica e dei tumori, è in grado di legare il promotore del gene della SerpinB3(172);
- la presenza di stress ossidativo: è stato osservato che un ambiente dal forte stress ossido-riduttivo, come può essere l'accumulo di ferro, aumenta l'espressione di SerpinB3(173).

Una volta che questa serpina inizia ad essere espressa dalle cellule, la carcinogenesi è favorita dalle attività biologiche che sono state ascritte a questa molecola. Vi sono evidenze che dimostrano che SerpinB3 impatta su:

- Resistenza all'apoptosi: è stato dimostrato che SerpinB3 conferisce resistenza all'apoptosi farmaco-mediata per inibizione della catepsina lisosomiale e conseguente inibizione del rilascio del citocromo C mitocondriale(170). SerpinB3 inoltre conferisce resistenza all'apoptosi citochino-mediata (in particolare TNF α mediata) e cellulo-mediata(170,171). Recentemente è stato descritto che SerpinB3 favorisce la resistenza all'apoptosi attraverso il suo legame con il *Respiratory Complex I*, situato nella membrana mitocondriale interna. Questo legame riduce la produzione di ROS, con conseguente riduzione dell'apertura del *Permeability Transition Pore* mitocondriale e protezione dall'apoptosi. I farmaci chemioterapici che maggiormente risentono di questo effetto sono quelli che agiscono attraverso l'induzione dello stress ossido-riduttivo, come cisplatino e doxorubicina(174). Infine SerpinB3 è in grado di proteggere la cellula dall'esposizione alle radiazioni, mediante l'inibizione di JNK e p38 MAPK(175,176).
- Induzione di transizione epitelio-mesenchimale (EMT – *Epithelial to Mesenchymal Transition*): è stato osservato che SerpinB3 è in grado di modificare l'interazione tra le cellule, riducendone l'adesione e ampliando gli spazi intercellulari. A livello ultra-strutturale si è osservata una riduzione dei

desmosomi. Queste alterazioni sono state inoltre associate a riduzione dell'espressione di E-Caderina e aumento dell'espressione di Vimentina, c-Myc e β -Catenina, che determinano inoltre aumento della proliferazione cellulare(177).

- Proliferazione cellulare: i fegati di topi transgenici per SerpinB3 hanno dimostrato maggiori capacità rigenerative rispetto ai fegati di topi wild-type, in particolare associati a livelli più elevati di IL-6(178). Inoltre è stato dimostrato che SerpinB3 è in grado di agire su c-Myc a due livelli. Il primo legato alla sua attività di serpina: essa infatti inibisce la Calpaina, proteasi responsabile del clivaggio, e quindi inibizione, di c-Myc, permettendo a quest'ultimo di traslocare nel nucleo e agire come oncogeno. Il secondo prevede l'interazione positiva con la pathway di Yap, culminante nell'aumentata trascrizione di c-Myc(177,179). Infine è stato descritto che SerpinB3 (e la sua isoforma SerpinB4) è un fattore responsivo a Ras, elemento che amplia il coinvolgimento di questa serpina nella genesi tumorale(180).
- Controllo sul sistema immunitario: SerpinB3 è in grado sia di modulare la produzione di citochine pro-infiammatorie nelle cellule tumorali, che di ridurre la sorveglianza immunologica(181,182). Uno dei mediatori maggiormente coinvolti è TGF β : questo è un potente soppressore della risposta immunitaria, poiché in grado di reclutare T_{reg} (linfociti T regolatori)(183–185). È stato infatti documentato, in un modello animale, che SerpinB3 aumenta la quota di T_{reg}(186). Un altro meccanismo con cui SerpinB3 aiuta il tumore ad evadere la risposta immunitaria è la sua capacità di inibire l'infiltrazione intra-neoplastica da parte delle cellule *Natural Killer*(187). Tale capacità è stata confermata anche su cellule di adenocarcinoma esofageo(188).
- Induzione del fenotipo staminale: è stato dimostrato che SerpinB3 è in grado di determinare una variazione nel fenotipo cellulare verso un fenotipo simil-staminale nei tumori primitivi del fegato, sia nell'epatocarcinoma, che nel colangiocarcinoma(189,190).
- Funzioni metaboliche: è noto che SerpinB3 è correlata allo stato di NASH, che, come è già stato detto, è una condizione ad elevato rischio di evoluzione ad epatocarcinoma(191). Recentemente inoltre si è scoperto che SerpinB3 è in grado di indurre cambiamenti nel metabolismo mediante l'induzione di HIF-1 α anche in condizioni normossiche(192). Questo fattore di trascrizione è noto per

avere un'importante influenza nel metabolismo delle cellule neoplastiche, poiché la sua espressione induce cambiamenti volti a limitare il consumo di ossigeno(193). I principali cambiamenti metabolici osservati sono: l'aumento della glicolisi anaerobia e della produzione di lattati (con conseguente acidificazione dell'ambiente cellulare) e la riduzione della β -ossidazione degli acidi grassi(193). Inoltre, SerpinB3 determina anche un incremento di DPPIV/CD26 (*Dipeptidyl Peptidase-IV*), con conseguente accumulo di lipidi endocellulari e riduzione delle riserve di glicogeno(194). Tali alterazioni si sono osservate sia su linee cellulari iperesprimenti questa serpina che su fegati di topo transgenico per SerpinB3. Un possibile ulteriore meccanismo che porta al ridotto consumo di ossigeno in presenza di questa serpina è il suo legame con il Respiratory Complex I della catena respiratoria che ne riduce la funzione, oltre ad aumentare la resistenza all'apoptosi(195).

1.3.3 Ruolo di SerpinB3/B4 nella pratica clinica

Il primo studio che ha valutato l'espressione di SCCA nelle cellule di epatocarcinoma risale al 2004. In questo studio è stata valutata l'espressione del marcatore in 65 campioni di epatocarcinoma di qualsiasi eziologia e 20 campioni di tessuto epatico sano. Lo 85% dei campioni di epatocarcinoma risultò positivo alla ricerca di SerpinB3(169). Questo studio inoltre dimostrò la presenza di una variante polimorfica di SerpinB3, che venne definita SCCA-PD. Tale variante si caratterizza per la mutazione Gly351Ala(169). Si è poi dimostrato che l'espressione di SerpinB3/B4 non è esclusiva delle cellule di epatocarcinoma, ma la sua espressione aumenta in corso di danno epatico (epatite cronica, cirrosi epatica), mentre non è rilevabile nel tessuto epatico normale(196–198). Nell'epatocarcinoma inoltre l'espressione tumorale dell'antigene è inversamente proporzionale alla grandezza della lesione: neoplasie di piccole dimensioni esprimono maggiormente SerpinB3/B4(199). Vista l'espressione di SerpinB3/B4 soprattutto nelle piccole lesioni, si è andati a valutare se vi era una correlazione tra epatocarcinoma e concentrazioni sieriche di SerpinB3/B4. Tuttavia non si è riusciti a dimostrare una correlazione con le dimensioni della lesione tumorale, con la presenza di metastasi o con prognosi dei pazienti(197). Le sue caratteristiche come test di screening sono risultate dunque modeste(200). Diverse sono invece le considerazioni che si possono fare sull'immunocomplesso che si forma in circolo tra SerpinB3 e le

immunoglobuline di classe M (SCCA-IgM). I complessi tra SCCA e IgM si formano poiché, durante l'immunoediting, si assiste alla produzione di IgM come una delle componenti dell'immunità innata che si legano alla proteina SCCA, con la finalità di favorirne la sua clearance da parte dei sistemi di sorveglianza immunologica(201,202). Si è dimostrato che SCCA-IgM aumenta nei pazienti cirrotici che svilupperanno epatocarcinoma, mentre tende a restare stabile nei pazienti con cirrosi che non svilupperanno patologia neoplastica(203–205). In particolare uno studio retrospettivo ha dimostrato che SCCA-IgM risulta quattro volte maggiore nei soggetti che avranno un'evoluzione della loro malattia. Inoltre, il cut-off a 200 AU/mL di SCCA-IgM si è dimostrato efficace nell'identificare i pazienti a basso rischio di evoluzione negli anni seguenti, con un valore predittivo negativo del 97%(204,206). La ricerca di SCCA-IgM, unitamente alla ricerca di α FP, si è dimostrata in grado di aumentare la sensibilità nella diagnosi di epatocarcinoma, soprattutto quando i valori di α FP erano moderatamente elevati (20-200 ng/mL)(207). SCCA-IgM non ha valore unicamente prima della diagnosi di epatocarcinoma, ma anche durante la malattia neoplastica, poiché pazienti con valori bassi di SCCA-IgM hanno una sopravvivenza raddoppiata rispetto a coloro che hanno valori elevati di questo marcatore. Inoltre i valori di SCCA-IgM possono essere utilizzati anche per predire la risposta al trattamento: nei pazienti che hanno risposto alla terapia ablativa, i valori SCCA-IgM si riducono progressivamente fino a negativizzarsi, mentre in caso di risposte parziali o assenti i valori tendono a decrescere solo parzialmente, a rimanere stabili o addirittura a crescere(208,209). La resezione chirurgica epatica si è confermata come l'approccio terapeutico più efficace ed è in grado anche di ridurre i livelli circolanti di SCCA-IgM, probabilmente per effettiva rimozione della sorgente dell'antigene(210). Recentemente, SCCA-IgM ha dimostrato di essere maggiormente espresso nelle forme di epatite cronica HCV correlate(191). In questi casi è stata osservata una correlazione tra i livelli di SerpinB3 a livello epatico e i livelli di SCCA-IgM a livello circolante(191). In corso di terapia inoltre, i livelli di SCCA-IgM correlano con la risposta alla terapia antivirale, con una progressiva discesa sino alla scomparsa in caso di risposta virologica sostenuta. Si è poi notato che SCCA-IgM correla anche con la presenza di NASH (*Non Alcoholic Steato-Hepatitis*). In considerazione del fatto che la condizione di NASH insorge frequentemente nei soggetti affetti da HCV e che questa rappresenta un rischio aggiunto per

l'evoluzione a cirrosi epatica ed epatocarcinoma, si è proposto l'utilizzo di SCCA-IgM nei pazienti affetti da epatite cronica HCV positiva, per identificare quelli a maggior rischio di evoluzione(191,211).

Capitolo 2 - Scopo dello studio

Con il nostro lavoro ci siamo proposti di creare un modello matematico-statistico che, mediante l'integrazione di informazioni cliniche e di laboratorio, permetta di prevedere lo sviluppo di epatocarcinoma nei soggetti affetti da cirrosi epatica. Ci siamo poi posti come obiettivo una sua validazione esterna.

Capitolo 3 – Materiali e Metodi

3.1 Disegno dello studio

Lo studio in questione configura come uno studio retrospettivo. La raccolta dei dati è avvenuta attraverso la lettura delle lettere dei pazienti contenute nelle cartelle di back-up degli ambulatori per le malattie di fegato dell’Ospedale Universitario di Padova. I dati mancanti sono poi stati integrati mediante consultazione del sistema GALILEO. I pazienti sono poi stati suddivisi in quattro gruppi: pazienti affetti da cirrosi epatica; pazienti affetti da epatocarcinoma; pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva (ossia che nel corso del follow-up hanno sviluppato epatocarcinoma); pazienti con cirrosi epatica non evolutiva (ossia che non hanno sviluppato epatocarcinoma nel corso del follow-up).

3.2 Pazienti

La popolazione studiata si compone di 148 pazienti affetti da cirrosi epatica e 69 pazienti affetti da epatocarcinoma insorto su cirrosi epatica, suddivisi secondo quanto mostrato nella Tabella XI. Sempre in Tabella XI i principali dati epidemiologici del campione. Tutti i pazienti, al momento dello studio, afferivano al Centro Regionale di Riferimento per le malattie del fegato presso l’Ospedale Universitario di Padova. I dati sono stati raccolti in un periodo compreso tra maggio 2007 e maggio 2022. I criteri di esclusione sono stati: l’essere affetti da neoplasie

| Descrizione del campione – dati epidemiologici | | | | |
|---|------------------------------------|---|--|--|
| Sottogruppo | Pazienti affetti da cirrosi (n=92) | Pazienti affetti da epatocarcinoma (n=69) | Pazienti affetti da cirrosi evolutiva (n=28) | Pazienti affetti da cirrosi non evolutiva (n=28) |
| Età | | | | |
| Mediana (IQR) | 59 (51 - 66) | 65 (60 - 73) | 53 (46 - 61) | 58 (52 - 63) |
| Sesso (M:F) | 2:1 | 4:1 | 4:1 | 2:1 |
| Eziologia della cirrosi epatica – Valore assoluto (%) | | | | |
| Alcol | 33 (35,9) | 20 (29,0) | 8 (28,6) | 9 (32,1) |
| HBV | 28 (30,4) | 28 (40,6) | 15 (53,6) | 10 (35,7) |
| HCV | 23 (25,0) | 8 (11,6) | 5 (17,9) | 6 (21,4) |
| Altro | 8 (8,7) | 13 (18,8) | 0 (0,0) | 3 (10,7) |

Tabella XI. Suddivisione del campione nei quattro gruppi e principali dati epidemiologici.

epatiche diverse dall'epatocarcinoma e l'indisponibilità di informazioni cliniche complete, test di laboratorio e dati di imaging necessari per confermare la diagnosi di cirrosi epatica e il suo stadio alla presentazione. Dei pazienti considerati, 28 hanno sviluppato epatocarcinoma nel corso dello studio, mentre 69 avevano già ricevuto diagnosi di epatocarcinoma. La diagnosi di epatocarcinoma era basata sulla presenza di lesioni focali visualizzate all'ecografia epatica e confermate alla TC e/o RM. La diagnosi finale è stata confermata, quando indicato, da esame istopatologico su prelievo bioptico di campione epatico adeguato. Questi pazienti sono stati trattati secondo la stadiazione BCLC e candidati al trapianto quando possibile(158). I pazienti affetti da cirrosi epatica che hanno sviluppato complicanze sono stati valutati per trapianto di fegato ed eventualmente trapiantati. Per ogni paziente, dopo l'ottenimento del consenso informato, è stato eseguito un prelievo ematico a digiuno per la determinazione dei principali dosaggi di laboratorio. Per ogni paziente un campione di siero, ottenuto mediante centrifugazione del prelievo venoso a 1500 giri/minuto per 15 minuti, è stato conservato a -80°C presso il Laboratorio di Epatologia Molecolare della Clinica Medica 5, fino al momento della determinazione del biomarcatore SCCA-IgM.

3.3 Follow-up

I pazienti arruolati sono stati sottoposti a controlli con frequenza semestrale secondo le linee guida EASL presso gli ambulatori dedicati alle malattie epatiche dell'Ospedale Universitario di Padova(135). Ad ogni controllo i pazienti sono stati oggetto di una rivalutazione clinica, biochimica ed ecografica. La durata del follow-up dipendeva dal sottogruppo a cui sono stati assegnati i pazienti. I pazienti dei gruppi "affetti da cirrosi evolutiva" e "affetti da cirrosi non evolutiva" sono stati seguiti finché non hanno sviluppato un evento tra i seguenti: epatocarcinoma, trapianto di fegato od exitus. Gli altri pazienti sono invece stati seguiti per un massimo di cinque anni oppure sino al momento in cui sono andati incontro ad evento, ossia trapianto di fegato oppure exitus. In entrambi i casi, l'abbandono dei controlli ambulatoriali determinava sospensione dallo studio. Durante questo periodo sono state raccolte informazioni cliniche, test di laboratorio, dati di imaging e caratteristiche citopatologiche o istopatologiche (se disponibili). Nel frattempo, tutti i pazienti sono stati trattati in relazione alla specifica patologia, ricevendo cure

mediche per l'eziologia della cirrosi epatica, per gli episodi di scompenso e per epatocarcinoma secondo linee guida del tempo.

3.4 Variabili

Per ciascun paziente sono state considerate variabili di carattere:

- anamnestico: età, sesso; etnia; tabagismo; consumo di bevande alcoliche; BMI (*Body Mass Index*); patologie concomitanti quali:
 - diabete Mellito di tipo 2: glicemia a digiuno >125 mg/dL oppure glicemia dopo test da carico orale di glucosio (OGTT) >200 mg/dL oppure paziente in terapia con farmaci ipoglicemizzanti/insulina.
 - ipertensione arteriosa essenziale: pressione arteriosa >140/90 mmHg oppure paziente in terapia con farmaci anti-ipertensivi.
 - sindrome metabolica: presenza di almeno tre delle seguenti condizioni: glicemia a digiuno >125 mg/dL (o terapia ipoglicemizzante/insulina in

| Variabile | Unità di misura | Intervallo di Normalità |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Età* | anni | - |
| Altezza* | m | - |
| Peso | Kg | - |
| Body Mass Index (BMI) | Kg/m ² | 18 - 25 |
| αFP | μg/L | 0 - 7 |
| γGT | U/L | 3 - 65 |
| AST | U/L | 10 - 45 |
| ALT | U/L | 10 - 50 |
| Bilirubina | mg/dL | 0,10 - 1,00 |
| PT (%) | % | 0,75 - 1,12 |
| INR | - | 0,80 - 1,20 |
| Albumina* | g/L | 35 - 52 |
| PLT* | Elementi x10 ³ /μL | 150 - 450 |
| Creatinina | mg/dL | 0,67 - 1,18 |
| Ferritina | ng/mL | 31 - 409 |
| SCCA-IgM | AU/mL | <200 |
| MELD | - | - |

Tabella XII. Variabili continue con relative unità di misura; *: variabili normali. αFP: α-fetoproteina; γGT: γ-glutamyl-transpeptidasi; AST: aspartato-transaminasi; ALT: alanina-transaminasi; PT (%): *PT Activity*; INR: *International Normalized Ratio*; SCCA-IgM: *Squamous Cell Carcinoma Antigen* complessato a immunoglobulina di tipo IgM; MELD: *Model for End-stage Liver Disease*.

corso); pressione arteriosa >130/85 mmHg (o terapia anti-ipertensiva in corso); colesterolo HDL <40 mg/dL (negli uomini) e <50 mg/dL (nelle donne); trigliceridi >150 mg/dL; circonferenza addominale >102 cm (negli uomini) e >88 cm (nelle donne).

- precedenti episodi di scompenso acuto: ascite; peritonite batterica spontanea; sanguinamento da varici esofagee; encefalopatia epatica;
- laboratoristico: esami del sangue atti a studiare le condizioni generali del paziente, la funzionalità epatica e renale, il profilo della coagulazione, marcatori tumorali per neoplasie del fegato (alfafetoproteina e SCCA-IgM). In tabella XII l'elenco delle variabili quantitative e relativi cut-off;
- epatologico: eziologia della cirrosi epatica; numero e dimensioni dell'epatocarcinoma; score prognostici (Child-Pugh e MELD score);
- relative al follow-up: data dell'ultima ecografia eseguita e sviluppo di eventi (comparsa di epatocarcinoma; trapianto di fegato; exitus).

La quantificazione sierica dell'immunocomplesso SCCA-IgM è stata eseguita con metodo ELISA indiretto utilizzando il Kit Hepa-IC, standardizzato da Xeptagen S.p.A. (Venezia, Italia). Brevemente, 100 µL di anticorpo oligoclonale anti-SerpinB3 umana (10 µg/mL) sono stati fissati in ciascun pozzetto di una piastra da microtitolazione e incubati a 4°C per una notte. Dopo 3 lavaggi con una soluzione detergente di PBS-Tween20 0,05%, sono stati aggiunti 200 µL di albumina sierica bovina (BSA) all'1% e incubati per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo ulteriori 6 lavaggi, 100 µL di siero da testare, diluito 1:8 in una soluzione PBS-Tween20 0,05%-BSA 1% sono stati incubati per 1 ora. La reazione è stata rivelata con l'aggiunta di una soluzione di anticorpo secondario anti-IgM umane coniugato con perossidasi e sviluppata con TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidine) e streptavidina-HRP. La reazione colorimetrica è stata bloccata con l'aggiunta di 100 µL di H₂SO₄ 0.3 M e la densità ottica a 405 nm è stata misurata con un lettore multimediale di piastre Victor X3 (Perkin Elmer). Ogni campione è stato testato in doppio e la concentrazione di immunocomplessi espressa in unità arbitrarie (AU) calcolate utilizzando una curva di calibrazione a 6 punti inserita in ogni seduta e ottenuta con diluizioni scalari (da 200 AU/mL a 6.25 AU/mL) di una preparazione standard di SCCA-IgM inclusa nel Kit. Il valore di cut-off per definire la positività al dosaggio di SCCA-IgM calcolato, come 95° percentile, su un gruppo di controllo costituito da 100 soggetti sani è di 200 AU/ml. Campioni con valori >200 AU/ml (limite

superiore della curva di calibrazione) sono stati diluiti ulteriormente (es. 1:16 1:32) e ritestati.

3.5 Analisi statistica

Per l'analisi statistica descrittiva è stato fatto uso dei programmi GraphPad Prism 9[®] e R[®]. Indipendentemente dalla normalità (valutata mediante test di Shapiro-Wilk), le variabili continue sono state descritte con l'utilizzo di mediana e intervallo inter-quantile e studiate mediante test U di Mann-Whitney. Le variabili qualitative sono state espresse mediante frequenza e percentuale e sono state confrontate mediante test del Chi quadro oppure mediante test esatto di Fisher. Per analizzare il tempo di sopravvivenza libero da epatocarcinoma dal momento dell'arruolamento, abbiamo considerato la "presenza di epatocarcinoma" come un evento. Per analizzare il tempo di sopravvivenza globale dal momento dell'arruolamento, abbiamo considerato la "morte" e il "trapianto di fegato" come eventi. È stato operato un confronto tra i gruppi di pazienti affetti da cirrosi epatica e quelli affetti da epatocarcinoma; un secondo confronto è stato fatto tra i pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva e cirrosi epatica non evolutiva. Se il *p-value* è risultato <0,05, le differenze trovate sono state considerate significative. Successivamente, mediante algoritmi di *machine learning*, si sono creati dei classificatori mediante analisi Random Forest, classificazione Random Forest e approccio Ensemble. I due set di dati utilizzati per addestrare questi classificatori sono stati ottenuti unendo i gruppi dei pazienti affetti da cirrosi epatica con quelli affetti da epatocarcinoma e unendo i gruppi di pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva con quelli affetti da cirrosi epatica non evolutiva. Il modello addestrato con i pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva e non evolutiva ed ottenuto mediante approccio *Ensemble* è stato oggetto di validazione interna mediante *v-fold cross validation* (*v*: 20) e di validazione esterna sul campione di soggetti affetti da sola cirrosi epatica. Di ciascun modello è stata descritta la matrice di confusione ottenuta dall'analisi del campione utilizzato per addestrare il modello stesso. Le misure statistiche associate alle matrici di confusione dei modelli Random Forest sono state: accuratezza; kappa di Cohen; sensibilità; specificità; valore predittivo positivo; valore predittivo negativo; precisione (*precision*); richiamo (*recall*); F1 score; prevalenza; detection rate; prevalenza rilevata; accuratezza bilanciata; Brier score; AUC (*Area Under the ROC Curve*); PR-AUC (*Precision-Recall Area Under*

the ROC Curve). Le misure statistiche associate ai modelli Random Ferns sono: accuratezza; NIR (*No Information Rate*); kappa di Cohen; sensibilità; specificità; valore predittivo positivo; valore predittivo negativo; precisione (*precision*); richiamo (*recall*); F1 score; prevalenza; detection rate; prevalenza rilevata; accuratezza bilanciata. Le misure associate al modello ottenuto mediante *Ensemble Approach* sono state: accuratezza; NIR (*No Information Rate*); kappa di Cohen; sensibilità; specificità; valore predittivo positivo; valore predittivo negativo; precisione (*precision*); richiamo (*recall*); F1 score; prevalenza; detection rate; prevalenza rilevata; accuratezza bilanciata.

Capitolo 4 - Risultati

4.1 Statistica descrittiva e analisi univariata

4.1.1 Pazienti affetti da cirrosi epatica

Informazioni generali. Questo gruppo si compone di 92 pazienti affetti da cirrosi epatica. Di questi 28 sono di sesso femminile (30%) e 64 di sesso maschile (70%). L'età mediana del campione è di 59 anni. Un solo individuo è di etnia africana, mentre i

| Intervalli BMI (Body Mass Index) | |
|----------------------------------|-------------|
| Sottopeso | < 18,5 |
| Normopeso | 18,5 – 24,9 |
| Sovrappeso | 25 – 29,9 |
| Obeso | ≥ 30 |
| Tabella XIII. Intervalli di BMI | |

restanti 91 sono caucasici. Considerando il BMI: nessun individuo è sottopeso; 39 individui sono normopeso; 33 individui sono sovrappeso; 16 individui sono obesi di vario grado (Tabella XIII). Di quattro pazienti non è stato possibile calcolare il BMI per mancanza o di peso o di altezza (da considerare il limite della presenza di versamento ascitico che può aver alterato il peso corporeo e quindi il calcolo del BMI). Nel complesso il 53% dei pazienti ha un BMI superiore alla norma. Per quanto riguarda alle abitudini voluttuarie, la maggior parte dei soggetti reclutati non fuma (70 pazienti non fumano; 2 sono ex-fumatori) e la quasi totalità non assumeva alcolici al momento del reclutamento (86 pazienti su 92). Anamnesticamente il 30% dei soggetti è affetto da diabete; il 34% da ipertensione essenziale; il 20% da sindrome metabolica.

Variabili laboratoristiche. La tabella XIV riporta i valori mediani o medi delle variabili di laboratorio studiate. Bilirubina, piastrine, INR e PT (%) sono fuori dall'intervallo di normalità.

Informazioni sull'epatopatia. Per quanto riguarda l'eziologia: la principale causa di cirrosi è l'assunzione di alcol (43%), seguita dalle infezioni virali da HCV (29%) e HBV (27%) e l'eziologia metabolica (16%). Rari sono i casi di cirrosi di natura autoimmune o secondaria ad emocromatosi (Tabella XV). Le percentuali riportate fanno riferimento ai pazienti che riconoscono l'eziologia riportata tra le cause di cirrosi, che possono essere multiple. Infatti nel 22% dei pazienti è evidenziabile più

| Variabile | Pazienti con cirrosi epatica (n=92) | Intervallo di Normalità (M) |
|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| γGT (U/L) | 37 (29 - 89) | 3 - 65 |
| αFP (μg/L) | 4 (3 - 8) | 0 - 7 |
| AST (U/L) | 39 (27 - 63) | 10 - 45 |
| ALT (U/L) | 31 (26 - 53) | 10 - 50 |
| Ferritina (ng/mL) | 195 (58 - 285) | 31 - 409 |
| Bilirubina (mg/dL) | 1,15 (0,64 - 1,99) | 0,10 - 1,00 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,84 (0,73 - 0,91) | 0,67 - 1,18 |
| PT (%) | 0,63 (0,51 - 0,76) | 0,75 - 1,12 |
| INR | 1,24 (1,12 - 1,38) | 0,80 - 1,20 |
| Albumina (g/L) | 38 (33 - 42) | 35 - 52 |
| PLT (x10³/μL) | 114 (65 - 144) | 150 - 450 |
| SCCA-IgM (AU/mL) | 98 (64 - 234) | <200 |

Tabella XIV. Parametri di laboratorio valutati nel gruppo di pazienti affetti da cirrosi epatica. αFP: α-fetoproteina; γGT: γ-glutamyl-transpeptidasi; AST: aspartato-transaminasi; ALT: alanina-transaminasi; PT (%): *PT Activity*; INR: *International Normalized Ratio*; PLT: piastrine; SCCA-IgM: *Squamous Cell Cancer Antigen* complessato a immunoglobuline tipo IgM. La lettera (M) indica che tali intervalli fanno riferimento ad una popolazione adulta sana di sesso maschile.

| Eziologia | Frequenza assoluta (n=92) | Percentuale (%) |
|---------------------------------|---------------------------|-----------------|
| Alcol | 29 | 31,5 |
| Alcol, HBV | 1 | 1,1 |
| Alcol, HCV | 4 | 4,3 |
| Alcol, HCV, metabolica | 2 | 2,2 |
| Alcol, metabolica | 4 | 4,3 |
| Autoimmune | 2 | 2,2 |
| Emocromatosi, metabolica | 1 | 1,1 |
| HBV | 18 | 19,6 |
| HBV, HCV | 1 | 1,1 |
| HBV, HDV | 4 | 4,3 |
| HBV, metabolica | 1 | 1,1 |
| HCV | 18 | 19,6 |
| HCV, metabolica | 2 | 2,2 |
| Metabolica | 5 | 5,4 |

Tabella XV. Singole eziologie e varie combinazioni, con relativa frequenza assoluta e percentuale. Considerando invece la presenza di un agente eziologico, indipendentemente dal fatto di averne altri associati, avremo che: il 43% ha l'assunzione di alcol tra le cause di cirrosi; il 29% ha l'infezione da HCV; il 27% ha un'infezione da HBV; il 16% ha una componente metabolica.

di un'etiologia, in particolare l'associazione più frequente è tra etiologia alcolica ed etiologia virale (35% dei pazienti con cirrosi a genesi multifattoriale). Se si considera la classificazione Child-Pugh il 59% dei pazienti risulta essere in classe A, il 26% in classe B, mentre solo il 9% dei pazienti è in classe C. Di una piccola quota dei pazienti (6%) non è stato possibile calcolare lo score per mancanza di uno o più dati (presenza di ascite, presenza di encefalopatia, valori di albumina, valori di creatinina, valori di bilirubinemia). Se si considera il MELD score invece, il 78% ha un punteggio di MELD<15, il 16% ha un punteggio MELD≥15 e il 6% ha un MELD non calcolabile per mancanza di uno o più valori (creatinina, INR o bilirubina). Per quanto riguarda gli eventi di scompenso epatico acuto, i pazienti del campione sono stati valutati per storia di scompenso ascitico, di sanguinamento da varici esofagee, di peritonite batterica spontanea (PBS), di encefalopatia epatica (Tabella XVI). Su 92 pazienti, 43 sono andati incontro ad almeno un episodio di scompenso acuto prima di essere arruolati nello studio. L'ascite è stata la manifestazione più comune di scompenso acuto (37% dei pazienti).

| Ascite | Sanguinamento | PBS | Encefalopatia |
|-----------|---------------|---------|---------------|
| 34 (36,9) | 10 (10,8) | 1 (1,1) | 18 (19,6) |

Tabella XVI. Frequenza di ciascun evento di scompenso acuto nei pazienti affetti da cirrosi epatica. Frequenza assoluta (percentuale). PBS: Peritonite batterica spontanea.

Informazioni sul follow-up. I pazienti di questo gruppo sono stati seguiti nel tempo a livello ambulatoriale fino ad un massimo di 5 anni (60 mesi). In questo lasso di tempo 15 pazienti sono andati incontro ad exitus (16%), mentre 5 pazienti sono andati incontro a trapianto di fegato (5%). Dei rimanenti 72 pazienti, 36 pazienti sono giunti alla fine dei 5 anni liberi da eventi.

4.1.2 Pazienti affetti da epatocarcinoma

Informazioni generali. Questo sottogruppo si compone di 69 pazienti affetti da epatocarcinoma. L'età media del campione è di 66 anni e la maggior parte di questi sono individui di sesso maschile (F: 15%; M: 85%). Anche in questo gruppo si riconferma prevalente l'etnia caucasica (68 pazienti), mentre un solo paziente è di etnia asiatica. I dati relativi al BMI sono riportati in Tabella XVII e mostrano come il 74% dei soggetti siano o sovrappeso od obesi (anche in questo caso bisogna

considerare che la presenza di liquido ascitico può aver falsato parzialmente il peso e dunque il calcolo del BMI). Di 2 pazienti non è stato possibile calcolare il BMI per mancanza di dati. Anamnesticamente, dei 69 pazienti che compongono il campione, la maggior parte si dichiara non fumatrice (il 77% è astinente, mentre il 7% è ex-fumatore) e non assume alcolici (86%). Infine, per quanto riguarda le comorbilità, il 30% dei pazienti è diabetico, il 32% è iperteso e il 25% è in sindrome metabolica.

| Categoria | Range di BMI | Frequenza assoluta | Percentuale (%) |
|-------------------|--------------|--------------------|-----------------|
| Sottopeso | < 18,5 | 0 | 0 |
| Normopeso | 18,5 – 24,9 | 16 | 23,1 |
| Sovrappeso | 25 – 29,9 | 29 | 42,0 |
| Obeso | ≥ 30 | 22 | 31,9 |

Tabella XVII. Distribuzione del BMI nei pazienti del gruppo di pazienti affetti da epatocarcinoma

Variabili laboratoristiche. Nella tabella XVIII sono riportate le variabili di laboratorio analizzate in questo gruppo. Parametri che sono risultati al di fuori dell'intervallo di normalità sono γ -GT; bilirubina; PT (%) e INR.

| Variabile | Pazienti con epatocarcinoma (n=69) | Intervalli di normalità (M) |
|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| γ -GT (U/L) | 67 (29 - 128) | 3 - 65 |
| α FP (μ g/L) | 6 (3 - 22) | 0 - 7 |
| Bilirubina (mg/dL) | 1,39 (0,84 - 1,95) | 0,10 - 1,00 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,84 (0,73 - 0,97) | 0,67 - 1,18 |
| PT (%) | 0,64 (0,55 - 0,74) | 0,75 - 1,12 |
| INR | 1,2 (1,13 - 1,355) | 0,80 - 1,20 |
| SCCA-IgM (AU/mL) | 142,5 (66 - 336) | <200 |

Tabella XVIII. Parametri statistici per ciascuna variabile misurata nel gruppo di pazienti affetti da epatocarcinoma. Variabili continue non normali: mediana (range interquartile). α FP: α -fetoproteina; γ -GT: γ -glutamyl-transpeptidasi; PT (%): *PT Activity*; INR: *International Normalized Ratio*; SCCA-IgM: *Squamous Cell Cancer Antigen* complessato a immunoglobuline tipo IgM. La lettera (M) di fianco all'intervallo di normalità indica che tali intervalli fanno riferimento ad una popolazione adulta sana di sesso maschile.

Informazioni sull'epatopatia e sull'epatocarcinoma

Per quanto riguarda l'eziologia della cirrosi dei soggetti di questo gruppo, possiamo constatare che, indipendentemente dal fatto di avere più eziologie associate, il 38% ha l'assunzione di alcol tra le cause di cirrosi; il 39% ha l'infezione da HCV; il 16%

ha un'infezione da HBV; il 39% ha una componente metabolica. Nel complesso il 35% ha più di un agente eziologico. Le rimanenti informazioni sono riassunte nella Tabella XIX. Per quanto riguarda la classificazione dell'epatopatia sulla base di score prognostici, possiamo osservare che il 48% dei pazienti classificabili in classe A secondo Child-Pugh, il 39% in classe B e il 10% in classe C. Di due pazienti non è stata possibile la classificazione secondo Child-Pugh per mancanza di dati. Per quanto riguarda il MELD score, il 90% dei pazienti ha uno score inferiore ai 15 punti (dei restanti il 3% ha uno score uguale o superiore a 15 e il 7% non ha un punteggio, poiché mancano alcuni dati necessari al calcolo).

| Eziologia | Frequenza assoluta | Percentuale (%) |
|--------------------------------------|--------------------|-----------------|
| Alcol | 10 | 14,5 |
| Alcol, autoimmune, metabolica | 2 | 2,9 |
| Alcol, HBV | 1 | 1,4 |
| Alcol, HBV,HCV | 1 | 1,4 |
| Alcol, HCV | 2 | 2,9 |
| Alcol, HCV, metabolica | 2 | 2,9 |
| Alcol, metabolica | 8 | 11,6 |
| Autoimmune, metabolica | 2 | 2,9 |
| Budd-Chiari | 1 | 1,4 |
| Criptogenetica | 3 | 4,3 |
| HBV | 6 | 8,7 |
| HBV, HCV, metabolica | 1 | 1,4 |
| HBV, metabolica | 2 | 2,9 |
| HCV | 18 | 26,1 |
| HCV, metabolica | 3 | 4,3 |
| Metabolica | 7 | 10,1 |

Tabella XIX. Elenco delle cause eziologiche di cirrosi nei soggetti affetti da epatocarcinoma, con frequenza assoluta e relativa. Considerando invece la presenza di un agente eziologico, indipendentemente dal fatto di averne altri associati, avremo che: il 38% ha l'assunzione di alcol tra le cause di cirrosi; il 39% ha l'infezione da HCV; il 16% ha un'infezione da HBV; il 39% ha una componente metabolica.

Per quanto riguarda l'epatocarcinoma, nella Tabella XX sono evidenziati numero e dimensioni delle lesioni dei pazienti arruolati in questo gruppo (di 5 pazienti con lesione unifocale non è stato possibile recuperare le dimensioni della massa al momento dell'arruolamento).

| Numero di lesioni | Frequenza assoluta | Frequenza relativa | Dimensione media (mm) |
|--------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| Lesione unifocale | 35 | 0,51 | 26,1 |
| ≤3 lesioni | 10 | 0,14 | 24,6 |
| >3 lesioni | 24 | 0,35 | 32,7 |

Tabella XX. Sono riportate le frequenze assolute e relative del numero di lesioni presenti. Nella colonna all'estrema destra la dimensione media in millimetri delle lesioni di ciascun sottogruppo.

Informazioni sul follow-up

I pazienti affetti da epatocarcinoma sono stati monitorati nel tempo per un massimo di 5 anni (60 mesi). Si sono osservati 46 eventi, in particolare 14 pazienti sono andati incontro a trapianto di fegato (20%), mentre 32 pazienti sono andati incontro ad exitus (46%).

4.1.3 Confronto tra i pazienti affetti da cirrosi epatica e i pazienti affetti da epatocarcinoma

La Tabella XXI confronta le variabili del gruppo di pazienti affetti da cirrosi epatica e quelli affetti da epatocarcinoma. Si sono evidenziate differenze significative unicamente per (p-value: <0,0001), α FP (p-value: 0,0104), γ -GT (p-value: 0,0203) e per l'eziologia (p-value: 0,0363).

4.1.4 Pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva

Informazioni generali. Questo gruppo si compone di 28 pazienti, di cui il 79% di sesso maschile (22 pazienti) e il 21% di sesso femminile (6 pazienti). L'età media del campione è di 53 anni. Un solo paziente è di etnia asiatica, mentre i rimanenti sono di etnia caucasica. Il BMI si distribuisce secondo i valori riportati nella Tabella XXII (di un paziente non è stato possibile calcolare il BMI per mancanza di dati). Il 68% dei pazienti di questo gruppo è o sovrappeso od obeso. Per quanto riguarda le abitudini voluttuarie, 8 pazienti si dichiarano fumatori attivi (29%), mentre 3 pazienti confermano un potus attivo (11%). Anamnesticamente il 18% dei soggetti reclutati risultava affetto da diabete mellito tipo 2 (5 pazienti), il 46% da ipertensione arteriosa (13 pazienti) e il 14% da sindrome metabolica (4 pazienti).

| VARIABILE | PAZIENTI CON | PAZIENTI CON | p-value |
|-------------------------------|--------------------|------------------------|---------|
| | CIRROSI n=92 | EPATOCARCINOMA n=69 | |
| Sesso (M) | 64 (69,6) | 55 (79,7) | 0,1469 |
| IPA | 31 (33,7) | 22 (31,9) | 0,8087 |
| Diabete | 28 (30,4) | 21 (30,4) | 1,0000 |
| Sdr. Metabolica | 18 (19,6) | 17 (25,0) | 0,4110 |
| Fumo | 20 (21,7) | 11 (15,9) | 0,3559 |
| Alcol | 6 (6,5) | 10 (14,5) | 0,0943 |
| Eziologia | | | |
| - Alcol | 33 (35,9) | 20 (29,0) | 0,0363 |
| - HCV | 28 (30,4) | 28 (40,6) | |
| - HBV | 23 (25,0) | 8 (11,6) | |
| - Altro | 8 (8,7) | 13 (18,8) | |
| Età (anni) | 59 (51 - 66) | 65 (60 - 73) | <0,0001 |
| BMI (kg/m²) | 25 (24 - 28) | 27 (25 - 31) | 0,0821 |
| αFP (μg/L) | 4 (3 - 8) | 6 (3 - 22) | 0,0104 |
| γ-GT (IU/L) | 37 (29 - 89) | 67 (29 - 128) | 0,0203 |
| Bilirubina (mg/dL) | 1,15 (0,64 - 1,99) | 1,39 (0,84 - 1,95) | 0,3141 |
| INR | 1,24 (1,12 - 1,38) | 1,20 (1,13 - 1,36) | 0,6407 |
| S-Cr (mg/dL) | 0,84 (0,73 - 0,91) | 0,84 (0,73 - 0,97) | 0,2552 |
| SCCA-IgM (AU/mL) | 98 (64 - 234) | 143 (66 - 336) | 0,0914 |
| MELD | 10 (8 - 13) | 11 (9 - 13) | 0,2423 |
| Child-Pugh | | | |
| - A | 54 (58,7) | 33 (47,8) | 0,2233 |
| - B | 24 (26,1) | 27 (39,1) | |
| - C | 8 (8,7) | 7 (10,1) | |

Tabella XXI. Confronto tra le variabili dei pazienti affetti da cirrosi epatica e pazienti affetti da epatocarcinoma. Variabili continue mediana (range interquartile); variabili qualitative: valore assoluto (percentuale). BMI: *Body Mass Index* αFP: α-fetoproteina; γ-GT: γ-Glutamil-Transpeptidasi; INR: *International Normalized Ratio*; S-Cr: Creatinina sierica; SCCA-IgM: *Squamous Cell Cancer Antigen* complessato a immunoglobuline tipo IgM; MELD: *Model for End-stage Liver Disease*;

| Categoria | Range di BMI | Frequenza assoluta | Percentuale (%) |
|-------------------|--------------|--------------------|-----------------|
| Sottopeso | < 18,5 | 0 | 0,0 |
| Normopeso | 18,5 – 24,9 | 8 | 28,6 |
| Sovrappeso | 25 – 29,9 | 16 | 57,1 |
| Obeso | ≥ 30 | 3 | 10,7 |

Tabella XXII. Distribuzione del BMI nei pazienti del gruppo affetti da cirrosi epatica evolutiva.

Variabili laboratoristiche. Nella Tabella XXIII sono riportate le variabili di laboratorio raccolte nei pazienti del gruppo affetto da cirrosi epatica evolutiva. Per la variabile creatinina è stato escluso un valore, poiché appartenente ad un paziente con insufficienza reale cronica (valore *outlier*). I valori che si sono rivelati essere al di fuori dell'intervallo di riferimento sono: AST; ALT; bilirubina; PT (%); INR; piastrine.

| Variabile | Paziente con cirrosi epatica evolutiva (n=28) | Intervallo di Normalità (M) |
|----------------------------|---|-----------------------------|
| γ GT (U/L) | 50 (29 - 85,75) | 3 - 65 |
| α FP (μ g/L) | 6,5 (4 - 11) | 0 - 7 |
| AST (U/L) | 48 (28 - 83) | 10 - 45 |
| ALT (U/L) | 56 (30 - 81) | 10 - 50 |
| Ferritina (ng/mL) | 195 (118 - 310) | 31 - 409 |
| Bilirubina (mg/dL) | 1,34 (0,88 - 1,90) | 0,10 - 1,00 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,84 (0,74 - 0,84) | 0,67 - 1,18 |
| PT (%) | 0,60 (0,50 - 0,73) | 0,75 - 1,12 |
| INR | 1,28 (1,18 - 1,51) | 0,80 - 1,20 |
| Albumina (g/L) | 38 (33 - 42) | 35 - 52 |
| PLT ($\times 10^3/\mu$ L) | 89 (58 - 111) | 150 - 450 |
| SCCA-IgM (AU/mL) | 99 (60 - 185) | <200 |

Tabella XXIII. Variabili di laboratorio valutate nel gruppo pazienti affetti da cirrosi evolutiva. α FP: α -fetoproteina; γ GT: γ -glutamyl-transpeptidasi; AST: aspartato-transaminasi; ALT: alanina-transaminasi; PT (%): *PT Activity*; INR: *International Normalized Ratio*; PLT: piastrine; SCCA-IgM: *Squamous Cell Cancer Antigen* complessato a immunoglobuline tipo IgM. La lettera (M) di fianco all'intervallo di normalità indica che tali intervalli fanno riferimento ad una popolazione adulta sana di sesso maschile.

Informazioni sull'epatopatia. Per quanto riguarda l'eziologia della cirrosi in questo gruppo di pazienti si faccia riferimento alla Tabella XXIV. Considerando le singole eziologie, possiamo osservare che: il 54% dei pazienti ha HCV tra le cause di cirrosi, il 39% ha l'assunzione di alcol, il 25% ha HBV. Solo 4 pazienti hanno eziologia multipla (14%). Secondo la classificazione Child-Pugh il 61% dei pazienti è in classe A, il 32% in classe B, il 3,5% in classe C. Per un paziente non è stato possibile calcolare la classe per mancanza di dati laboratoristici. Per quanto riguarda il MELD score, lo 86% ha un punteggio MELD <15, il restante ha invece un punteggio superiore. Il 36% dei pazienti ha sviluppato una o più complicanze

della cirrosi epatica (10 pazienti) prima di essere arruolato nello studio. Le singole frequenze sono riassunte nella Tabella XXV.

| Eziologia | Frequenza assoluta | Percentuale (%) |
|-----------------------|--------------------|-----------------|
| Alcol | 7 | 25,0 |
| Alcol, HBV | 1 | 3,6 |
| Alcol, HBV,HCV | 1 | 3,6 |
| Alcol, HCV | 2 | 7,1 |
| HBV | 5 | 17,8 |
| HCV | 12 | 42,8 |

Tabella XXIV. Elenco delle cause eziologiche di cirrosi nei soggetti affetti da cirrosi evolutiva, con frequenza assoluta e relativa. Considerando la presenza di un agente eziologico, indipendentemente dal fatto di averne altri associati, avremo che: il 39% ha l'assunzione di alcol tra le cause di cirrosi; il 54% ha l'infezione da HCV; il 25% ha un'infezione da HBV.

| Ascite | Sanguinamento | PBS | Encefalopatia |
|----------|---------------|---------|---------------|
| 9 (32,1) | 3 (10,7) | 1 (3,6) | 3 (10,7) |

Tabella XXV. Frequenza relativa di ciascun evento di scompenso acuto, indipendentemente dal fatto che si siano sviluppati più eventi nello stesso paziente. Frequenza assoluta (percentuale). PBS: peritonite batterica spontanea.

Informazioni sul follow-up. I pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva sono stati monitorati nel tempo fino allo sviluppo di epatocarcinoma. I pazienti hanno sviluppato HCC con una mediana di 4 anni e 9 mesi. Nella maggior parte dei casi il primo riscontro è stato in corso in follow-up ecografico semestrale (68%), nel restante dei casi mediante esami radiologici di secondo livello (TC o RM). Nel 64% dei casi le lesioni riscontrate erano monofocali, nel 36% dei casi multifocali (2 o più lesioni). Del gruppo CE, 3 pazienti sono andati incontro a trapianto di fegato, mentre 12 pazienti sono andati incontro ad exitus. In media la morte è sopraggiunta a 2 anni e 1 mese dopo la diagnosi di malattia neoplastica.

4.1.5 Pazienti affetti da cirrosi epatica non evolutiva

Informazioni generali. Quest'ultimo gruppo di pazienti si compone di 28 individui, 18 di sesso maschile e 10 di sesso femminile, tutti di etnia caucasica. L'età media dei pazienti è di 57 anni. Il peso mediano è di 74 chilogrammi; il BMI si distribuisce secondo quanto descritto nella Tabella XXVI, con il 68% dei pazienti

sovrappeso od obeso. Al momento dell'arruolamento 6 pazienti si dicono fumatori attivi (21%), 2 risultano ex-fumatori (7%) e i rimanenti si dichiarano non fumatori (71%). Per quanto riguarda il potus, 3 pazienti affermano di continuare ad assumere sostanze alcoliche. Infine, anamnesticamente, il 32% dei pazienti risulta affetto da ipertensione arteriosa (9 pazienti), il 36% da diabete mellito tipo 2 (10 pazienti) e lo 11% da sindrome metabolica (3 pazienti).

| Categoria | Range di BMI | Frequenza assoluta | Percentuale (%) |
|-------------------|--------------|--------------------|-----------------|
| Sottopeso | < 18,5 | 1 | 3,6 |
| Normopeso | 18,5 – 24,9 | 8 | 28,6 |
| Sovrappeso | 25 – 29,9 | 15 | 53,6 |
| Obeso | ≥ 30 | 4 | 14,3 |

Tabella XXVI. Distribuzione del BMI nei pazienti affetti da cirrosi epatica non evolutiva.

Variabili laboratoristiche. La Tabella XXVIII riporta i parametri di laboratorio raccolti per questo gruppo di pazienti. Si evidenzia che i parametri al di fuori dell'intervallo di normalità sono AST; bilirubina; PT (%); INR; piastrine.

| Variabile | Cirrosi epatica non evolutiva (n=28) | Intervallo di Normalità (M) |
|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| γGT (U/L) | 34 (23 - 79) | 3 - 65 |
| αFP (μg/L) | 4 (2 - 11) | 0 - 7 |
| AST (U/L) | 70 (49 - 91) | 10 - 45 |
| ALT (U/L) | 37 (25 - 59) | 10 - 50 |
| Ferritina | 195 (59 - 207) | 31 - 409 |
| Bilirubina (mg/dl) | 1,11 (0,86 - 1,81) | 0,10 - 1,00 |
| Creatinina (mg/dl) | 0,84 (0,72 - 0,90) | 0,67 - 1,18 |
| PT (%) | 0,65 (0,53 - 0,82) | 0,75 - 1,12 |
| INR | 1,21 (1,09 - 1,33) | 0,80 - 1,20 |
| Albumina (g/L) | 39 (32 - 44) | 35 - 52 |
| PLT (x10³/μL) | 90 (60 - 131) | 150 - 450 |
| SCCA-IgM | 144 (75 - 378) | 200 |

Tabella XXVIII. Variabili di laboratorio valutate nei pazienti affetti da cirrosi epatica non evolutiva. Variabili continue: mediana (range interquartile). αFP: α-fetoproteina; γGT: γ-glutamyl-transpeptidasi; AST: aspartato-transaminasi; ALT: alanina-transaminasi; PT (%): *PT Activity*; INR: *International Normalized Ratio*; PLT: piastrine; SCCA-IgM: *Squamous Cell Cancer Antigen* complessato a immunoglobuline tipo IgM. La lettera (M) di fianco all'intervallo di normalità indica che tali intervalli fanno riferimento ad una popolazione adulta sana di sesso maschile.

| Eziologia | Frequenza assoluta | Percentuale (%) |
|-------------------------------|--------------------|-----------------|
| Alcol | 7 | 25,0 |
| Alcol, HBV | 1 | 3,6 |
| Alcol, HCV, metabolica | 1 | 3,6 |
| Alcol, metabolica | 1 | 3,6 |
| Autoimmune | 3 | 10,7 |
| HBV | 3 | 10,7 |
| HBV, HCV | 2 | 7,1 |
| HBV, HDV | 2 | 7,1 |
| HBV, metabolica | 1 | 3,6 |
| HCV | 6 | 21,4 |
| HCV, metabolica | 1 | 3,6 |

Tabella XXIX. Elenco delle cause eziologiche di cirrosi nei soggetti affetti da epatocarcinoma, con frequenza assoluta e relativa. Considerando invece la presenza di un agente eziologico, indipendentemente dal fatto di averne altri associati, avremo che: il 36% ha l'assunzione di alcol tra le cause di cirrosi; il 36% ha l'infezione da HCV; il 32% ha un'infezione da HBV; il 14% ha una componente metabolica.

Informazioni sull'epatopatia. Nella tabella XXIX sono riportate le eziologie della cirrosi del gruppo di pazienti affetti da cirrosi epatica non evolutiva. Il 32% riconosce più di una eziologia. Considerando le singole cause di cirrosi: il consumo di alcol è presente nel 36% dei pazienti; l'infezione da HCV nel 36%; l'infezione da HBV nel 32% dei casi; la componente metabolica nel 14% dei casi. Per quanto riguarda la classificazione secondo Child-Pugh possiamo constatare che: 19 pazienti sono in classe A (68%); 6 pazienti sono in classe B (21%); 3 pazienti sono in classe C (11%). Per quanto riguarda invece il MELD score, lo 86% ha un punteggio MELD <15, il restante ha invece un punteggio superiore. Analizzando infine le complicanze della cirrosi epatica verificatesi in questi soggetti, si evidenzia che il 46% dei pazienti ha avuto uno o più episodi di scompenso acuto prima di essere arruolato nello studio. Per ulteriori informazioni fare riferimento alla Tabella XXX.

| Ascite | Sanguinamento | PBS | Encefalopatia |
|-----------|---------------|---------|---------------|
| 10 (35,7) | 4 (14,3) | 1 (3,6) | 3 (10,7) |

Tabella XXX. Frequenza relativa di ciascun evento di scompenso acuto, indipendentemente dal fatto che si siano sviluppati più eventi nello stesso paziente. Frequenza assoluta (percentuale)

| Variabile | Cirrosi epatica evolutiva (n=28) | Cirrosi epatica non evolutiva (n=28) | p-value |
|---------------------------------|-------------------------------------|---|---------|
| Sesso (M) | 22 (78,6) | 18 (64,3) | 0,2367 |
| IPA | 13 (46,4) | 9 (32,1) | 0,2737 |
| Diabete | 5 (17,9) | 10 (35,7) | 0,1314 |
| Sdr. Metabolica | 4 (14,3) | 3 (10,7) | 1,0000 |
| Fumo | 8 (28,6) | 6 (21,4) | 0,5371 |
| Alcol | 3 (10,7) | 3 (10,7) | 1,0000 |
| Eziologia | | | |
| - Alcol | 8 (28,6) | 9 (32,1) | 0,2457 |
| - HCV | 15 (53,6) | 10 (35,7) | |
| - HBV | 5 (17,9) | 6 (21,4) | |
| - Altro | 0 (0,0) | 3 (10,7) | |
| Età (anni) | 53 (46 - 61) | 58 (52 - 63) | 0,1331 |
| Peso (Kg) | 76 (67 - 82) | 74 (69 - 81) | 0,8969 |
| BMI (Kg/m²) | 25 (24 - 29) | 26 (24 - 26) | 0,7263 |
| γGT (U/L) | 50 (29 - 86) | 34 (23 - 79) | 0,2085 |
| αFP(μg/L) | 6,5 (4 - 11) | 4 (2,25 - 11) | 0,0661 |
| AST (U/L) | 48 (28 - 83) | 70 (49 - 91) | 0,1329 |
| ALT (U/L) | 56 (30 - 81) | 37 (25 - 59) | 0,1440 |
| Ferritina (ng/mL) | 195 (118 - 310) | 195 (59 - 207) | 0,2702 |
| Bilirubina (mg/dL) | 1,34 (0,88 - 1,90) | 1,11 (0,86 - 1,81) | 0,6823 |
| S-Cr (mg/dL) | 0,84 (0,74 - 0,84) | 0,84 (0,72 - 0,90) | 0,7463 |
| PT (INR) | 1,3 (1,18 - 1,51) | 1,21 (1,09 - 1,33) | 0,1660 |
| Albumina (g/L) | 38 (33 - 42) | 39 (32 - 44) | 0,7602 |
| PLT (x10³/μL) | 89 (58 - 111) | 90 (60 - 131) | 0,4916 |
| SCCA IgM (AU/mL) | 99 (60 - 185) | 144 (75 - 377) | 0,2582 |
| MELD | 11 (9 - 14) | 10 (8 ÷ 13) | 0,3354 |
| Child-Pugh | | | |
| - A | 17 (60,7) | 19 (67,9) | 0,4288 |
| - B | 9 (32,1) | 6 (21,4) | |
| - C | 1 (3,6) | 3 (10,7) | |

Tabella XXXI. La tabella riassume e confronta le variabili raccolte nei gruppi CE e CnE. Sono riportate: per le variabili continue: mediana (range interquartile); per le variabili qualitative: frequenza assoluta (percentuale). BMI: *Body Mass Index*; αFP: α-fetoproteina; γGT: γ-glutamyl-transpeptidasi; AST: aspartato-transaminasi; ALT: alanina-transaminasi; S-Cr: creatinina sierica; INR: *International Normalized Ratio*; PLT: piastrine; SCCA-IgM: *Squamous Cell Cancer Antigen* complessato a immunoglobuline tipo IgM; MELD: *Model for End-stage Liver Disease*.

Informazioni sul follow-up. Questo gruppo è stato seguito per un follow-up mediano di 3 anni e 9 mesi (range interquartile in mesi: 13 ÷ 78). Nessuno dei pazienti di questo gruppo ha sviluppato lesioni compatibili con epatocarcinoma nel corso del follow-up. Se si valuta la frequenza degli eventi: 2 pazienti sono stati trapiantati di fegato nel corso di follow-up e l'esame istologico non ha evidenziato lesioni neoplastiche; 8 pazienti sono andati incontro ad exitus.

4.1.6 Confronto tra i pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva e da cirrosi epatica non evolutiva

La Tabella XXXI confronta le variabili raccolte nei pazienti dei gruppi cirrosi evolutiva e cirrosi non evolutiva. Non si sono evidenziate differenze significative tra i due gruppi.

4.2 Classificatori per pazienti affetti da cirrosi epatica e epatocarcinoma

4.2.1 Analisi Random Forest

| Modello di analisi Random Forest | |
|--|---------|
| Dimensioni del campione | 161 |
| Frequenza nelle singole classi | 92, 69 |
| Numero di alberi | 10.000 |
| Dimensioni dei nodi foglia | 1 |
| Numero medio dei nodi foglia | 24,4403 |
| Numero di variabili testate ad ogni nodo | 17 |
| Numero totale di variabili | 18 |
| <i>Resampling used to grow trees</i> | swor |
| <i>Resample size used to grow trees</i> | 102 |
| Analisi | RF-C |
| Famiglia | Class |
| Regola di splitting | gini |
| <i>Imbalanced ratio</i> | 1,3333 |
| Tabella XXXII. Specifiche del modello Random Forest creato con i pazienti dei gruppi di pazienti affetti da cirrosi epatica ed epatocarcinoma. | |

I dati dei 191 pazienti dei gruppi di pazienti affetti da cirrosi epatica ed epatocarcinoma sono stati sfruttati per creare un classificatore mediante modello Random Forest. Le specifiche con cui è stata creata la foresta sono riportate in tabella XXXII. Essa si compone di 10.000 alberi decisionali, addestrati mediante l'utilizzo di 18 variabili. Nella Tabella XXXIII sono riportate le variabili utilizzate per addestrare e testare la foresta. Nella medesima tabella è riportato anche il peso che ciascuna variabile ha rivestito nel classificare i pazienti nelle categorie “affetto da cirrosi epatica” oppure “affetto da epatocarcinoma”. In particolare α FP, BMI, SCCA-IgM ed età si sono rivelati essere i parametri maggiormente discriminanti. Il modello Random Forest creato utilizzando il set di dati “pazienti affetti da cirrosi epatica” e “pazienti affetti da epatocarcinoma” è stato poi valido sul medesimo set di dati, con un errore totale di classificazione del 0,3230 (Tabella XXXIV). Nel testare il modello l'esito considerato positivo è stato l'essere “affetto da cirrosi epatica”.

| Variabile | Entrambi i gruppi | Pazienti affetti da cirrosi | Pazienti affetti da epatocarcinoma |
|------------------------------|-------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| αFP | 0.2079 | 1.4526 | - 0.6323 |
| BMI | 0.0727 | 0.4608 | - 0.1580 |
| SCCA-IgM | 0.0689 | 0.5367 | - 0.2829 |
| Età | 0.0611 | 0.0500 | 0.3167 |
| Bilirubina | 0.0370 | 0.3236 | - 0.1993 |
| Eziologia | 0.0290 | 0.1845 | - 0.0645 |
| Alcol | 0.0253 | 0.1624 | - 0.0580 |
| MELD score | 0.0244 | 0.1033 | 0.0156 |
| γGT | 0.0216 | 0.1151 | - 0.0178 |
| INR | 0.0112 | - 0.0116 | 0.0858 |
| Creatinina | 0.0042 | - 0.0451 | 0.0864 |
| Child-Pugh | 0.0037 | 0.0527 | - 0.0474 |
| Sesso | 0.0020 | - 0.0617 | 0.0947 |
| Etnia | 0.0007 | 0.0142 | - 0.0145 |
| Sindrome Metabolica | 0.0004 | 0.0026 | - 0.0011 |
| Fumo | - 0.0002 | - 0.0071 | 0.0080 |
| Ipertensione | - 0.0009 | - 0.0153 | 0.0147 |
| Diabete | - 0.0015 | - 0.0087 | 0.0017 |

Tabella XXXIII. Importanza delle variabili nell'analisi Random Forest. α FP: α -FetoProteina; BMI: *Body Mass Index*; γ GT: γ -Glutamyl-Transpeptidasi; INR: *International Normalized Ratio*.

| Matrice di confusione | Classificato come “affetto da cirrosi epatica” | Classificato come “affetto da epatocarcinoma” | Errore di classificazione |
|---|--|---|------------------------------|
| Pazienti affetti da cirrosi epatica (n=92) | 67 | 25 | 0,2717 |
| Pazienti affetti da epatocarcinoma (n=69) | 27 | 42 | 0,3913 |
| Accuratezza 0,6770 F1 score 0,7205 | | | |
| Kappa 0,3381 Prevalenza 0,5714 | | | |
| Sensibilità 0,7283 Detection Rate 0,4162 | | | |
| Specificità 0,6087 Prevalenza rilevata 0,5839 | | | |
| Valore Predittivo Positivo 0,7128 Accuratezza bilanciata 0,6685 | | | |
| Valore Predittivo Negativo 0,6269 Brier Score 0,2186 | | | |
| Precisione (Precision) 0,7128 AUC 0,7027 | | | |
| Richiamo (Recall) 0,7283 PR-AUC 0,6482 | | | |

Tabella XXXIV. Matrice di confusione del modello Random Forest e relativi parametri.

L'impatto che ha avuto l'età nel classificare un paziente come affetto da epatocarcinoma su cirrosi epatica piuttosto che da sola cirrosi epatica è rappresentato in Figura 5. Possiamo osservare che più aumenta l'età, più diminuisce la probabilità di essere classificati come “affetti da cirrosi epatica” e più aumenta la probabilità di essere classificati come “affetti da epatocarcinoma”. In particolare si assiste al decremento della probabilità di avere la sola cirrosi (senza dunque

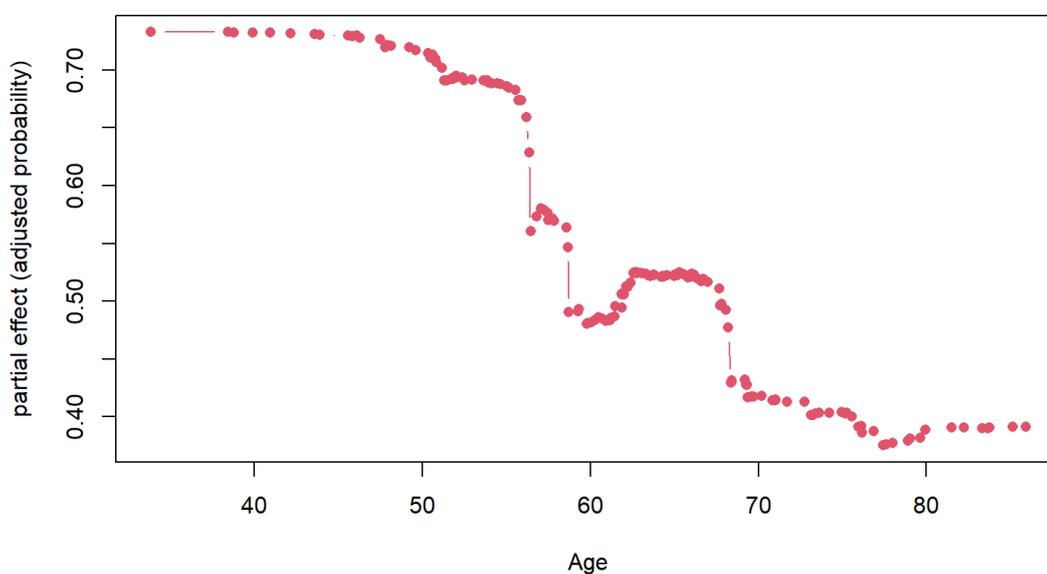


Figura 5. Impatto dell'età nel determinare la classificazione di un paziente nella categoria "affetti da cirrosi epatica".

epatocarcinoma) per età comprese tra i 50-60 anni, dove la variazione di probabilità è pari circa al 20%. Un discorso analogo può essere fatto per il biomarcatore SCCA-IgM (Figura 6). Possiamo osservare che, più le concentrazioni plasmatiche di SCCA-IgM aumentano, più cala la probabilità di classificare il paziente come “affetto da cirrosi” (e aumenta di conseguenza la probabilità di classificare il paziente come “affetto da epatocarcinoma”). Questo è vero per valori di marcatore compreso tra 0-1.000 AU/mL. Nel complesso SCCA-IgM è in grado di far variare la probabilità di classificare il paziente in uno dei due gruppi di quasi il 20%.

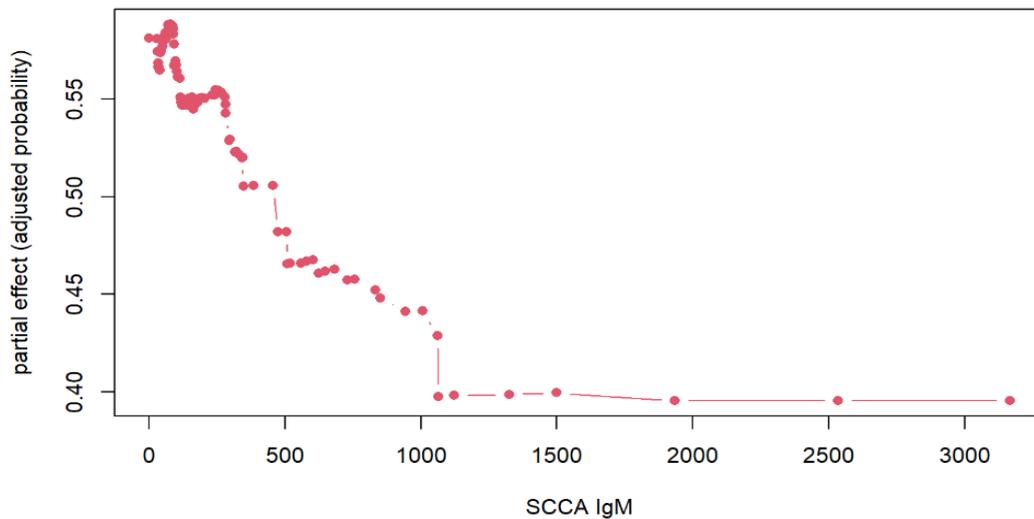


Figura 6. Impatto di SCCA-IgM nel determinare la classificazione di un paziente nella categoria "affetti da cirrosi epatica"

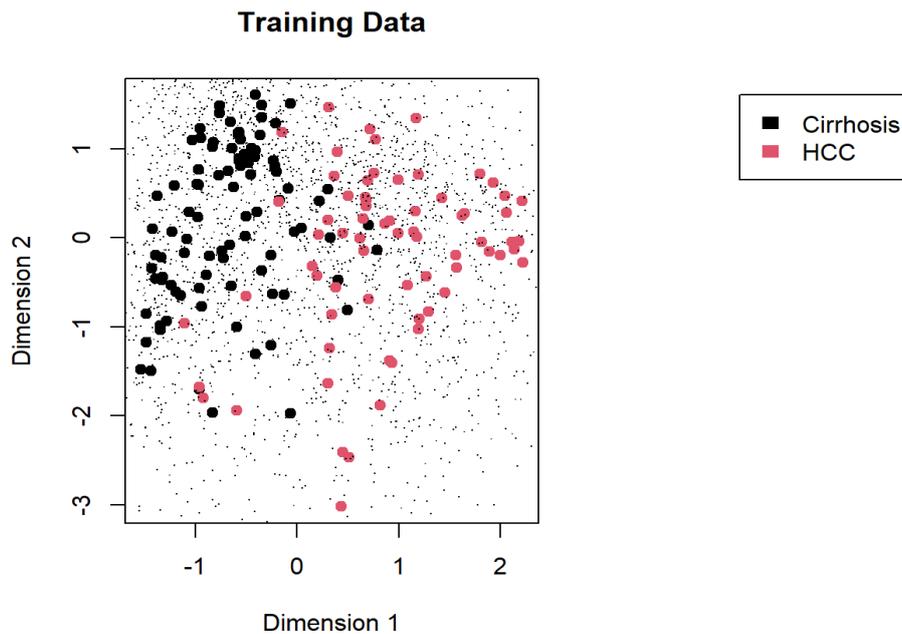


Figura 7. Grafico a dispersione del modello Random Forest. In ascissa e in ordinata le dimensioni che racchiudono le due migliori possibili combinazioni di tutte le variabili.

Nell'immagine 7 invece è riportata la rappresentazione grafica di come il modello distribuisce i pazienti nello spazio bidimensionale. In particolare nell'asse delle ascisse e delle ordinate troviamo le due migliori combinazioni di tutte le variabili utilizzate per addestrare la foresta. È evidente che il modello, anche se in modo non ottimale, è in grado di separare i pazienti affetti da sola cirrosi epatica da quelli affetti da epatocarcinoma insorto su cirrosi epatica.

4.2.2 Classificazione Random Ferns (rFerns)

| Riassunto delle caratteristiche dell'analisi con Random Ferns | | | |
|--|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Matrice di confusione | Classificato come | | Classificato come |
| | “affetto da cirrosi epatica” | | “affetto da epatocarcinoma” |
| Pazienti affetti da cirrosi epatica (n=92) | 63 | | 29 |
| Pazienti affetti da epatocarcinoma (n=69) | 17 | | 52 |
| Accuratezza (Acc) 0,7143 | | | |
| [Intervallo di confidenza 95%] [0,6379 - 0,7826] | | | |
| NIR (No Information Rate) 0,5714 | | | |
| p-value (Acc > NIR) 0,0001288 | | | |
| Kappa | 0,4291 | Richiamo (Recall) | 0,6848 |
| Sensibilità | 0,6848 | F1 score | 0,7326 |
| Specificità | 0,7536 | Prevalenza | 0,5714 |
| Valore predittivo positivo | 0,7875 | Detection Rate | 0,3913 |
| Valore predittivo negativo | 0,6420 | Prevalenza rilevata | 0,4969 |
| Precisione (Precision) | 0,7875 | Accuratezza bilanciata | 0,7192 |
| Tabella XXXV. Riassunto delle caratteristiche dell'analisi con Random Ferns. In alto la matrice confusione, in basso parametri che descrivono la matrice confusione. | | | |

Il medesimo insieme di dati è stato studiato mediante Random Ferns, nel tentativo di migliorarne le prestazioni. Nella Tabella XXXV sono riportate le specifiche relative al modello, in particolare la matrice di confusione. Il modello presenta un'accuratezza di 0,7143, con un F1 score di 0,7326. La concordanza del modello è moderata (kappa 0,4291) e valori quali sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e valore predittivo negativo hanno valori contenuti (vedi Tabella XXXV).

4.2.3 Confronto Random Forest e rFerns

Andando a confrontare i due modelli, come mostrato in tabella XXXVI notiamo che il modello Random Forest si dimostra meno accurato del modello rFerns (0,6770 vs 0,7143). Tuttavia, se si va a valutare lo F1 score, si può notare che le differenze in realtà non sono così evidenti (0,7205 vs 0,7326). Il secondo modello inoltre mostra una maggior specificità, quindi una maggior capacità di individuare tra i pazienti affetti da cirrosi epatica quelli che hanno anche epatocarcinoma (Sp: 0,7563; VPN: 0,6420). Infine, per quanto riguarda il grado di concordanza dei due algoritmi di classificazione, possiamo constatare che, mentre il modello Random Forest ha una concordanza modesta (kappa: 0,3381), il modello Random Ferns ha una concordanza moderata (kappa: 0,4291).

| Specifiche | Random Forest | rFerns |
|----------------------------------|---------------|--------|
| Accuratezza (Acc) | 0,6770 | 0,7143 |
| Sensibilità (Se) | 0,7283 | 0,6848 |
| Specificità (Sp) | 0,6087 | 0,7536 |
| Valore predittivo positivo (VPP) | 0,7128 | 0,7875 |
| Valore predittivo negativo (VPN) | 0,6269 | 0,6420 |
| Precisione (<i>Precision</i>) | 0,7128 | 0,7875 |
| Richiamo (<i>Recall</i>) | 0,7283 | 0,6848 |
| F1 score | 0,7205 | 0,7326 |
| Prevalenza | 0,5714 | 0,5714 |
| Detection Rate | 0,4162 | 0,3913 |
| Prevalenza rilevata | 0,5839 | 0,4969 |
| Accuratezza bilanciata | 0,6685 | 0,7192 |
| Kappa | 0,3381 | 0,4291 |

Tabella XXXVI. Confronto tra le caratteristiche del modello Random Forest e rFerns.

4.3 Classificatori per pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva e cirrosi epatica non evolutiva

4.3.1 Analisi Random Forest

Con il set di dati composto dai pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva e non evolutiva è stato creato un modello classificativo mediante analisi Random Forest. I pazienti utilizzati per addestrare la foresta sono stati 56, le variabili totali utilizzate 27 (Tabella XXXVII). Il modello ha pesato l'importanza di ciascuna delle variabili:

come risultato si è osservato che α FP, AST, ALT, γ GT e SCCA-IgM sono quelle a maggior impatto (Tabella XXXVIII). La matrice di confusione ottenuta durante l'analisi è riportata in Tabella XXXIX assieme alle relative misurazioni statistiche. Si può constatare che il modello ottenuto durante l'analisi Random Forest non è in grado di predire se un paziente svilupperà o meno epatocarcinoma. Esso infatti classifica i pazienti in modo errato nel 50% dei casi.

| Modello di analisi Random Forest | |
|---|--------|
| Dimensioni del campione | 56 |
| Frequenza nelle singole classi | 28; 28 |
| Numero di alberi | 10.000 |
| Dimensioni dei nodi foglia | 3 |
| Numero medio dei nodi foglia | 8,1715 |
| Numero di variabili testate ad ogni nodo | 11 |
| Numero totale di variabili | 27 |
| <i>Resampling used to grow trees</i> | swor |
| <i>Resample size used to grow trees</i> | 35 |
| Analisi | RF-C |
| Famiglia | Class |
| Regola di splitting | gini |
| <i>Imbalanced ratio</i> | 1 |
| Tabella XXXVII. Specifiche del classificatore Random Forest dei gruppi di pazienti con cirrosi epatica evolutiva e cirrosi epatica non evolutiva. | |

| | Classificato come “affetto da CE” | Classificato come “affetto da CnE ” | Errore di classificazione |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--|------------------------------|
| Pazienti affetti da CE (n=28) | 14 | 14 | 0,5000 |
| Pazienti affetti da CnE (n=28) | 14 | 14 | 0,5000 |
| Accuratezza | 0,5000 | F1 score | 0,5000 |
| Kappa | 0 | Prevalenza | 0,5000 |
| Sensibilità | 0,5000 | Detection Rate | 0,2500 |
| Specificità | 0,5000 | Prevalenza rilevata | 0,5000 |
| Valore Predittivo Positivo | 0,5000 | Balanced Accuracy | 0,5000 |
| Valore Predittivo Negativo | 0,5000 | Brier Score | 0,2787 |
| Precisione (Precision) | 0,5000 | AUC | 0,4643 |
| Richiamo (Recall) | 0,5000 | PR-AUC | 0,4553 |

Tabella XXXIX. Matrice di confusione del modello Random Forest dei gruppi “pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva” e “pazienti affetti da cirrosi epatica non evolutiva”, con relativi parametri. CE: cirrosi epatica evolutiva; CnE: cirrosi epatica non evolutiva.

| Variabile | Entrambi i gruppi | Pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva | Pazienti affetti da cirrosi epatica non evolutiva |
|-------------------------------------|-------------------|---|---|
| AST | 0.0124 | 0.2029 | - 0.1360 |
| ALT | 0.0116 | - 0.0929 | 0.1554 |
| Sanguinamento dalle varici esofagee | 0.0016 | 0.0150 | - 0.0065 |
| INR | 0.0005 | - 0.0017 | 0.0045 |
| Sesso | - 0.0001 | 0.0307 | - 0.0315 |
| PBS | - 0.0003 | 0.0077 | - 0.0092 |
| Ipertensione | - 0.0003 | - 0.0203 | 0.0183 |
| Child-Pugh | - 0.0004 | 0.0135 | - 0.0155 |
| Alcol | - 0.0005 | - 0.0034 | 0.0010 |
| Etnia | - 0.0006 | - 0.0067 | 0.0036 |
| Albumina | - 0.0007 | 0.3543 | - 0.3581 |
| Ascite | - 0.0009 | 0.0011 | - 0.0060 |
| Diabete | - 0.0014 | 0.0213 | - 0.0291 |
| Encefalopatia | - 0.0016 | 0.0054 | - 0.0140 |
| Sindrome metabolica | - 0.0017 | - 0.0119 | 0.0026 |
| Ferritina | - 0.0018 | 0.1889 | - 0.1984 |
| Eziologia | - 0.0024 | 0.1034 | - 0.1166 |
| Fumo | - 0.0029 | 0.0163 | - 0.0317 |
| MELD | - 0.0029 | - 0.0231 | 0.0075 |
| Creatinina | - 0.0064 | 0.0449 | - 0.0792 |
| BMI | - 0.0067 | 0.0191 | - 0.0553 |
| Piastrine | - 0.0068 | 0.2271 | - 0.2640 |
| Età | - 0.0072 | - 0.1103 | 0.0717 |
| SCCA-IgM | - 0.0074 | 0.0393 | - 0.0790 |
| γ GT | - 0.0085 | 0.1855 | - 0.2313 |
| α FP | - 0.0114 | 0.3021 | - 0.3637 |

Tabella XXXVIII. Importanza delle singole variabili durante l'analisi Random Forest dei gruppi "pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva" e "pazienti affetti da cirrosi epatica non evolutiva". α FP: α -fetoproteina; BMI: *Body Mass Index*; MELD: *Model for End-stage Liver Disease*; γ GT: γ -glutamyl-transpeptidasi; INR: *International Normalized Ratio*; AST: aspartato-transaminasi; ALT: alanina-transaminasi; PBS: Peritonite Batterica Spontanea.

4.3.2 Classificazione Random Ferns (rFerns)

Nel tentativo di creare un modello in grado di predire efficacemente lo sviluppo o meno di neoplasia nei pazienti affetti da cirrosi epatica, è stato cambiato approccio e si è portata avanti un'analisi mediante Random Ferns.

| Riassunto delle caratteristiche dell'analisi con Random Ferns | | | |
|---|-----|--------------------------------------|--|
| Matrice di confusione | | Classificato come "affetto da CE" | Classificato come "affetto da CnE " |
| Pazienti affetti da CE (n=28) | | 28 | 0 |
| Pazienti affetti da CnE (n=28) | | 0 | 28 |
| Accuratezza (Acc) | | 1,0 | |
| [Intervallo di confidenza 95%] | | [0,9362 – 1] | |
| NIR (<i>No Information Rate</i>) | | 0,5 | |
| p-value (Acc > NIR) | | <0,0001 | |
| Kappa | 1 | Richiamo (<i>Recall</i>) | 1,0 |
| Sensibilità | 1,0 | F1 score | 1,0 |
| Specificità | 1,0 | Prevalenza | 0,5 |
| Valore predittivo positivo | 1,0 | Detection Rate | 0,5 |
| Valore predittivo negativo | 1,0 | Prevalenza rilevata | 0,5 |
| Precisione (<i>Precision</i>) | 1,0 | Accuratezza bilanciata | 1,0 |

Tabella XL. Riassunto delle caratteristiche dell'analisi con Random Ferns. In alto la matrice confusione, in basso parametri che descrivono la matrice confusione. CE: cirrosi epatica evolutiva; CnE: cirrosi epatica non evolutiva.

Studiando la matrice di confusione in Tabella XL, possiamo constatare che il modello è in grado di distinguere con massima accuratezza (1,0), precisione (1,0) e richiamo (1,0) i pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva da quelli con cirrosi epatica non evolutiva. In considerazione del basso numero di unità statistiche e dell'alto numero di variabili che stiamo considerando, questi risultati lasciano intendere un sovra-adattamento del modello ai dati utilizzati per addestrarlo. Per tale motivo anche questo tipo di modello è risultato fallimentare.

4.3.3 Ensemble Approach

Poiché nessuno dei due modelli precedenti si è rivelato efficace, si è tentato un ultimo approccio, ovvero l'*Ensemble Approach*. È stato dunque addestrato un

superlearner utilizzando i medesimi 56 pazienti. L'*overfitting* è stato contenuto mediante *v-fold cross validation* ($v: 20$). Il miglior modello individuato, assegnata una probabilità di evoluzione a ciascun paziente (Figura 8), ha valutato il miglior cut-off per distinguere i pazienti a rischio di evoluzione da quelli non a rischio di evoluzione.

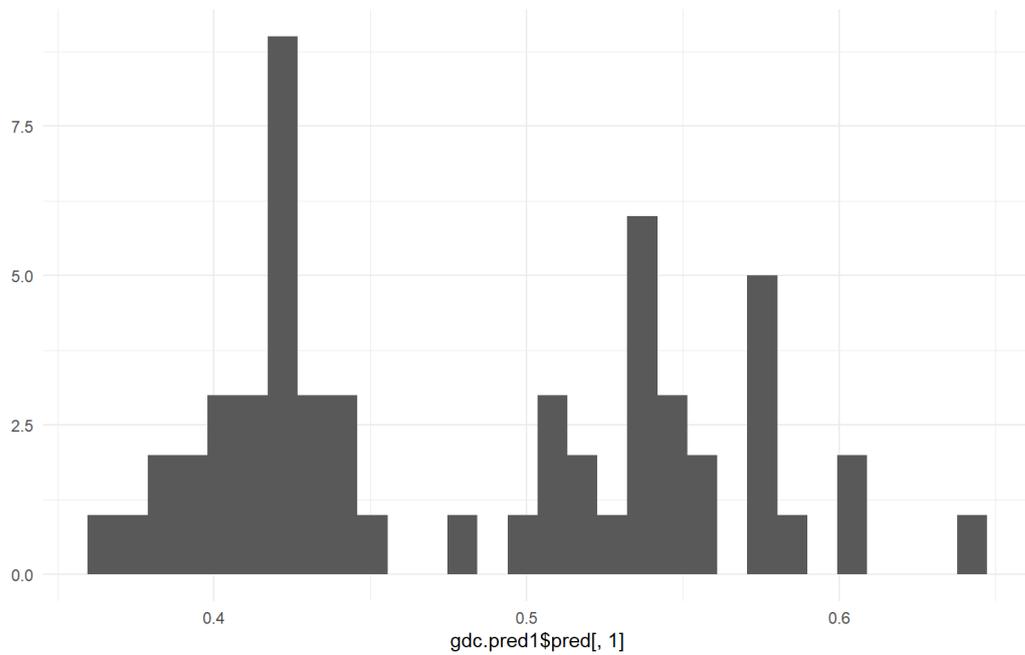


Figura 8. Distribuzione dei pazienti secondo il *superlearner* sulla base della probabilità di evoluzione ad epatocarcinoma. Sull'asse delle ascisse la probabilità di evoluzione; sull'asse delle ordinate i numero assoluto di pazienti attribuiti a ciascuna classe di rischio.

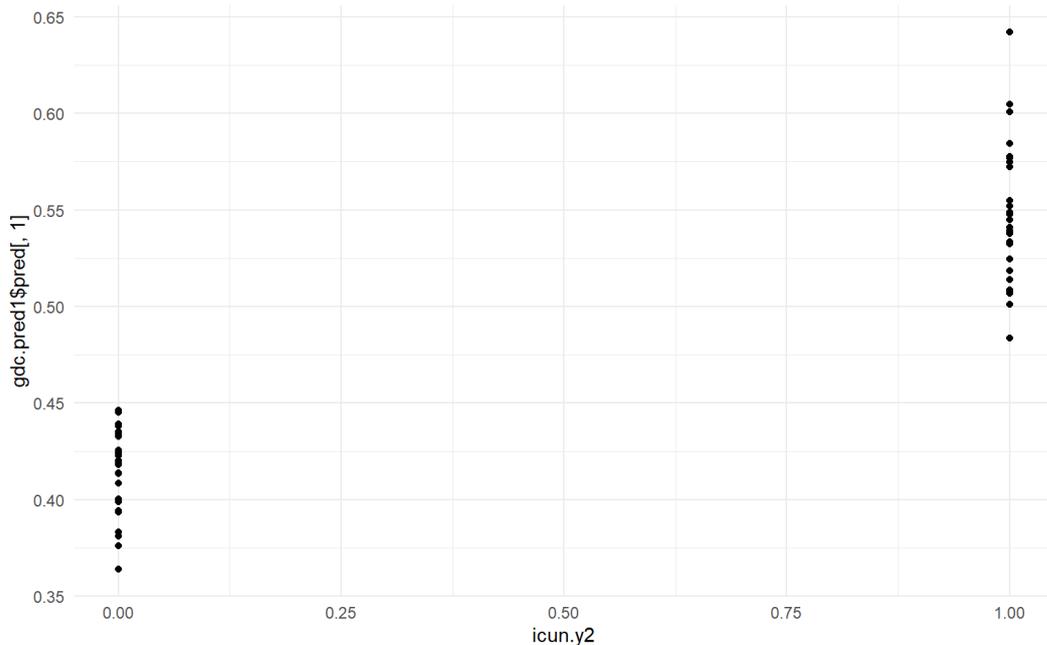


Figura 9. Classificazione dei pazienti secondo probabilità di evoluzione. Sull'asse delle ordinate la probabilità di evoluzione assegnata dal *superlearner*; sull'asse delle ascisse la classe assegnata: 0,00 (cirrosi epatica non evolutiva); 1,00 (cirrosi epatica evolutiva).

Tale cut-off è stato posto a 0,47: pazienti con un rischio di evoluzione minore vengono categorizzati come “pazienti con cirrosi epatica non evolutiva”, mentre pazienti con una probabilità di evoluzione maggiore vengono categorizzati come “pazienti con cirrosi epatica non evolutiva” (Figura 9). L’accuratezza del modello in fase di addestramento e con il cut-off posto a 0,47 è 1,00 (figura 10).

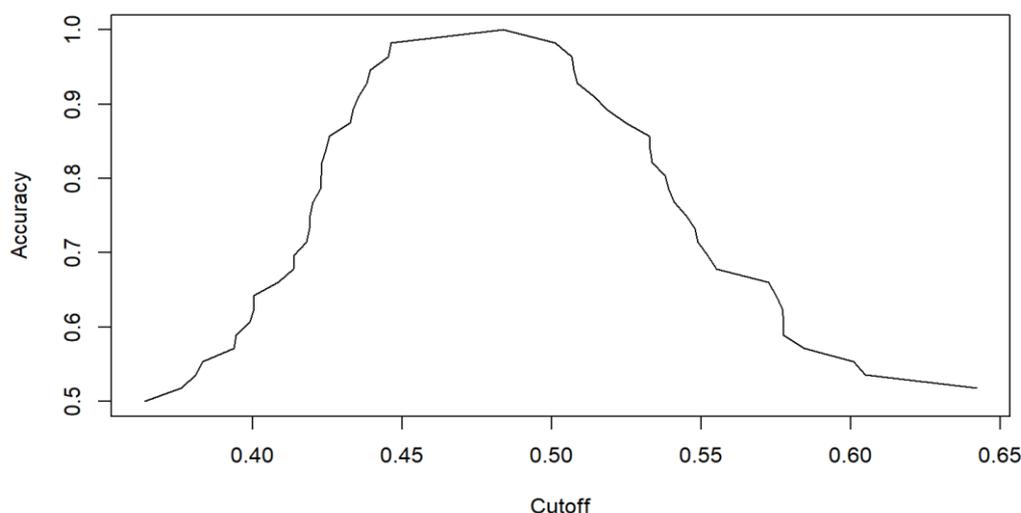


Figura 10. Variazione dell’accuratezza del modello (in ordinata) rispetto alla variazione del cut-off (in ascissa).

| Riassunto delle caratteristiche dell’analisi con Superlearner | | | |
|---|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Matrice di confusione | Classificato come “affetto da CE” | | Classificato come “affetto da CnE ” |
| Pazienti affetti da CE (n=28) | 28 | | 0 |
| Pazienti affetti da CnE (n=28) | 1 | | 27 |
| Accuratezza (Acc) | | 0,9821 | |
| [Intervallo di confidenza 95%] | | [0,9045 – 0,9995] | |
| NIR (No Information Rate) | | 0,5 | |
| p-value (Acc > NIR) | | <0,0001 | |
| Kappa | 0,9643 | Richiamo (Recall) | 1,0000 |
| Sensibilità | 1,0000 | F1 score | 0,9825 |
| Specificità | 0,9643 | Prevalenza | 0,5000 |
| Valore predittivo positivo | 0,9655 | Detection Rate | 0,5000 |
| Valore predittivo negativo | 1,0000 | Prevalenza rilevata | 0,5200 |
| Precisione (Precision) | 0,9655 | Accuratezza bilanciata | 0,9821 |

Tabella XLI. Riassunto delle caratteristiche dell’analisi con Superlearner. In alto la matrice confusione, in basso parametri che descrivono la matrice confusione. CE: cirrosi epatica evolutiva; CnE: cirrosi epatica non evolutiva.

Andando a testare il modello sul set di dati composto da cirrosi epatica evolutiva e cirrosi epatica non evolutiva otteniamo la matrice di confusione riportata in Tabella XLI. Come si può osservare il modello ha delle ottime caratteristiche: l'accuratezza è di 0,9821 (F1 score: 0,9825) e la concordanza è quasi perfetta (kappa: 0,9643). Per validare il modello abbiamo utilizzato la corte di pazienti affetti da sola cirrosi epatica, in quanto aventi tutte le variabili necessarie per una corretta classificazione. Inoltre sappiamo che essi non hanno sviluppato epatocarcinoma entro i 5 anni di follow-up. Il *superlearner* è stato in grado di classificare correttamente come non evolutivi 77 pazienti su 92, con una specificità di 0,8370.

Capitolo 5 – Discussione

L'epatocarcinoma è la principale neoplasia primitiva del fegato, sesta per incidenza tra le malattie neoplastiche a livello mondiale e terza per mortalità correlata a tumore(69,70). Poiché questa patologia insorge nel 90% dei casi su un fegato già compromesso, lo screening per epatocarcinoma è parte integrante dell'iter gestionale nei soggetti con cirrosi epatica ed epatopatia evolutiva correlata ad infezione cronica da HBV(135,136). Lo screening ad oggi si basa principalmente sull'esecuzione di un'ecografia dell'addome superiore e sulla rilevazione sierica di α FP(144). Mentre l'ecografia ha specifiche buone come test (Se: 80%; Sp: 90%), l' α FP resta un biomarcatore meno efficace (Se: 60%; Sp: 80%) e responsabile inoltre dell'aumento dei falsi positivi in corso di screening(125,142,143). Per tale motivo la ricerca di biomarcatori da utilizzare nell'ambito dello screening per epatocarcinoma è in fermento. Nonostante molte molecole si siano dimostrate promettenti, nessuna di queste è stata in grado di superare l' α FP nella pratica clinica o di entrare nella routine dello screening. Nel contesto dei biomarcatori innovativi rientra SCCA-IgM, che ha mostrato la capacità di poter individuare quali pazienti affetti da cirrosi epatica svilupperanno epatocarcinoma (196,203). Sempre nell'ambito di metodiche innovative, gli algoritmi di *machine learning* si stanno dimostrando capaci di superare i limiti che gli score attuali hanno nel predire lo sviluppo di epatocarcinoma nei soggetti affetti da cirrosi(212). Questi sono algoritmi che, nel campo della medicina della prevenzione, possono essere sfruttati per creare modelli classificativi basandosi su un set di dati pre-esistenti (definiti dati di input o dati di allenamento). Nel nostro caso, inserendo poi i dati del paziente che vogliamo studiare, l'algoritmo è in grado di riferire la presenza o meno di malattia nel paziente (*outcome*) basandosi su ciò che ha appreso dal set di dati di addestramento. Il vantaggio dei modelli basati sul *machine learning* rispetto ai modelli basati sulla statistica convenzionale di analisi della regressione è che questi si possono ottimizzare nel tempo immettendo nuovi dati input: più pazienti l'algoritmo incontra, più le sue capacità di categorizzare il paziente in modo corretto aumentano(212).

5.1 Pazienti affetti da cirrosi epatica

Considerando i soggetti affetti da cirrosi epatica non complicata da epatocarcinoma, abbiamo constatato che le caratteristiche epidemiologiche sono conformi a quanto osservato in letteratura(4). L'età mediana risulta essere di 58 anni e il rapporto M:F è di 2-3:1 in tutti e tre i sottogruppi presi assieme. Per quanto riguarda le eziologie della cirrosi epatica invece, risultano esserci delle discordanze tra quanto da noi osservato e la letteratura. Pur confermandosi infatti le principali eziologie della cirrosi epatica (l'abuso di bevande alcoliche, le infezioni da virus dell'epatite C e da virus dell'epatite B e le cause metaboliche), queste hanno prevalenze diverse nei diversi sottogruppi, come evidenziato nella Tabella XLII. Si può osservare una maggior prevalenza di cirrosi correlata all'infezione da virus dell'epatite C in tutti i sottogruppi, soprattutto nei pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva. Inoltre si può osservare anche una maggior prevalenza di cirrosi epatica secondaria all'abuso alcolico, in particolare nel sottogruppo di pazienti affetti da sola cirrosi epatica. Le discordanze potrebbero essere dovute in parte al fatto che i dati con cui è stato operato il confronto appartengono ad una casistica globale, piuttosto che ad una prettamente occidentale(213,214). Per quanto riguarda il BMI, considerando i tre sottogruppi assieme, possiamo constatare che la percentuale di pazienti sovrappeso od obesi è del 59%, più elevata rispetto ai dati ISTAT del 2017, che evidenziavano una percentuale di soggetti sovrappeso od obesi del 46% nella popolazione generale(215). Il BMI mediano è di 25 considerando i tre sottogruppi assieme, più simile a quello che si riscontra in popolazioni di pazienti con cirrosi epatica ed obesità viscerale, dove il BMI mediano è appunto 25, piuttosto che in quelli con

| Eziologia | Pazienti affetti da cirrosi (n=92) | Pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva (n=28) | Pazienti affetti da cirrosi epatica non evolutiva (n=28) | Letteratura |
|--------------------------|------------------------------------|--|--|-------------|
| Alcol | 43% | 39% | 36% | 32% |
| HBV | 27% | 25% | 32% | 25% |
| HCV | 29% | 54% | 36% | 21% |
| Metabolica | 16% | 0% | 14% | 8% |
| Altro | 3% | 0% | 11% | 14% |
| Totale | 118% | 118% | 129% | 100% |
| Plurima eziologia | 17% | 14% | 25% | 0% |

Tabella XLII. Eziologia della cirrosi epatica nel campione oggetto di studio e in letteratura. HBV: virus dell'epatite B; HCV: virus dell'epatite C.

sola cirrosi epatica, dove il BMI mediano è 23(216). Se la tendenza dei pazienti epatopatici è di avere valori di BMI maggiori della norma, essi non si mostrano più inclini a consumare fumo di tabacco, con il 23% dei pazienti che si confermano fumatori attivi (dati ISTAT: 20% degli italiani in età adulta si dichiara fumatrice)(215). L'attitudine al consumo di bevande alcoliche al momento del reclutamento è basso, in quanto solo 8% di tutti i pazienti affetti da cirrosi, indipendentemente dall'eziologia, ha consumato almeno una bevanda alcolica in un anno(215). Considerando che fino al 43% di questi pazienti ha una cirrosi su base alcolica, come già evidenziato precedentemente, una percentuale così bassa di potus attivo è sicuramente dovuta in parte alle indicazioni mediche che ricevono i pazienti epatopatici (l'astensione dalle bevande alcoliche è infatti una delle principali modifiche allo stile di vita), ma anche e probabilmente ad una raccolta non corretta dell'informazione anamnestica. Il dato sul potus infatti non è stato confermato da esami di laboratorio, se non in casi di dipendenza conclamata in corso di terapia, lasciando spazio a false affermazioni. Per quanto riguarda gli esami di laboratorio, in tutti e tre i sottogruppi è presente lieve-moderata piastrinopenia (mediana tra 80-150 x10³ piastrine/ μ L), compatibile con l'ipertensione portale e dunque sequestro splenico. Altri valori che si sono osservati lievemente alterati sono stati la bilirubinemia, il valore di INR (*International Normalized Ratio*) e le transaminasi epatiche (vedi Tabella XLIII). Bilirubina e INR mediamente non in range è un dato atteso, in quanto questi parametri risentono dell'insufficienza epatica. Le aminotransferasi epatiche non sempre elevate sono un altro dato atteso, in quanto non è raro nei soggetti affetti da cirrosi epatica avere delle transaminasi normali o leggermente al di sopra del limite di normalità, indipendentemente dalla persistenza

| Parametri | Pazienti affetti da cirrosi (n=92) | Pazienti affetti da cirrosi evolutiva (n=28) | Pazienti affetti da cirrosi non evolutiva (n=28) | Intervallo di normalità |
|-------------------|------------------------------------|--|--|-------------------------|
| Bilirubina | 1,15 (0,64 - 1,99) | 1,34 (0,88 - 1,90) | 1,11 (0,86 - 1,81) | 0,10 - 1,00 |
| INR | 1,24 (1,12 - 1,38) | 1,28 (1,18 - 1,51) | 1,21 (1,09 - 1,33) | 0,80 - 1,20 |
| AST | 39 (27 - 63) | 48 (28 - 83) | 70 (49 - 91) | 10 - 45 |
| ALT | 31 (26 - 53) | 56 (30 - 81) | 37 (25 - 59) | 10 - 50 |
| SCCA-IgM | 98 (64 - 234) | 98 (64 - 234) | 143 (66 - 336) | <200 |

Tabella XLIII. Parametri di laboratorio espressi come mediana (intervallo interquartile). INR: *International Normalized Ratio*. AST: aspartato-transaminasi; ALT: alanina-transaminasi

dell'agente lesivo. Tra i diversi sottogruppi non si sono evidenziate differenze significative del marcatore SCCA-IgM. Per quanto riguarda gli score prognostici, i pazienti di questi sottogruppi sono classificabili nel 61% dei casi in classe A secondo Child-Pugh (vedi Tabella XLIV), mentre lo 81% ha un punteggio MELD<15 punti. La prognosi del campione in esame è pertanto buona, in linea con quanto riscontrabile in altre popolazioni europee. La buona prognosi dei pazienti in carico agli ambulatori per le malattie di fegato dell'Ospedale Universitario di Padova è ascrivibile anche e soprattutto all'attento monitoraggio cui sono sottoposti(217). In Tabella XLIV un confronto con una popolazione mista (spagnola e italiana) di soggetti affetti da cirrosi epatica(218).

| Classe Child-Pugh | Pazienti affetti da cirrosi epatica (n=148) | Coorte spagnola-italiana (n=203) | p-value |
|-------------------|---|----------------------------------|---------|
| A | 61% | 75% | 0,2039 |
| B | 26% | 21% | |
| C | 8% | 4% | |

Tabella XLIV. Confronto Child-Pugh tra popolazione del nostro studio e popolazione mista (spagnola e italiana)

Nel complesso possiamo affermare che la popolazione di pazienti affetti da cirrosi epatica da noi studiata rispecchia le caratteristiche delle altre popolazioni con medesima malattia presenti in letteratura. Infine, sottolineiamo che durante l'analisi univariata delle popolazioni con cirrosi epatica evolutiva e non evolutiva non sono poi emerse differenze significative in nessuno dei domini esplorati. In questo senso un'analisi statistica univariata non è in grado di dirmi quale paziente è a rischio di evoluzione ad epatocarcinoma e quale invece non lo è.

5.2 Pazienti affetti da epatocarcinoma

I soggetti affetti da epatocarcinoma insorto su cirrosi epatica hanno mostrato caratteristiche in linea con quanto evidenziato in letteratura. In particolare il campione non mostra differenze significative per quanto riguarda età mediana (osservata: 65 anni; attesa: 65-70 anni), rapporto maschi-femmine (osservato: 4:1; atteso: 3:1), abitudine tabagica (osservata: 16%; attesa: 20%)(105,106,215). Per quanto riguarda il BMI, il 74% dei pazienti affetti da epatocarcinoma insorto su cirrosi epatica è o sovrappeso (42%) od obeso (32%), valori nettamente superiori a quelli della media nazionale (46%)(215). Nella tabella XLV il confronto tra le

eziologie nel gruppo di pazienti affetti da epatocarcinoma insorto su cirrosi epatica da noi riscontrate e quelle rilevate in letteratura(1). Nel nostro campione si può notare una maggior presenza di pazienti HCV positivi rispetto a quanto riportato in letteratura, così come una minor percentuale di pazienti che sviluppano epatocarcinoma in seguito ad abuso alcolico. Va sottolineato che il 45% dei pazienti ha una causa di epatopatia diversa da potus e infezioni virali. In questa percentuale è fatta rientrare anche la NASH (*Non Alcoholic Steato-Hepatitis*), meglio nota ad oggi con il nome di MAFLD (*Metabolic Associated Fatty Liver Disease*)(20). I dati di letteratura con cui è stato operato il confronto sono tuttavia antecedenti alla coniazione di questa nuova entità patologica e pertanto non la riportano tra le possibili eziologie.

| Eziologia | Osservate | Attese | |
|--------------------------|-----------|----------------------|-----------|
| | (n=69) | (Europa occidentale) | (Globali) |
| Alcol | 38% | 53% | 30% |
| HBV | 16% | 15% | 33% |
| HCV | 39% | 24% | 21% |
| Altro | 45% | 8% | 16% |
| Totale | 138% | 100% | 100% |
| Plurime eziologie | 41% | 0% | 0% |

Tabella XLV. Confronto delle principali eziologie di epatocarcinoma

Per quanto riguarda i parametri di laboratorio, come potevamo aspettarci, la mediana di γ -GT, di INR e di bilirubina eccede i limiti di normalità. La mediana di α FP e SCCA-IgM è invece risultata nella norma. La maggior parte dei pazienti risulta poi avere una cirrosi epatica ben controllata (Child-Pugh A: 48%; MELD <15: 90%). Il confronto con i pazienti affetti da cirrosi epatica ha fatto emergere, già con l'analisi univariata, differenze significative tra i valori di α FP (p-value: 0,0104), γ -GT (p-value: 0,0203), età (p-value: <0,0001) ed eziologia (p-value: 0,0363). In letteratura è ormai assodato che i valori di α FP siano più elevati nei soggetti cirrotici che hanno sviluppato epatocarcinoma rispetto a quello che non l'hanno ancora sviluppato, tant'è che ad oggi è l'unico marcatore tumorale realmente in uso nella pratica clinica(142,143). Era attesa anche la differenza tra le età dei sottogruppi di pazienti affetti da sola cirrosi e da cirrosi complicata da epatocarcinoma. Interessante è invece il fatto che insista una differenza tra i valori di γ -GT tra i due gruppi. Questa differenza potrebbe essere legata ad una maggiore

frazione di γ -GT-II, isoforma che si è dimostrata maggiormente espressa nei pazienti affetti da epatoma ed epatocarcinoma oppure legata ai vantaggi che la lesione neoplastica trae da una maggior espressione di GGT, quali ad esempio una maggior velocità di crescita(219,220). Il marcatore SCCA-IgM non ha mostrato, nell'analisi univariata, differenze significative tra i due gruppi (p-value: 0,0914). Per quanto riguarda invece le caratteristiche dell'epatocarcinoma abbiamo potuto constatare che la dimensione mediana delle lesioni è di 2 cm (intervallo interquartile: 1,6 - 3,2 cm) e che nel 65% dei casi erano presenti meno di tre lesioni, indice che il follow-up è efficace nell'intercettare la malattia quando è ancora nelle sue fasi più precoci.

5.3 Algoritmi di *machine learning*

Gli algoritmi di *machine learning* si propongono come valide alternative ai modelli predittivi basati sulla statistica tradizionale. Quest'ultimi infatti sono criticati poiché hanno una limitata capacità di generalizzazione, un'accuratezza modesta e spesso una mancanza di validazione esterna(212). Nell'ultimo decennio è stata invece dimostrata la validità dei modelli *machine learning* nel predire lo sviluppo di epatocarcinoma nei pazienti affetti da cirrosi. Nella Tabella XLVI i principali studi ed i relativi parametri di accuratezza(221–225).

| Autore, anno | Classificatore | Accuratezza |
|-------------------------|----------------------------|--|
| Singal AG, 2013 | Random Forest | c-statistics: 0,64 |
| Reddy R, 2017 | Rete neuronale artificiale | AUROC: 0,96 |
| Ioannou GN, 2019 | Rete neuronale ricorrente | AUROC: 0,759 |
| Nam JY, 2020 | Rete neuronale profonda | c-statistics: 0,782 (nel gruppo di validazione esterna) |
| An C, 2021 | Random Forest | c-statistics: 0,857 (nel gruppo di validazione esterna) |

Tabella XLVI. Studi selezionati che hanno utilizzato l'intelligenza artificiale per predire lo sviluppo di epatocarcinoma nei soggetti affetti da cirrosi epatica.

Il nostro studio ha creato e testato diversi classificatori basati su algoritmi *machine learning*, in particolare modelli Random Forest, Random Ferns e Ensemble Approach. Per quanto riguarda i classificatori in grado di discernere tra i pazienti affetti da sola cirrosi epatica e quelli con cirrosi epatica complicata da epatocarcinoma, possiamo osservare che i parametri statistici sono discreti. È

opportuno ricordare, per una corretta analisi dei risultati, che il modello da noi creato considera come evento l'essere affetto da sola cirrosi epatica. Pertanto quando vogliamo valutare quanti pazienti affetti da epatocarcinoma sono riconosciuti correttamente dal modello dobbiamo guardare la Specificità (vedi paragrafi 4.2.1 e 4.2.2). Il modello Random Forest ha un'accuratezza di 0,6770 (F1 score: 0,7205) nel classificare correttamente un paziente tra i due gruppi (Se: 0,7283; Sp: 0,6087; AUC: 0,7027), mentre il modello Random Ferns di 0,7143 (F1 score: 0,7326; Se: 0,6848; Sp: 0,7536). Durante la costruzione di questi modelli è stata analizzata l'importanza delle singole variabili nel predire l'*outcome* dei pazienti. In particolare il modello ha considerato come maggiormente discriminanti α FP ed età, di cui ci aspettavamo l'importanza discriminatoria, ma anche BMI e SCCA-IgM, che non erano risultate significative all'analisi univariata. La γ -GT, significativa nell'analisi univariata, non è invece risultata di spessore nella corretta classificazione del paziente. Tuttavia una considerazione che è doveroso fare è che i due modelli appena descritti non predicono la probabilità di sviluppare epatocarcinoma, bensì quella di averlo in questo momento. È corretto dunque parlare di un algoritmo *machine learning* con finalità classificative diagnostiche piuttosto che predittive del rischio. Se confrontiamo il modello Random Ferns (Sp:75%) con una meta-analisi del 2018 sulle prestazioni delle attuali metodiche di screening, vediamo che la capacità di individuare i pazienti affetti da epatocarcinoma non si discosta di molto dalla sensibilità della sola ecografia nel (Se:84%)(226). Se operiamo invece un confronto con uno screening effettuato mediante ecografia del fegato e α FP (Se: 94%), notiamo che il nostro modello è nettamente inferiore(226). Per quanto riguarda invece gli algoritmi di *machine learning* addestrati utilizzando i campioni di pazienti affetti da cirrosi epatica evolutiva e cirrosi epatica non evolutiva, possiamo affermare che sono dei reali classificatori di predizione del rischio. I primi due modelli testati, Random Forest e il Random Ferns, non si sono dimostrati capaci, da soli, di predire in modo efficace il rischio di evoluzione. Il modello Random Forest ha mostrato un'accuratezza di 0,5000 e, in questo caso, il modello ha assegnato un maggior peso alle variabili AST, ALT, α FP, γ -GT e SCCA-IgM nella corretta collocazione del paziente nelle due diverse classi. Il modello Random Ferns ha mostrato invece risultati diametralmente opposti, avendo questo modello un'accuratezza massimale (Acc: 1,0; F1 score: 1,0). Il fatto che si sia dimostrato così performante lascia intendere il

sovra-adattamento ai dati utilizzati per il suo addestramento e quindi l'impossibilità di una sua applicazione nell'attribuzione del rischio in un'altra popolazione. Il modello costruito secondo approccio Ensemble ha dimostrato invece di avere buone potenzialità. Durante la fase di addestramento l'accuratezza del modello è risultata massimale (1,0). Considerando la *v-fold cross validation* ($v: 20$) utilizzata per minimizzare l'*overfitting* del modello abbiamo ritenuto il modello efficace. La validazione esterna, portata avanti sul campione di pazienti affetti da sola cirrosi epatica, ha supportato tuttavia le capacità del modello di predire l'*outcome* dei pazienti nonostante la numerosità campionaria ridotta. In particolare abbiamo testato la specificità del modello, in quanto la popolazione di pazienti usati per la validazione era una popolazione di soggetti affetti da cirrosi epatica, seguiti per un follow-up massimo di 5 anni e senza eventi di natura neoplastica (vedi paragrafo 4.1.4). La validazione esterna ha di fatto confermato le potenzialità del modello: su 92 pazienti testati, 77 sono stati correttamente identificati come non a rischio di evoluzione (Sp: 83,7%). Nella tabella XLVII è riportato un confronto tra i risultati della nostra validazione esterna, con la validazione esterna effettuata da Singal et al e Nam et al. Rispetto ad altri algoritmi di *machine learning*, quello da noi creato è stato addestrato e validato con corti di pazienti decisamente ridotte. Ad esempio lo studio di An et al ha sfruttato ben 331.694 pazienti per addestrare il modello, di cui 1.799 hanno sviluppato epatocarcinoma durante il follow-up (cirrosi epatica evolutiva)(225). Singal et al hanno invece validato il loro modello su una corte di 1.050 pazienti, ben più ampia dei nostri 92 pazienti.

| Autore, anno | Validazione esterna (affetti da epatocarcinoma/totale dei pazienti testati) | Parametri di |
|---------------------------|---|---------------------|
| Singal AG, 2013 | 88/1.050 | Se: 80,5% Sp: 46,8% |
| Nam JY, 2020 | 68/316 | c-Statistics: 0,782 |
| Superlearner, 2022 | 0/92 | Sp: 83,7% |

Tabella XLVII. Studi selezionati che hanno utilizzato l'intelligenza artificiale per predire lo sviluppo di epatocarcinoma nei soggetti affetti da cirrosi epatica.

5.4 Rilevanza del biomarcatore SCCA-IgM

La letteratura dimostra la capacità di SCCA-IgM di discriminare tra pazienti affetti da sola cirrosi epatica e quelli affetti anche da epatocarcinoma: uno studio iniziale aveva dimostrato che esiste una differenza statisticamente significativa tra i valori

di SCCA-IgM tra i pazienti affetti da sola cirrosi epatica e quelli affetti anche da epatocarcinoma(203). Studi più recenti hanno inoltre documentato che non solo SCCA-IgM è in grado di predire lo sviluppo di epatocarcinoma nei pazienti affetti da cirrosi, ma anche il rischio di complicanze e la conseguente ridotta sopravvivenza dei pazienti positivi per questo biomarcatore(204,205). Nello studio oggetto della tesi è stato dimostrato come modelli di *machine learning* supportino i risultati precedentemente descritti. Il modello Random Forest, creato utilizzando il set di pazienti con sola cirrosi epatica e quello di pazienti con epatocarcinoma, ha infatti assegnato un peso molto elevato a SCCA-IgM nel guidare l'algoritmo alla corretta classificazione del paziente. Il biomarcatore è risultato terzo per importanza, più impattante ad esempio dell'età, che aveva dimostrato una differenza significativa all'analisi univariata. Anche il secondo modello Random Forest, costruito sui dati di pazienti con cirrosi evolutiva e non evolutiva, assegna a SCCA-IgM una importanza rilevante, considerandolo tra le cinque variabili più impattanti sulla classificazione del paziente. Per quanto riguarda il *superlearner* ottenuto mediante approccio *Ensemble* è più complicato andare a valutare l'impatto del biomarcatore SCCA-IgM: ogni modello che compone l'algoritmo pesa indipendentemente dagli altri ciascuna variabile, SCCA-IgM compresa. Inoltre ciascuna variabile è sostanziale, vista la pochezza di unità statistiche, per migliorare al massimo le performance dell'algoritmo. Per poter operare una selezione delle variabili e capire realmente l'impatto del nostro biomarcatore sarebbe necessario addestrare i modelli con campioni più numerosi.

5.5 Prospettive future

I modelli basati su algoritmi di *machine learning* possono essere applicati a vari aspetti della gestione clinica dei pazienti affetti da cirrosi epatica. Ad esempio i modelli Random Forest e Random Ferns in grado di classificare i pazienti in "affetti da sola cirrosi epatica" ed in "affetti da epatocarcinoma insorto su cirrosi epatica" potrebbero trovare applicazione nell'algoritmo di screening per epatocarcinoma. In particolare potrebbero essere utilizzate in presenza di lesioni non dirimenti con le metodiche di imaging, per decidere quali pazienti sottoporre a biopsia epatica. Il modello basato sull'approccio *Ensemble* invece potrebbe trovare applicazione nella personalizzazione del programma di screening. In particolare, data la sua capacità di stratificare i pazienti in base al rischio di sviluppo di epatocarcinoma, potrebbe

essere utilizzato per decidere la durata dell'intervallo di screening, con tempi più lunghi laddove il rischio dovesse essere basso o riducendo miratamente il tempo di intervallo laddove il rischio dovesse risultare elevato. Questa modalità personalizzata andrebbe non solo a beneficio dei pazienti, ma ridurrebbe anche i costi sanitari. Qualora si rendano disponibili farmaci biologici diretti verso molecole che favoriscono lo sviluppo dell'epatocarcinoma, questi algoritmi potrebbero essere utilizzati anche per individuare i pazienti eleggibili al trattamento. Tuttavia, prima che tali applicazioni diventino parte della pratica clinica, è necessario ottenere ulteriori evidenze. In particolare sarebbe necessario addestrare e validare i modelli con campioni più numerosi, al fine di limitare l'*overfitting* del modello e di poter eliminare le variabili che si dimostrano meno determinanti nella corretta classificazione dei pazienti.

Capitolo 6 - Conclusioni

Gli algoritmi utilizzati in questo studio hanno permesso di creare innovativi modelli per la diagnosi di epatocarcinoma e per la prognosi dei pazienti affetti da cirrosi epatica. Questi sfruttano caratteristiche cliniche e variabili laboratoristiche che permettono una valutazione d'insieme del singolo paziente. In questo senso tali modelli rientrano in quello che è l'ormai accettato concetto di medicina personalizzata. Essi inoltre hanno permesso di corroborare l'importanza di SCCA-IgM nel contesto della malattia epatica cronica e dell'epatocarcinoma. Ad oggi sappiamo infatti che SerpinB3 non solo incrementa lo sviluppo della fibrosi, favorendo le complicanze legate all'ipertensione portale, ma impatta anche su aspetti fondamentali della carcinogenesi quali la proliferazione cellulare, la resistenza all'apoptosi e le capacità infiltrative delle lesioni neoplastiche. I modelli creati hanno permesso di mettere in luce che la molecola, presente istologicamente a livello della singola cellula neoplastica e come immunocomplesso a livello sierologico, potrebbe essere determinante nella gestione clinica dei pazienti affetti da cirrosi epatica.

Bibliografia

1. Global Burden of Disease Liver Cancer Collaboration, Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* 1 dicembre 2017;3(12):1683–91.
2. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol.* gennaio 2019;70(1):151–71.
3. Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, et al. 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.* 17 ottobre 2020;396(10258):1204–22.
4. Ginès P, Krag A, Abraldes JG, Solà E, Fabrellas N, Kamath PS. Liver cirrhosis. *Lancet Lond Engl.* 9 ottobre 2021;398(10308):1359–76.
5. Pose E, Pera G, Torán P, Gratacós-Ginès J, Avitabile E, Expósito C, et al. Interaction between metabolic syndrome and alcohol consumption, risk factors of liver fibrosis: A population-based study. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* luglio 2021;41(7):1556–64.
6. Israelsen M, Juel HB, Detlefsen S, Madsen BS, Rasmussen DN, Larsen TR, et al. Metabolic and Genetic Risk Factors Are the Strongest Predictors of Severity of Alcohol-Related Liver Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 4 dicembre 2020;S1542-3565(20)31628-1.
7. Mavilia MG, Wu GY. HBV-HCV Coinfection: Viral Interactions, Management, and Viral Reactivation. *J Clin Transl Hepatol.* 28 settembre 2018;6(3):296–305.
8. GBD 2016 Alcohol Collaborators. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Lond Engl.* 22 settembre 2018;392(10152):1015–35.
9. Wood AM, Kaptoge S, Butterworth AS, Willeit P, Warnakula S, Bolton T, et al. Risk thresholds for alcohol consumption: combined analysis of individual-participant data for 599 912 current drinkers in 83 prospective studies. *Lancet Lond Engl.* 14 aprile 2018;391(10129):1513–23.
10. Simpson RF, Hermon C, Liu B, Green J, Reeves GK, Beral V, et al. Alcohol drinking patterns and liver cirrhosis risk: analysis of the prospective UK Million Women Study. *Lancet Public Health.* gennaio 2019;4(1):e41–8.
11. Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* giugno 2018;3(6):383–403.
12. Tang LSY, Covert E, Wilson E, Kottlilil S. Chronic Hepatitis B Infection: A Review. *JAMA.* 1 maggio 2018;319(17):1802–13.

-
13. Poh Z, Goh BBG, Chang PEJ, Tan CK. Rates of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and the role of surveillance: a 10-year follow-up of 673 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* giugno 2015;27(6):638–43.
 14. Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis.* febbraio 2003;23(1):47–58.
 15. Thrift AP, El-Serag HB, Kanwal F. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* febbraio 2017;14(2):122–32.
 16. Platt L, Easterbrook P, Gower E, McDonald B, Sabin K, McGowan C, et al. Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: a global systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* luglio 2016;16(7):797–808.
 17. 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.* luglio 2016;64(1):73–84.
 18. Carlsson B, Lindén D, Brolén G, Liljeblad M, Bjursell M, Romeo S, et al. Review article: the emerging role of genetics in precision medicine for patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* giugno 2020;51(12):1305–20.
 19. Abul-Husn NS, Cheng X, Li AH, Xin Y, Schurmann C, Stevis P, et al. A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease. *N Engl J Med.* 22 marzo 2018;378(12):1096–106.
 20. Eslam M, Sanyal AJ, George J, International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* maggio 2020;158(7):1999–2014.e1.
 21. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* gennaio 2018;15(1):11–20.
 22. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and Outcomes of Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology.* 1 ottobre 2011;141(4):1249–53.
 23. Tschumperlin DJ, Ligresti G, Hilscher MB, Shah VH. Mechanosensing and fibrosis. *J Clin Invest.* 2 gennaio 2018;128(1):74–84.
 24. Wanless IR. The Role of Vascular Injury and Congestion in the Pathogenesis of Cirrhosis: the Congestive Escalator and the Parenchymal Extinction Sequence. *Curr Hepatol Rep.* 1 marzo 2020;19(1):40–53.
 25. Garcia-Tsao G, Bosch J. Management of varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *N Engl J Med.* 4 marzo 2010;362(9):823–32.

-
26. Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, Grace N, Burroughs A, Planas R, et al. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology*. agosto 2007;133(2):481–8.
 27. Bhathal PS, Grossman HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol*. 1985;1(4):325–37.
 28. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatol Baltim Md*. febbraio 2002;35(2):478–91.
 29. McAvoy NC, Semple S, Richards JM, Robson AJ, Patel D, Jardine AGM, et al. Differential visceral blood flow in the hyperdynamic circulation of patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. maggio 2016;43(9):947–54.
 30. Martin PY, Ginès P, Schrier RW. Nitric oxide as a mediator of hemodynamic abnormalities and sodium and water retention in cirrhosis. *N Engl J Med*. 20 agosto 1998;339(8):533–41.
 31. Arroyo V, Angeli P, Moreau R, Jalan R, Clària J, Trebicka J, et al. The systemic inflammation hypothesis: Towards a new paradigm of acute decompensation and multiorgan failure in cirrhosis. *J Hepatol*. marzo 2021;74(3):670–85.
 32. Solé C, Guilly S, Da Silva K, Llopis M, Le-Chatelier E, Huelin P, et al. Alterations in Gut Microbiome in Cirrhosis as Assessed by Quantitative Metagenomics: Relationship With Acute-on-Chronic Liver Failure and Prognosis. *Gastroenterology*. gennaio 2021;160(1):206-218.e13.
 33. Acharya C, Bajaj JS. Chronic Liver Diseases and the Microbiome-Translating Our Knowledge of Gut Microbiota to Management of Chronic Liver Disease. *Gastroenterology*. gennaio 2021;160(2):556–72.
 34. Balmer ML, Slack E, de Gottardi A, Lawson MAE, Hapfelmeier S, Miele L, et al. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci Transl Med*. 21 maggio 2014;6(237):237ra66.
 35. Jalan R, Fernandez J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P, et al. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol*. giugno 2014;60(6):1310–24.
 36. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol*. maggio 2014;60(5):940–7.
 37. Li CP, Lee FY, Hwang SJ, Lu RH, Lee WP, Chao Y, et al. Spider angiomas in patients with liver cirrhosis: role of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *World J Gastroenterol*. dicembre 2003;9(12):2832–5.
 38. Yoshitsugu M, Ihori M. [Endocrine disturbances in liver cirrhosis--focused on sex hormones]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med*. novembre 1997;55(11):3002–6.
 39. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu, European Association for the Study of the Liver. EASL

-
- Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol.* agosto 2018;69(2):406–60.
40. Ginés P, Quintero E, Arroyo V, Terés J, Bruguera M, Rimola A, et al. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatol Baltim Md.* febbraio 1987;7(1):122–8.
 41. Runyon BA, Montano AA, Akriviadis EA, Antillon MR, Irving MA, McHutchison JG. The Serum-Ascites Albumin Gradient Is Superior to the Exudate-Transudate Concept in the Differential Diagnosis of Ascites. *Ann Intern Med.* agosto 1992;117(3):215–20.
 42. Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, et al. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatol Baltim Md.* luglio 2003;38(1):258–66.
 43. Jameson et al. – HARRISON Principi di Medicina interna, 20E [Internet]. [citato 9 giugno 2022]. Disponibile su: <https://online.universita.zanichelli.it/harrison-principi20e/>
 44. Piano S, Fasolato S, Salinas F, Romano A, Tonon M, Morando F, et al. The empirical antibiotic treatment of nosocomial spontaneous bacterial peritonitis: Results of a randomized, controlled clinical trial. *Hepatol Baltim Md.* aprile 2016;63(4):1299–309.
 45. Piano S, Singh V, Caraceni P, Maiwall R, Alessandria C, Fernandez J, et al. Epidemiology and Effects of Bacterial Infections in Patients With Cirrhosis Worldwide. *Gastroenterology.* aprile 2019;156(5):1368-1380.e10.
 46. Piano S, Brocca A, Mareso S, Angeli P. Infections complicating cirrhosis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* febbraio 2018;38 Suppl 1:126–33.
 47. Arroyo V, Moreau R, Jalan R. Acute-on-Chronic Liver Failure. *N Engl J Med.* 28 maggio 2020;382(22):2137–45.
 48. Groszmann RJ, Bosch J, Grace ND, Conn HO, Garcia-Tsao G, Navasa M, et al. Hemodynamic events in a prospective randomized trial of propranolol versus placebo in the prevention of a first variceal hemorrhage. *Gastroenterology.* novembre 1990;99(5):1401–7.
 49. American Association for the Study of Liver Diseases, European Association for the Study of the Liver. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the European Association for the Study of the Liver and the American Association for the Study of Liver Diseases. *J Hepatol.* settembre 2014;61(3):642–59.
 50. Campagna F, Montagnese S, Ridola L, Senzolo M, Schiff S, De Rui M, et al. The animal naming test: An easy tool for the assessment of hepatic encephalopathy. *Hepatol Baltim Md.* luglio 2017;66(1):198–208.
 51. Rose CF, Amodio P, Bajaj JS, Dhiman RK, Montagnese S, Taylor-Robinson SD, et al. Hepatic encephalopathy: Novel insights into classification, pathophysiology and therapy. *J Hepatol.* 1 dicembre 2020;73(6):1526–47.

-
52. Fabrellas N, Moreira R, Carol M, Cervera M, de Prada G, Perez M, et al. Psychological Burden of Hepatic Encephalopathy on Patients and Caregivers. *Clin Transl Gastroenterol.* aprile 2020;11(4):e00159.
 53. Roy L, Legault L, Pomier-Layrargues G. Glomerular filtration rate measurement in cirrhotic patients with renal failure. *Clin Nephrol.* dicembre 1998;50(6):342–6.
 54. Francoz C, Nadim MK, Baron A, Prié D, Antoine C, Belghiti J, et al. Glomerular filtration rate equations for liver-kidney transplantation in patients with cirrhosis: Validation of current recommendations. *Hepatology.* 2014;59(4):1514–21.
 55. Scopus - Document details - Estimation of glomerular filtration rates before and after orthotopic liver transplantation: Evaluation of current equations [Internet]. [citato 5 giugno 2022]. Disponibile su: https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-1242329504&origin=inward&featureToggles=FEATURE_NEW_DOC_DETAILS_EXP ORT:1
 56. Khwaja A. KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury. *Nephron Clin Pract.* 2012;120(4):c179–84.
 57. Arroyo V, Gines P, Gerbes A, Dudley F, Gentilini P, Laffi G, et al. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Hepatology.* 1 gennaio 1996;23(1):164–76.
 58. Salerno F, Gerbes A, Ginès P, Wong F, Arroyo V. Diagnosis, prevention and treatment of hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Gut.* settembre 2007;56(9):1310–8.
 59. Tsochatzis EA, Gurusamy KS, Ntaoula S, Cholongitas E, Davidson BR, Burroughs AK. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: a meta-analysis of diagnostic accuracy. *J Hepatol.* aprile 2011;54(4):650–9.
 60. Emerging non-invasive approaches for diagnosis and monitoring of portal hypertension | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [citato 5 giugno 2022]. Disponibile su: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2468125318302322?token=A421F8B01841DEAB192ADE8D05DCFAF34FD005E9CC23D634C2E9A63FF532917F371EA7F190B77D919D57D3CD271C091&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220605173053>
 61. D’Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol.* gennaio 2006;44(1):217–31.
 62. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* agosto 1973;60(8):646–9.
 63. Cholongitas E, Papatheodoridis GV, Vangeli M, Terreni N, Patch D, Burroughs AK. Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh’s classification for assessing prognosis in cirrhosis? *Aliment Pharmacol Ther.* dicembre 2005;22(11–12):1079–89.

-
64. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* Baltim Md. febbraio 2001;33(2):464–70.
 65. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. gennaio 2003;124(1):91–6.
 66. Kim WR, Biggins SW, Kremers WK, Wiesner RH, Kamath PS, Benson JT, et al. Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list. *N Engl J Med*. 4 settembre 2008;359(10):1018–26.
 67. Merion RM, Schaubel DE, Dykstra DM, Freeman RB, Port FK, Wolfe RA. The survival benefit of liver transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. febbraio 2005;5(2):307–13.
 68. Ps K, Wr K. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology* Baltim Md [Internet]. marzo 2007 [citato 16 aprile 2022];45(3). Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17326206/>
 69. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primer*. 21 gennaio 2021;7(1):6.
 70. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 11 aprile 2019;380(15):1450–62.
 71. Ringelhan M, Pfister D, O'Connor T, Pikarsky E, Heikenwalder M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol*. marzo 2018;19(3):222–32.
 72. Schulze K, Nault JC, Villanueva A. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J Hepatol*. novembre 2016;65(5):1031–42.
 73. Cancer today [Internet]. [citato 31 marzo 2022]. Disponibile su: <http://gco.iarc.fr/today/home>
 74. McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis*. maggio 2015;19(2):223–38.
 75. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 1 giugno 2014;74(11):2913–21.
 76. EpiCentro. Registri Tumori in Italia [Internet]. [citato 31 marzo 2022]. Disponibile su: <https://www.epicentro.iss.it/tumori/registri>
 77. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu, European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. luglio 2018;69(1):182–236.
 78. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, et al. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance

-
- by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* Baltim Md. agosto 2018;68(2):723–50.
79. Dyson J, Jaques B, Chattopadhyay D, Lochan R, Graham J, Das D, et al. Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J Hepatol*. gennaio 2014;60(1):110–7.
 80. Kanwal F, Kramer JR, Duan Z, Yu X, White D, El-Serag HB. Trends in the Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a United States Cohort of Veterans. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. febbraio 2016;14(2):301-308.e1-2.
 81. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. novembre 2004;127(5 Suppl 1):S87-96.
 82. Jepsen P, Ott P, Andersen PK, Sørensen HT, Vilstrup H. Risk for hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis: a Danish nationwide cohort study. *Ann Intern Med*. 19 giugno 2012;156(12):841–7, W295.
 83. Lin CW, Lin CC, Mo LR, Chang CY, Perng DS, Hsu CC, et al. Heavy alcohol consumption increases the incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-related cirrhosis. *J Hepatol*. aprile 2013;58(4):730–5.
 84. Bhattacharya R, Shuhart MC. Hepatitis C and alcohol: interactions, outcomes, and implications. *J Clin Gastroenterol*. marzo 2003;36(3):242–52.
 85. Kao JH. Hepatitis B vaccination and prevention of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. dicembre 2015;29(6):907–17.
 86. Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lai MW, Wu TC, et al. Long-term Effects of Hepatitis B Immunization of Infants in Preventing Liver Cancer. *Gastroenterology*. settembre 2016;151(3):472-480.e1.
 87. Papatheodoridis GV, Chan HLY, Hansen BE, Janssen HLA, Lampertico P. Risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: assessment and modification with current antiviral therapy. *J Hepatol*. aprile 2015;62(4):956–67.
 88. Wang J, Chenivesse X, Henglein B, Bréchet C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature*. 8 febbraio 1990;343(6258):555–7.
 89. Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, You SL, Lu SN, Wang LY, et al. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology*. maggio 2010;138(5):1747–54.
 90. Paterlini-Bréchet P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*. 19 giugno 2003;22(25):3911–6.
 91. Kew MC. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. dicembre 2003;23(6):405–9.

-
92. The oncogenic role of hepatitis delta virus in hepatocellular carcinoma - PubMed [Internet]. [citato 31 marzo 2022]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32039360/>
 93. Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents - PubMed [Internet]. [citato 31 marzo 2022]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28642197/>
 94. Bertuccio P, Turati F, Carioli G, Rodriguez T, La Vecchia C, Malvezzi M, et al. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality. *J Hepatol*. agosto 2017;67(2):302–9.
 95. Singal AK, Singh A, Jaganmohan S, Guturu P, Mummadi R, Kuo YF, et al. Antiviral therapy reduces risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. febbraio 2010;8(2):192–9.
 96. 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: a meta-analysis of observational studies. *Ann Intern Med*. 5 marzo 2013;158(5 Pt 1):329–37.
 97. Ioannou GN, Beste LA, Green PK, Singal AG, Tapper EB, Waljee AK, et al. Increased Risk for Hepatocellular Carcinoma Persists Up to 10 Years After HCV Eradication in Patients With Baseline Cirrhosis or High FIB-4 Scores. *Gastroenterology*. novembre 2019;157(5):1264-1278.e4.
 98. Ioannou GN, Bryson CL, Weiss NS, Miller R, Scott JD, Boyko EJ. The prevalence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with human immunodeficiency virus infection. *Hepatol Baltim Md*. gennaio 2013;57(1):249–57.
 99. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatol Baltim Md*. gennaio 2018;67(1):123–33.
 100. Degasperi E, Colombo M. Distinctive features of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. ottobre 2016;1(2):156–64.
 101. Schlesinger S, Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, Fedirko V, Trepo E, et al. Diabetes mellitus, insulin treatment, diabetes duration, and risk of biliary tract cancer and hepatocellular carcinoma in a European cohort. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. settembre 2013;24(9):2449–55.
 102. Tsilidis KK, Kasimis JC, Lopez DS, Ntzani EE, Ioannidis JPA. Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies. *BMJ*. 2 gennaio 2015;350:g7607.
 103. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 24 aprile 2003;348(17):1625–38.
 104. Li WQ, Park Y, McGlynn KA, Hollenbeck AR, Taylor PR, Goldstein AM, et al. Index-based dietary patterns and risk of incident hepatocellular carcinoma and

-
- mortality from chronic liver disease in a prospective study. *Hepatology* Baltim Md. agosto 2014;60(2):588–97.
105. Rich NE, Yopp AC, Singal AG, Murphy CC. Hepatocellular Carcinoma Incidence Is Decreasing Among Younger Adults in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* gennaio 2020;18(1):242-248.e5.
 106. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* novembre 2018;68(6):394–424.
 107. Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology.* marzo 2017;152(4):745–61.
 108. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 6 maggio 2012;44(6):694–8.
 109. Wang JS, Groopman JD. DNA damage by mycotoxins. *Mutat Res.* 8 marzo 1999;424(1–2):167–81.
 110. Bayard Q, Meunier L, Peneau C, Renault V, Shinde J, Nault JC, et al. Cyclin A2/E1 activation defines a hepatocellular carcinoma subclass with a rearrangement signature of replication stress. *Nat Commun.* 7 dicembre 2018;9(1):5235.
 111. Hyman DM, Taylor BS, Baselga J. Implementing Genome-Driven Oncology. *Cell.* 9 febbraio 2017;168(4):584–99.
 112. Llovet JM, Montal R, Sia D, Finn RS. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol.* ottobre 2018;15(10):599–616.
 113. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* ottobre 2015;149(5):1226-1239.e4.
 114. Rebouissou S, Nault JC. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* febbraio 2020;72(2):215–29.
 115. Calderaro J, Ziol M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *J Hepatol.* settembre 2019;71(3):616–30.
 116. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: wheeler@bcm.edu, Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell.* 15 giugno 2017;169(7):1327-1341.e23.
 117. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med.* aprile 2006;12(4):410–6.

-
118. Sia D, Jiao Y, Martinez-Quetglas I, Kuchuk O, Villacorta-Martin C, Castro de Moura M, et al. Identification of an Immune-specific Class of Hepatocellular Carcinoma, Based on Molecular Features. *Gastroenterology*. settembre 2017;153(3):812–26.
 119. Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis*. febbraio 2010;30(1):35–51.
 120. Hoshida Y, Nijman SMB, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 15 settembre 2009;69(18):7385–92.
 121. SERPINB3 is associated with TGF- β 1 and cytoplasmic β -catenin expression in hepatocellular carcinomas with poor prognosis - PubMed [Internet]. [citato 4 aprile 2022]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24809782/>
 122. Singal AG, Lampertico P, Nahon P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *J Hepatol*. febbraio 2020;72(2):250–61.
 123. Papatheodoridis G, Dalekos G, Sypsa V, Yurdaydin C, Buti M, Goulis J, et al. PAGE-B predicts the risk of developing hepatocellular carcinoma in Caucasians with chronic hepatitis B on 5-year antiviral therapy. *J Hepatol*. aprile 2016;64(4):800–6.
 124. Kaltenbach TEM, Engler P, Kratzer W, Oeztuerk S, Seufferlein T, Haenle MM, et al. Prevalence of benign focal liver lesions: ultrasound investigation of 45,319 hospital patients. *Abdom Radiol N Y*. gennaio 2016;41(1):25–32.
 125. Singal A, Volk ML, Waljee A, Salgia R, Higgins P, Rogers M a. M, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. luglio 2009;30(1):37–47.
 126. Singal AG, Nehra M, Adams-Huet B, Yopp AC, Tiro JA, Marrero JA, et al. Detection of hepatocellular carcinoma at advanced stages among patients in the HALT-C trial: where did surveillance fail? *Am J Gastroenterol*. marzo 2013;108(3):425–32.
 127. Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Solé M, Ayuso JR, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Baltim Md*. gennaio 2008;47(1):97–104.
 128. Sangiovanni A, Manini MA, Iavarone M, Romeo R, Forzenigo LV, Fraquelli M, et al. The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Gut*. maggio 2010;59(5):638–44.
 129. Leoni S, Piscaglia F, Golfieri R, Camaggi V, Vidili G, Pini P, et al. The impact of vascular and nonvascular findings on the noninvasive diagnosis of small hepatocellular carcinoma based on the EASL and AASLD criteria. *Am J Gastroenterol*. marzo 2010;105(3):599–609.

-
130. Khalili K, Kim TK, Jang HJ, Haider MA, Khan L, Guindi M, et al. Optimization of imaging diagnosis of 1-2 cm hepatocellular carcinoma: an analysis of diagnostic performance and resource utilization. *J Hepatol.* aprile 2011;54(4):723–8.
 131. Shinmura R, Matsui O, Kobayashi S, Terayama N, Sanada J, Ueda K, et al. Cirrhotic nodules: association between MR imaging signal intensity and intranodular blood supply. *Radiology.* novembre 2005;237(2):512–9.
 132. Rimola J, Forner A, Tremosini S, Reig M, Vilana R, Bianchi L, et al. Non-invasive diagnosis of hepatocellular carcinoma \leq 2 cm in cirrhosis. Diagnostic accuracy assessing fat, capsule and signal intensity at dynamic MRI. *J Hepatol.* giugno 2012;56(6):1317–23.
 133. Piana G, Trinquart L, Meskine N, Barrau V, Beers BV, Vilgrain V. New MR imaging criteria with a diffusion-weighted sequence for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in chronic liver diseases. *J Hepatol.* luglio 2011;55(1):126–32.
 134. International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatol Baltim Md.* febbraio 2009;49(2):658–64.
 135. Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatol Baltim Md.* marzo 2011;53(3):1020–2.
 136. European Association For The Study Of The Liver, European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* aprile 2012;56(4):908–43.
 137. Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* luglio 2004;130(7):417–22.
 138. Poustchi H, Farrell GC, Strasser SI, Lee AU, McCaughan GW, George J. Feasibility of conducting a randomized control trial for liver cancer screening: is a randomized controlled trial for liver cancer screening feasible or still needed? *Hepatol Baltim Md.* dicembre 2011;54(6):1998–2004.
 139. Andersson KL, Salomon JA, Goldie SJ, Chung RT. Cost effectiveness of alternative surveillance strategies for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* dicembre 2008;6(12):1418–24.
 140. Santi V, Trevisani F, Gramenzi A, Grignaschi A, Mirici-Cappa F, Del Poggio P, et al. Semiannual surveillance is superior to annual surveillance for the detection of early hepatocellular carcinoma and patient survival. *J Hepatol.* agosto 2010;53(2):291–7.
 141. Trinchet JC, Chaffaut C, Bourcier V, Degos F, Henrion J, Fontaine H, et al. Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatol Baltim Md.* dicembre 2011;54(6):1987–97.

-
142. Marrero JA, Feng Z, Wang Y, Nguyen MH, Befeler AS, Roberts LR, et al. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. luglio 2009;137(1):110–8.
 143. Zhang B, Yang B. Combined alpha fetoprotein testing and ultrasonography as a screening test for primary liver cancer. *J Med Screen*. 1999;6(2):108–10.
 144. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet Lond Engl*. 31 marzo 2018;391(10127):1301–14.
 145. Li D, Mallory T, Satomura S. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. novembre 2001;313(1–2):15–9.
 146. Yi X, Yu S, Bao Y. Alpha-fetoprotein-L3 in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 21 ottobre 2013;425:212–20.
 147. Oda K, Ido A, Tamai T, Matsushita M, Kumagai K, Mawatari S ichi, et al. Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Oncol Rep*. novembre 2011;26(5):1227–33.
 148. Bertino G, Arditi AM, Boemi PM, Ierna D, Interlandi D, Caruso L, et al. A study about mechanisms of des-gamma-carboxy prothrombin's production in hepatocellular carcinoma. *Panminerva Med*. settembre 2008;50(3):221–6.
 149. Lok AS, Sterling RK, Everhart JE, Wright EC, Hoefs JC, Di Bisceglie AM, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. febbraio 2010;138(2):493–502.
 150. Jiao C, Cui L, Piao J, Qi Y, Yu Z. Clinical significance and expression of serum Golgi protein 73 in primary hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Ther*. dicembre 2018;14(6):1239–44.
 151. Dai M, Chen X, Liu X, Peng Z, Meng J, Dai S. Diagnostic Value of the Combination of Golgi Protein 73 and Alpha-Fetoprotein in Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 6 ottobre 2015;10(10):e0140067.
 152. Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [citato 9 giugno 2022]. Disponibile su: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2352304220300222?token=3BD6E4EBB98121F029A93EE6BC00C7BA5BF2B77F36593B4166314A5BD20BAD5A5433C423521102040DF4147E1EB80349&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220609140856>
 153. Berhane S, Toyoda H, Tada T, Kumada T, Kagebayashi C, Satomura S, et al. Role of the GALAD and BALAD-2 Serologic Models in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma and Prediction of Survival in Patients. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. giugno 2016;14(6):875–886.e6.

-
154. Schotten C, Ostertag B, Sowa JP, Manka P, Bechmann LP, Hilgard G, et al. GALAD Score Detects Early-Stage Hepatocellular Carcinoma in a European Cohort of Chronic Hepatitis B and C Patients. *Pharm Basel Switz.* 27 luglio 2021;14(8):735.
 155. Yang JD, Addissie BD, Mara KC, Harmsen WS, Dai J, Zhang N, et al. GALAD Score for Hepatocellular Carcinoma Detection in Comparison with Liver Ultrasound and Proposal of GALADUS Score. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* marzo 2019;28(3):531–8.
 156. Tayob N, Kanwal F, Alsarraj A, Hernaez R, El-Serag HB. The Performance of AFP, AFP-3, DCP as Biomarkers for Detection of Hepatocellular Carcinoma (HCC): A Phase 3 Biomarker Study in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 3 febbraio 2022;S1542-3565(22)00106-9.
 157. Sachan A, Kushwah S. Letter to the editor: GALAD score: Superior surveillance strategy or not? *Hepatology* [Internet]. [citato 9 giugno 2022];n/a(n/a). Disponibile su: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.32464>
 158. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999;19(3):329–38.
 159. Suminami Y, Kishi F, Sekiguchi K, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 27 novembre 1991;181(1):51–8.
 160. Kato H. Expression and function of squamous cell carcinoma antigen. *Anticancer Res.* agosto 1996;16(4B):2149–53.
 161. Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 10 giugno 1994;269(23):15957–60.
 162. Belin D, Wohlwend A, Schleuning WD, Kruithof EK, Vassalli JD. Facultative polypeptide translocation allows a single mRNA to encode the secreted and cytosolic forms of plasminogen activators inhibitor 2. *EMBO J.* novembre 1989;8(11):3287–94.
 163. Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer.* ottobre 1977;40(4):1621–8.
 164. Sun Y, Sheshadri N, Zong WX. SERPINB3 and B4: from biochemistry to biology. *Semin Cell Dev Biol.* febbraio 2017;62:170–7.
 165. Yang D, Wang J, Zhang L. Serum SCCA levels in patients suffering cancers or other diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2019;162:165–75.
 166. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* 7 settembre 2001;276(36):33293–6.
 167. Pontisso P. Role of SERPINB3 in hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol.* dicembre 2014;13(6):722–7.

-
168. Guido M, Roskams T, Pontisso P, Fassan M, Thung SN, Giacomelli L, et al. Squamous cell carcinoma antigen in human liver carcinogenesis. *J Clin Pathol*. aprile 2008;61(4):445–7.
 169. Pontisso P, Calabrese F, Benvegnù L, Lise M, Belluco C, Ruvoletto MG, et al. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 23 febbraio 2004;90(4):833–7.
 170. Suminami Y, Nagashima S, Vujanovic NL, Hirabayashi K, Kato H, Whiteside TL. Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Br J Cancer*. febbraio 2000;82(4):981–9.
 171. Takeda A, Kajiya A, Iwasawa A, Nakamura Y, Hibino T. Aberrant expression of serpin squamous cell carcinoma antigen 2 in human tumor tissues and cell lines: evidence of protection from tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Biol Chem*. agosto 2002;383(7–8):1231–6.
 172. Cannito S, Turato C, Paternostro C, Biasiolo A, Colombatto S, Cambieri I, et al. Hypoxia up-regulates SERPINB3 through HIF-2 α in human liver cancer cells. *Oncotarget*. 10 febbraio 2015;6(4):2206–21.
 173. Turato C, Kent P, Sebastiani G, Cannito S, Morello E, Terrin L, et al. Serpinb3 is overexpressed in the liver in presence of iron overload. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. gennaio 2018;66(1):32–8.
 174. SERPINB3 protects from oxidative damage by chemotherapeutics through inhibition of mitochondrial respiratory complex I - PubMed [Internet]. [citato 4 aprile 2022]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24810714/>
 175. Katagiri C, Nakanishi J, Kadoya K, Hibino T. Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-JUN NH2-terminal kinase. *J Cell Biol*. 27 marzo 2006;172(7):983–90.
 176. Murakami A, Suminami Y, Hirakawa H, Nawata S, Numa F, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death. *Br J Cancer*. 23 marzo 2001;84(6):851–8.
 177. Quarta S, Vidalino L, Turato C, Ruvoletto M, Calabrese F, Valente M, et al. SERPINB3 induces epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol*. luglio 2010;221(3):343–56.
 178. Villano G, Quarta S, Ruvoletto MG, Turato C, Vidalino L, Biasiolo A, et al. Role of squamous cell carcinoma antigen-1 on liver cells after partial hepatectomy in transgenic mice. *Int J Mol Med*. gennaio 2010;25(1):137–43.
 179. Turato C, Cannito S, Simonato D, Villano G, Morello E, Terrin L, et al. SerpinB3 and Yap Interplay Increases Myc Oncogenic Activity. *Sci Rep*. 4 dicembre 2015;5:17701.
 180. Catanzaro JM, Sheshadri N, Pan JA, Sun Y, Shi C, Li J, et al. Oncogenic Ras induces inflammatory cytokine production by upregulating the squamous cell carcinoma antigens SerpinB3/B4. *Nat Commun*. 23 aprile 2014;5:3729.

-
181. Novo E, Villano G, Turato C, Cannito S, Paternostro C, Busletta C, et al. SerpinB3 Promotes Pro-fibrogenic Responses in Activated Hepatic Stellate Cells. *Sci Rep.* 13 giugno 2017;7(1):3420.
 182. Erica Novo, Andrea Cappon, Patrizia Pontisso, Gianmarco Villano. SerpinB3 as a Pro-Inflammatory Mediator in the Progression of Experimental Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.
 183. Carambia A, Freund B, Schwinge D, Heine M, Laschtowitz A, Huber S, et al. TGF- β -dependent induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol.* settembre 2014;61(3):594–9.
 184. Lunardi F, Villano G, Perissinotto E, Agostini C, Rea F, Gnoato M, et al. Overexpression of SERPIN B3 promotes epithelial proliferation and lung fibrosis in mice. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* giugno 2011;91(6):945–54.
 185. Roth GS, Decaens T. Liver immunotolerance and hepatocellular carcinoma: Patho-physiological mechanisms and therapeutic perspectives. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. dicembre 2017;87:101–12.
 186. Gatto M, Iaccarino L, Ghirardello A, Bassi N, Pontisso P, Punzi L, et al. Serpins, immunity and autoimmunity: old molecules, new functions. *Clin Rev Allergy Immunol.* ottobre 2013;45(2):267–80.
 187. Suminami Y, Nagashima S, Murakami A, Nawata S, Gondo T, Hirakawa H, et al. Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. *Cancer Res.* 1 marzo 2001;61(5):1776–80.
 188. Turato C, Scarpa M, Kotsafti A, Cappon A, Quarta S, Biasiolo A, et al. Squamous cell carcinoma antigen 1 is associated to poor prognosis in esophageal cancer through immune surveillance impairment and reduced chemosensitivity. *Cancer Sci.* maggio 2019;110(5):1552–63.
 189. Correnti M, Cappon A, Pastore M, Piombanti B, Lori G, Oliveira DVPN, et al. The protease-inhibitor SerpinB3 as a critical modulator of the stem-like subset in human cholangiocarcinoma. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* gennaio 2022;42(1):233–48.
 190. Turato C, Fornari F, Pollutri D, Fassan M, Quarta S, Villano G, et al. MiR-122 Targets SerpinB3 and Is Involved in Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Med.* 1 febbraio 2019;8(2):E171.
 191. Martini A, Fattovich G, Guido M, Bugianesi E, Biasiolo A, Ieluzzi D, et al. HCV genotype 3 and squamous cell carcinoma antigen (SCCA)-IgM are independently associated with histological features of NASH in HCV-infected patients. *J Viral Hepat.* ottobre 2015;22(10):800–8.
 192. Cannito S, Foglia B, Villano G, Turato C, Delgado TC, Morello E, et al. SerpinB3 Differently Up-Regulates Hypoxia Inducible Factors -1 α and -2 α in Hepatocellular Carcinoma: Mechanisms Revealing Novel Potential Therapeutic Targets. *Cancers.* 4 dicembre 2019;11(12):E1933.

-
193. Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, Todisco S, Iacobazzi V. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *Int J Mol Sci.* 27 maggio 2021;22(11):5703.
 194. Fasolato S, Trevelin E, Ruvoletto M, Granzotto M, Zanus G, Boscaro E, et al. SerpinB3 induces dipeptidyl-peptidase IV/CD26 expression and its metabolic effects in hepatocellular carcinoma. *Life Sci.* 1 maggio 2018;200:134–41.
 195. Ciscato F, Sciacovelli M, Villano G, Turato C, Bernardi P, Rasola A, et al. SERPINB3 protects from oxidative damage by chemotherapeutics through inhibition of mitochondrial respiratory complex I. *Oncotarget.* 15 maggio 2014;5(9):2418–27.
 196. Pontisso P, Quarta S, Caberlotto C, Beneduce L, Marino M, Bernardinello E, et al. Progressive increase of SCCA-IgM immune complexes in cirrhotic patients is associated with development of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 15 agosto 2006;119(4):735–40.
 197. Giannelli G, Marinosci F, Sgarra C, Lupo L, Dentico P, Antonaci S. Clinical role of tissue and serum levels of SCCA antigen in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 10 settembre 2005;116(4):579–83.
 198. Biasiolo A, Chemello L, Quarta S, Cavalletto L, Bortolotti F, Caberlotto C, et al. Monitoring SCCA-IgM complexes in serum predicts liver disease progression in patients with chronic hepatitis. *J Viral Hepat.* aprile 2008;15(4):246–9.
 199. Trerotoli P, Fransvea E, Angelotti U, Antonaci G, Lupo L, Mazzocca A, et al. Tissue expression of Squamous Cellular Carcinoma Antigen (SCCA) is inversely correlated to tumor size in HCC. *Mol Cancer.* 27 maggio 2009;8:29.
 200. Yu J, Wang ZJ, Chen LH, Dong WZ. Diagnostic value of serum squamous cell carcinoma antigen for hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Scand J Clin Lab Invest.* febbraio 2017;77(1):8–14.
 201. Rubin B. Natural immunity has significant impact on immune responses against cancer. *Scand J Immunol.* marzo 2009;69(3):275–90.
 202. Biasiolo A, Tono N, Zaninotto M, Merkel C, Fassina G, Plebani M, et al. Specificity of squamous cell carcinoma antigen (SCCA)-IgM detection in patients with HCV infection and rheumatoid factor seropositivity. *J Med Virol.* 2013;85(6):1005–8.
 203. Beneduce L, Castaldi F, Marino M, Quarta S, Ruvoletto M, Benvegnù L, et al. Squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 15 giugno 2005;103(12):2558–65.
 204. Biasiolo A, Trotta E, Fasolato S, Ruvoletto M, Martini A, Gallotta A, et al. Squamous cell carcinoma antigen-IgM is associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: A prospective study. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver.* febbraio 2016;48(2):197–202.
 205. Cagnin M, Biasiolo A, Martini A, Ruvoletto M, Quarta S, Fasolato S, et al. Serum Squamous Cell Carcinoma Antigen-Immunoglobulin M complex levels predict survival in patients with cirrhosis. *Sci Rep.* 27 dicembre 2019;9(1):20126.

-
206. Buccione D, Fatti G, Gallotta A, Loggi E, Di Donato R, Testa L, et al. F-9 Serum SCCA-IgM as a predictor of hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with liver cirrhosis. *Dig Liver Dis.* febbraio 2011;43:S95.
 207. Giannelli G, Fransvea E, Trerotoli P, Beaugrand M, Marinosci F, Lupo L, et al. Clinical validation of combined serological biomarkers for improved hepatocellular carcinoma diagnosis in 961 patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* agosto 2007;383(1–2):147–52.
 208. Pozzan C, Cardin R, Piciocchi M, Cazzagon N, Maddalo G, Vanin V, et al. Diagnostic and prognostic role of SCCA-IgM serum levels in hepatocellular carcinoma (HCC). *J Gastroenterol Hepatol.* agosto 2014;29(8):1637–44.
 209. Guarino M, Di Costanzo GG, Gallotta A, Tortora R, Paneghetti L, Auriemma F, et al. Circulating SCCA-IgM complex is a useful biomarker to predict the outcome of therapy in hepatocellular carcinoma patients. *Scand J Clin Lab Invest.* ottobre 2017;77(6):448–53.
 210. Bui Huu H, Ha Thuc N, Thi Le HP, Thi Thanh TD, Luong Bac A, Tiribelli C, et al. Characterization of SCCA-IgM as a biomarker of liver disease in an Asian cohort of patients. *Scand J Clin Lab Invest.* maggio 2018;78(3):204–10.
 211. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatol Baltim Md.* giugno 2012;55(6):2005–23.
 212. Calderaro J, Seraphin TP, Luedde T, Simon TG. Artificial intelligence for the prevention and clinical management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* giugno 2022;76(6):1348–61.
 213. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Lond Engl.* 10 novembre 2018;392(10159):1789–858.
 214. Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 1 novembre 2020;18(12):2650–66.
 215. Fattori di rischio per la salute: fumo, obesità, alcol e sedentarietà [Internet]. 2017 [citato 20 giugno 2022]. Disponibile su: <https://www.istat.it/it/archivio/202040>
 216. Ishizu Y, Ishigami M, Honda T, Imai N, Ito T, Yamamoto K, et al. Impact of visceral fat accumulation on the prognosis of patients with cirrhosis. *Clin Nutr ESPEN.* aprile 2021;42:354–60.
 217. Morando F, Maresio G, Piano S, Fasolato S, Cavallin M, Romano A, et al. How to improve care in outpatients with cirrhosis and ascites: a new model of care coordination by consultant hepatologists. *J Hepatol.* agosto 2013;59(2):257–64.

-
218. Gil-Gómez A, Rojas Á, Liu CH, Gallego-Duran R, Muñoz-Hernandez R, Fassina G, et al. Combination of squamous cell carcinoma antigen immunocomplex and alpha-fetoprotein in mid- and long-term prediction of hepatocellular carcinoma among cirrhotic patients. *World J Gastroenterol*. 28 dicembre 2021;27(48):8343–56.
 219. Cui R, He J, Zhang F, Wang B, Ding H, Shen H, et al. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKAll) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma markers complementary to alpha-fetoprotein. *Br J Cancer*. 16 giugno 2003;88(12):1878–82.
 220. Hanigan MH, Gallagher BC, Townsend DM, Gabarra V. Gamma-glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis*. aprile 1999;20(4):553–9.
 221. Singal AG, Mukherjee A, Elmunzer JB, Higgins PDR, Lok AS, Zhu J, et al. Machine Learning Algorithms Outperform Conventional Regression Models in Predicting Development of Hepatocellular Carcinoma. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG*. novembre 2013;108(11):1723–30.
 222. Reddy R, Imler TD. Tu1519 - Artificial Neural Networks are Highly Predictive for Hepatocellular Carcinoma in Patients with Cirrhosis. *Gastroenterology*. 1 aprile 2017;152(5, Supplement 1):S1193.
 223. Nam JY, Sinn DH, Bae J, Jang ES, Kim JW, Jeong SH. Deep learning model for prediction of hepatocellular carcinoma in patients with HBV-related cirrhosis on antiviral therapy. *JHEP Rep Innov Hepatol*. dicembre 2020;2(6):100175.
 224. Ioannou GN, Tang W, Beste LA, Tincopa MA, Su GL, Van T, et al. Assessment of a Deep Learning Model to Predict Hepatocellular Carcinoma in Patients With Hepatitis C Cirrhosis. *JAMA Netw Open*. 1 settembre 2020;3(9):e2015626.
 225. An C, Choi JW, Lee HS, Lim H, Ryu SJ, Chang JH, et al. Prediction of the risk of developing hepatocellular carcinoma in health screening examinees: a Korean cohort study. *BMC Cancer*. 29 giugno 2021;21(1):755.
 226. Tzartzeva K, Obi J, Rich NE, Parikh ND, Marrero JA, Yopp A, et al. Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology*. maggio 2018;154(6):1706-1718.e1.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio mia madre e mio padre per l'amore con cui hanno riempito la mia vita, per la fiducia che hanno sempre riposto in me, per il sostegno che mi hanno offerto nelle difficoltà e per tutti i momenti di gioia che hanno deciso di condividere con me. Li ringrazio per la pazienza che hanno avuto nel crescermi, nell'educarmi e nell'avermi reso quello che sono ora. Non potevo desiderare genitori migliori.

Ringrazio mia sorella per essere stata la miglior compagna di viaggio che potessi desiderare in questi anni, perché non ho memoria di un giorno in cui lei non fosse lì con me. A lei devo tante risate, alcuni litigi, qualche lacrima, ma soprattutto le devo la motivazione a non fermarmi, perché, nonostante la giovane età, è sempre un passo avanti, a modo suo un esempio. Sono orgoglioso di essere suo fratello.

Ringrazio la mia famiglia per essermi stata vicino nel percorso che mi ha permesso di raggiungere questo momento, ogni singolo membro, perché ciascuno di loro ha contribuito a modo suo a questo traguardo. In particolare ringrazio i nonni Gabriella, Franco, Annamaria e Damiano, per essere stati fondamenta solide per questa famiglia. Voglio bene a tutti voi.

Ringrazio Anna Zuin per avermi insegnato a guardare ciò che mi circonda anche da un'altra prospettiva, perché solo la mia non sarebbe mai stata sufficiente. La ringrazio inoltre per avermi reso parte della sua vita e soprattutto del suo amato Canale A. *“Alla fine ti giuro che lo rifarei”*.

Ringrazio Antonio Tagliatela, Francesco Di Donato, Jacopo Spertingati e Matteo Polita, per essere stati il miglior gruppo di amici e compagni che potessi trovare. Grazie a loro riuscire in questa facoltà è stato non solo più semplice, ma anche più divertente ed appassionante, perché l'hanno trasformata in molto più che soli esami. Fiero di essere parte degli *Illuminati e Brillanti*.

Ringrazio la mia relatrice, la Professoressa Patrizia Pontisso, ed i miei correlatori, la Dottoressa Alessandra Biasiolo e il Dottor Andrea Martini, per avermi dato la possibilità di essere parte di questa ricerca e per avermi consigliato, aiutato e guidato nella stesura di questa Tesi di Laurea. Grazie a loro non mi sono mai sentito abbandonato.