

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ULTRASONOLOGIA IN MEDICINA UMANA E
VETERINARIA**

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/B1

Settore Scientifico disciplinare: MED/09

**ASPETTI DIAGNOSTICI, STRATEGIE TERAPEUTICHE ED ESITO
CLINICO DEI TUMORI PRIMITIVI COLANGIOCELLULARI INSORTI SU
CIRROSI.**

Presentata da: Marzia Galassi

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Luigi Bolondi

Chiar.mo Prof. Luigi Bolondi

Esame finale anno 2012

INDICE

INDICE	Pag. 2
INTRODUZIONE	Pag. 3
-Epidemiologia	Pag. 5
-Classificazione	Pag. 6
-Fattori di rischio	Pag. 8
-Patogenesi	Pag. 14
-Clinica	Pag. 18
-Diagnostica d'immagine	Pag. 20
-Stadiazione	Pag. 28
-Terapia	Pag. 31
PARTE SPERIMENTALE	Pag. 38
-Obiettivi dello studio	Pag. 39
-Materiale e Metodi	Pag. 39
-Risultati	Pag. 41
- Anamnesi, trattamento e sopravvivenza dei pazienti affetti da ICC	Pag. 41
- Comportamento dei noduli alle diverse tecniche d'immagine	Pag. 50
-Discussione	Pag. 57
BIBLIOGRAFIA	Pag. 61

INTRODUZIONE

Il colangiocarcinoma (CC) è un tumore maligno epiteliale che origina dai dotti biliari e che normalmente, in forma avanzata, presenta una cattiva prognosi con una sopravvivenza mediana inferiore ai 24 mesi (1).

Il CC viene classificato in una forma intraepatica (ICC), che cresce all'interno del parenchima epatico, e in una forma extraepatica (ECC) che coinvolge l'albero biliare, compreso nel legamento epato-duodenale, e la colecisti.

Attualmente il CC è, dopo l'epatocarcinoma (HCC), la seconda neoplasia epatica primitiva più frequente; studi epidemiologici hanno evidenziato che la sua incidenza è in aumento nei paesi occidentali (2).

In particolare appare incrementata l'incidenza dell'ICC che, in alcune casistiche, raggiunge il 30% dei tumori primitivi del fegato e per il quale stanno emergendo nuovi fattori di rischio, fra i quali vengono annoverati la cirrosi e l'infezione da virus C (3).

Alla luce del suddetto incremento dell'incidenza e dell'identificazione della cirrosi come fattore di rischio per lo sviluppo di ICC appare necessario potenziare la diagnosi differenziale fra l'ICC e l'HCC, che è la più frequente neoplasia primitiva epatica e il cui principale fattore di rischio è la cirrosi.

Secondo le linee guida della American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) del 2005 (4) (in parte modificate nell'aggiornamento del 2010 (5)), in caso di riscontro di un nodulo insorto su cirrosi epatica (indipendentemente dall'eziologia) è possibile porre diagnosi di HCC, in maniera non invasiva, basandosi sul comportamento della lesione in studio alle diverse tecniche di immagine integrate dallo studio con il mezzo di contrasto.

Tuttavia, l'incrementata incidenza dell'ICC su cirrosi giustifica la necessità di capire se la diagnosi non invasiva, secondo le linee guida AASLD, è in grado di distinguere

fra le due forme di neoplasia primitiva epatica e quale sia la reale prognosi dei pazienti che sviluppano ICC su cirrosi.

Scopo del seguente elaborato è, pertanto, analizzare i casi di ICC su cirrosi che si sono presentati nel Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna e nel Policlinico S.Matteo di Pavia negli ultimi 7 anni, con particolare attenzione al pattern vascolare presentato alle diverse tecniche di immagine, al trattamento di tali pazienti e al successivo outcome.

EPIDEMIOLOGIA

Le neoplasie epatobiliari rappresentano il 13% della mortalità mondiale legata alle patologie tumorali; fra queste la principale causa è l'HCC, seguito dal CC che rappresenta circa il 10-20% delle cause di morte per neoplasia epatobiliare (2).

Come mostrato in Fig.1, la prevalenza del CC mostra un'altissima variabilità geografica, con il tasso più alto in Asia e quello più basso in Germania. (6)

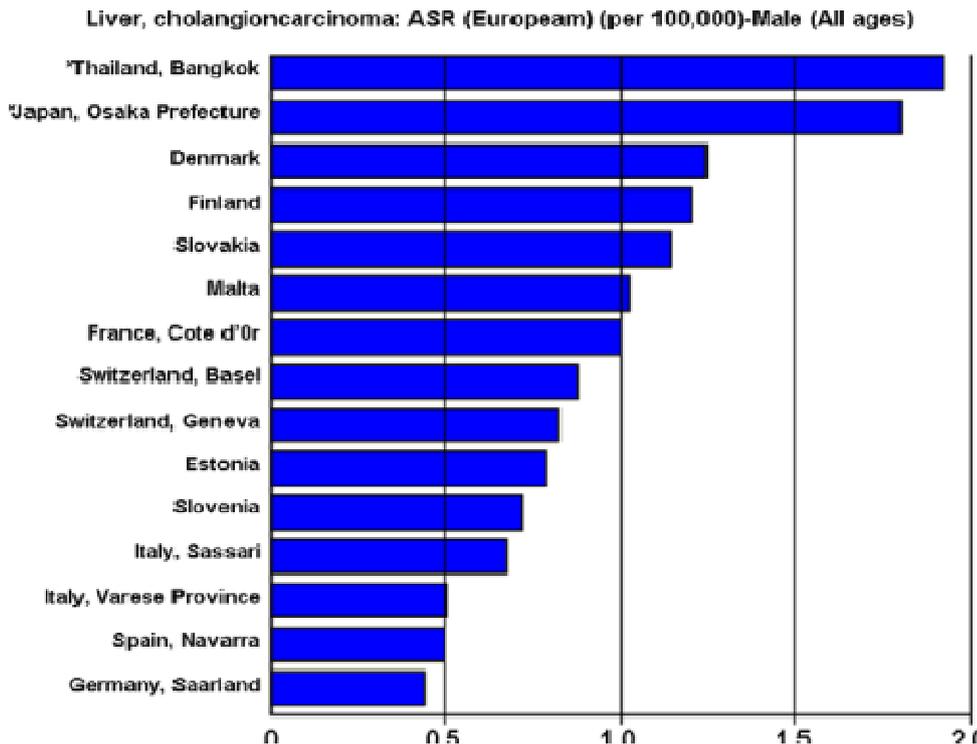


Fig. 1 Incidenza standardizzata per età nella popolazione Europea e Asiatica nel sesso maschile. Mosconi S, Beretta GD, Labianca R, et al. *Cholangiocarcinoma*. *Critical Reviews in Oncology Ematology* 2009; 69: 259-270.

Negli Stati Uniti l'incidenza della forma intraepatica è 0,95/100.000 mentre quella della forma extraepatica è 0,82/100.000 (6). Si osserva, inoltre, una diversa prevalenza a seconda della razza: la razza ispanica presenta, infatti, un'incidenza superiore alla razza afroamericana (1,22/100.000 contro 0,17-0,5/100.000). (7)

Nelle ultime 4 decadi abbiamo assistito ad un incremento dell'incidenza della forma intraepatica del 165% circa, mentre l'incidenza della forma extraepatica è rimasta sostanzialmente stabile (8) (9); tale incremento è stato riscontrato anche nei paesi dell'Europa occidentale e in Giappone (10) (11).

Il sesso maschile risulta quello maggiormente colpito, con un età media di presentazione superiore ai 65 anni; raramente viene riscontrata sotto i 40 anni, facendo eccezione per i pazienti affetti da colangite sclerosante primitiva (PSC) (6). Nella maggior parte dei casi l'eziologia rimane sconosciuta, anche se sono conosciute alcune condizioni associate al rischio di sviluppare un colangiocarcinoma. I fattori di rischio maggiormente conosciuti ed implicati nello sviluppo del CC sono la PSC, i parassiti epatobiliari (*Opistorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis*), l'epatolitiasi, le malformazioni biliari e sostanze come il thorotrast e la diossina (2). La differente incidenza della forma intraepatica rispetto all'extraepatica ha portato a ipotizzare l'esistenza di fattori di rischio diversi tra le due forme, individuando successivamente la cirrosi e l'epatite C come fattori predisponenti lo sviluppo di ICC (3). Uno studio epidemiologico italiano ha evidenziato un incremento medio annuo dell'incidenza di ICC e ECC del 6% e del 3%; parallelamente a tale dato si osserva un progressivo incremento della mortalità da ICC, che dal 2003 supera quello per ECC; il tasso di mortalità per l'ECC è rimasto sostanzialmente stabile. (12).

CLASSIFICAZIONE

-Classificazione Anatomica

Il CC è normalmente classificato in due forme:

- Colangiocarcinoma intraepatico, che coinvolge il parenchima epatico;
- Colangiocarcinoma extraepatico, che coinvolge l'albero biliare, compreso nel legamento rotondo, e la colecisti.

Gli ECC, a loro volta, sono classificati in tumori ilari (localizzati entro 2 cm dalla biforcazione del dotto comune) e distali. Negli anni, '70 Bismuth e Corlette proposero una classificazione di queste neoplasie in base alla loro localizzazione anatomica (13). Tale classificazione è riportata qui di seguito nella Tabella 1.

Tipo I	Tumore del dotto epatico che giunge alla confluenza con conservazione della comunicazione
Tipo II	Tumore della confluenza con interruzione della comunicazione fra i due dotti epatici
Tipo IIIa	Tumore con estensione al dotto epatico di destra
Tipo IIIb	Tumore con estensione al dotto epatico di sinistra
Tipo IVa	Tumore della confluenza con interessamento dei due dotti epatici, esteso a destra ai rami di II ordine
Tipo IVb	Tumore della confluenza con interessamento dei due dotti epatici, esteso a sinistra ai rami di II ordine
Tipo V	Tumore della confluenza esteso bilateralmente ai rami di II ordine

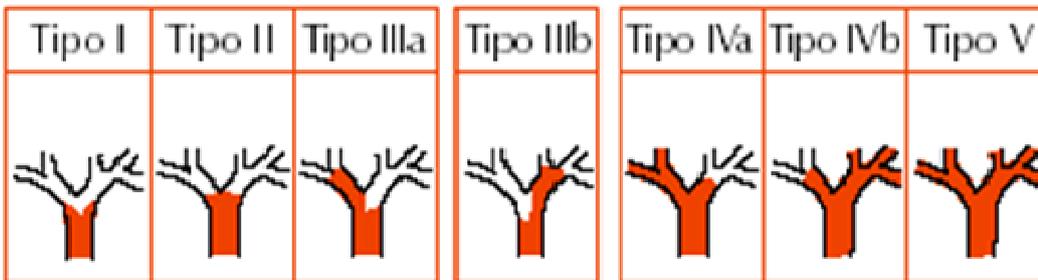


Tabella 1. Classificazione secondo Bismuth-Corlette del tumore di Klatskin tratta da Dionigi R. *Chirurgia*. Ed.Masson Milano 2006.

Circa il 60% dei CC sono ECC localizzati all'ilo, il 30% sono ECC distali e il 10% ICC (Fig.2) (14); tale dato si è modificato nel tempo in quanto, come già detto, l'incidenza degli ICC è aumentata fino ad arrivare al 20-30% di tutti i CC in alcune casistiche. (15)

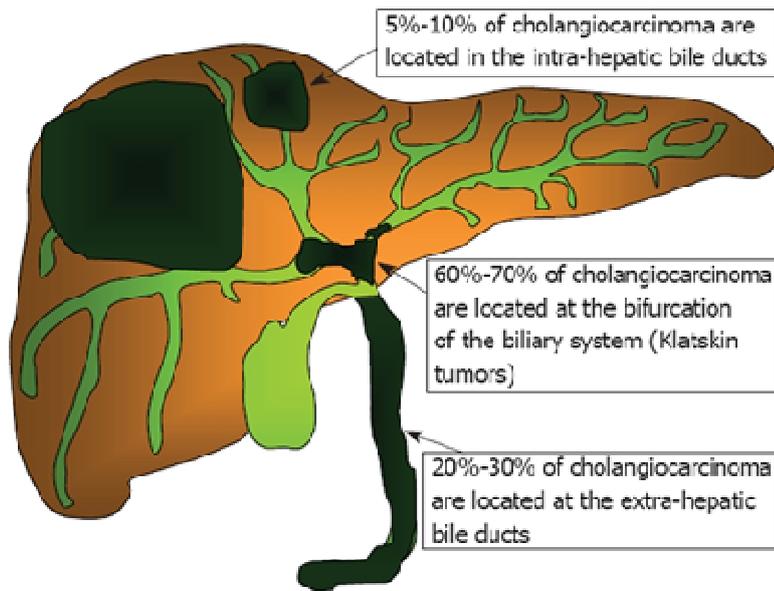


Fig.2 Presentazione anatomica del colangiocarcinoma

-Classificazione istologica (14)

Dal punto di vista macroscopico l'ICC si può presentare come una massa solida che può infiltrare i tessuti periduttali, crescere all'interno dei dotti o avere entrambe le caratteristiche. L'ECC invece può sviluppare lesioni nodulari, stenosi sclerosanti (pattern più comune) o avere crescita papillare; quest' ultimo pattern è il più raro anche se associato a una prognosi più favorevole.

Dal punto di vista microscopico più del 90% dei CC sono adenocarcinomi con un grado di differenziazione buono o moderato e con una tendenza a sviluppare reazione desmoplastica e invasione perineurale precoce.

FATTORI DI RISCHIO

Solo una minoranza di pazienti presenta fattori di rischio già noti per lo sviluppo di CC (2). Da ciò deriva la necessità di studi clinici atti a riconoscere nuove cause implicate nella patogenesi di tale patologia. I principali fattori di rischio sono raccolti all'interno della tabella 2.

Successivamente discuteremo i fattori di rischio più significativi dello sviluppo di colangiocarcinoma.

Fattori di rischio generali
• Età avanzata (>65 anni)
• Fumo di sigaretta
• Obesità
• Diabete
Post-chirurgiche
• Anastomosi bilio-enteriche
Patologie infiammatorie croniche
• Colangite sclerosante primitiva
• Epatoliti
• Epatite C
• Epatite B
• HIV
• Cirrosi epatica
Infezioni parassitarie
• Opistorchis Viverrini
• Clonorchis Sinensis
Malformazioni congenite delle vie biliari
• Cisti del coledoco
• Malattia di Caroli
• Fibrosi epatica congenita
Agenti chimici
• Thorotrast
• Diossine
• Nitrosamine
• Amianto
Farmaci
• Contraccettivi orali
• Isoniazide

Tabella 2 Fattori di rischio per lo sviluppo del colangiocarcinoma. Aljiffry M et Al. *Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009*. World Journal of Gastroenterology 2009; 34:4240-62.

-Colangite sclerosante primitiva (PSC)

La PSC è una patologia cronica che interessa le vie biliari e si manifesta con un progressivo processo di infiammazione, sclerosi e obliterazione delle vie biliari extraepatiche e spesso anche intraepatiche. E' una patologia relativamente rara con

una prevalenza di 1-6/100000, predilezione per il sesso maschile ed età compresa fra i 30 e i 50 anni. In circa il 70% dei casi è associata a malattie infiammatorie croniche in particolare alla colite ulcerosa (16). Nei paesi occidentali la PSC è il fattore di rischio più importante per lo sviluppo di CC (17). Il rischio annuo cumulativo di sviluppare CC in corso di PSC è del 1,5% dopo lo sviluppo di ittero (18) e la prevalenza di CC in corso di PSC varia dal 8% al 40% (19) (20). Nonostante ciò, secondo i risultati di alcuni studi italiani (3) (21), la PSC avrebbe solo un modesto ruolo come fattore di rischio per il colangiocarcinoma intraepatico nel nostro paese. I pazienti affetti da PSC solitamente sviluppano il CC ad un'età inferiore (30-50 anni) rispetto alla popolazione generale (60-70 anni). La diagnosi di CC in tali pazienti risulta tuttavia difficoltosa in quanto i sintomi clinici e gli aspetti radiologici sono simili fra PSC e CC (2); tale dato porta ad una diagnosi più tardiva della neoplasia con una prognosi peggiore (2). Pertanto si deve sospettare un CC su PSC per:

- comparsa di ittero progressivo ed improvviso
- perdita di peso non intenzionale
- marcata dilatazione del dotto biliare vicino a una stenosi biliare
- livelli di CA19-9 superiori a 100 U/ml
- presenza di displasia cellulare del campione ottenuto dal brushing della via biliare. (22)

Esistono inoltre dei fattori che aumentano l'incidenza di CC su PSC; tali fattori sono:

- associazione con una malattia infiammatoria cronica intestinale
- età avanzata alla diagnosi
- storia di displasia o carcinoma colo-rettale
- il fumo di sigaretta
- consumo di alcool (>80 g/die) (23)

-Infezioni parassitarie

Le infezioni parassitarie epatiche sono significativamente associate ad un aumento del rischio di CC soprattutto nel sud-est asiatico. I due principali agenti patogeni sono *Opistorchis Viverrini* e *Clonorchis Sinensi* (24)(25). La patogenesi del CC secondario

a tale infezione non è del tutto chiara; è stato tuttavia ipotizzato che l'infestazione del sistema biliare da parte di tali agenti patogeni porti ad un'inflammatione cronica del sistema biliare predisponendolo alla trasformazione neoplastica (14).

-Epatolitiassi

Le colangioepatiti (conosciute anche come colangioepatiti piogeniche ricorrenti) hanno una prevalenza del 20% nel Sud-Est asiatico e circa il 10% dei pazienti affetti sviluppa nel tempo un ICC (14).

Poiché la patologia precede lo sviluppo del tumore di almeno una decade, si presuppone l'esistenza di un processo multi-step dall'inflammatione cronica alla degenerazione neoplastica: colangiti ricorrenti aggravano un processo infiammatorio cronico che permane fra le diverse fasi acute.

I fattori di rischio che, associati all'epatolitiassi, aumentano il rischio di sviluppare un CC sono:

- età sopra i 40 anni
- lunga storia di epatolitiassi
- perdita di peso non intenzionale
- incremento della fosfatasi alcalina sierica
- riduzione dell'albumina sierica
- valori del CEA superiori a 4,2 ng/ml. (26)

-Patologia cistica congenita del dotto biliare

I pazienti con patologia congenita cistica del coledoco hanno un basso rischio di CC se le cisti vengono rimosse precocemente (26). Se, invece, le cisti non vengono rimosse il rischio di trasformazione maligna a 20 anni è del 10%-20% (27). La patogenesi non è del tutto chiarita; sembra che le cisti causino una stasi biliare e un reflusso delle secrezioni pancreatiche con inflammatione cronica secondaria e successiva trasformazione maligna (28). Talvolta, però, è stata segnalata comparsa del CC anche dopo escissione delle cisti (29); tale dato suggerisce l'esistenza di un possibile difetto genetico che predispone alla neoplasia del sistema biliare.

-Agenti chimici

Diversi composti sono stati sospettati di causare il CC.

E' stato dimostrato come il Thorotrast (diossido di torio), mezzo di contrasto radiologico usato fra il 1920 e il 1950, abbia la capacità di aumentare il rischio di CC fino a 300 volte in più rispetto alla popolazione generale (30,31). Inoltre, a causa della sua lunga emivita biologica (400 anni) il periodo di latenza, prima dello sviluppo di CC, varia da 16 a 45 anni con l'incidenza maggiore 20-30 anni dopo l'esposizione (14). Altri, pochi, studi hanno evidenziato un'associazione del CC con l'asbesto, il cloruro di vinile, le nitrosamine, l'isoniazide e i contraccettivi orali di 1° generazione (14).

-Cirrosi e infezioni virali

La cirrosi epatica è un'entità definita, dal punto di vista anatomico-patologico, come un'inflammatione cronica del parenchima, associata a estesa fibrosi e a formazione di noduli di rigenerazione. Ciò è conseguente alla necrosi degli epatociti e al collasso del sistema reticolare di supporto, con successiva deposizione di tessuto connettivo, sovrvertimento del letto vascolare e rigenerazione nodulare del rimanente parenchima. L'evento centrale che determina la fibrosi epatica risiede nell'attivazione delle cellule stellate del fegato, stimulate dalle sostanze prodotte dagli epatociti e dalla cellule di Kupffer a produrre collagene di tipo I.

Le manifestazioni cliniche della cirrosi sono variabili e riflettono la gravità della malattia epatica, comprendendo ittero, edema, coagulopatia e diverse anomalie metaboliche. La fibrosi e l'alterata vascolarizzazione provocano l'ipertensione portale e le sue conseguenze, tra cui varici esofagee e splenomegalia. L'ascite e l'encefalopatia epatica sono causate sia dall'insufficienza epatica che dall'ipertensione portale.

Le principali forme di cirrosi sono: 1) alcolica; 2) criptogenetica e post-epatitica; 3) biliare; 4) cardiaca; 5) metabolica, ereditaria e da farmaci. (16)

La cirrosi, in particolare su base alcolica e post-epatitica (da HCV e HBV), rappresenta la causa principale dello sviluppo dell'epatocarcinoma (HCC), il tumore primitivo maligno epatico più frequente nel mondo.

La cirrosi sembra essere un elemento essenziale nell'induzione di tumori maligni epatici, indipendentemente dalla sua eziologia (32).

L'aumento dell'incidenza dell'ICC registrato negli ultimi anni ha indotto ad approfondire il ruolo di agenti, quali i virus epatitici HBV e HCV, l'alcool e la cirrosi in sé, come possibili fattori di rischio anche per questo tumore.

Numerosi studi sono stati quindi condotti a questo proposito.

In Italia, è stato dimostrato il ruolo dell'infezione cronica da HCV come fattore predisponente per lo sviluppo di ICC, mentre l'associazione con il virus dell'epatite B e con il consumo di alcool sembra essere più debole (3). Uno studio caso-controllo condotto da Donato et Al nel 2001 ha infatti rilevato una prevalenza significativa dell'infezione da HCV nei casi affetti da ICC, rispetto ai controlli sani. Lo studio evidenzia anche il ruolo della cirrosi in sé come elemento fondamentale nella carcinogenesi dell'ICC, come per l'HCC, essendo presente nel 38,5% dei casi (3).

Anche negli Stati Uniti, la correlazione dell'ICC con l'infezione da HCV è evidente, mentre è più debole quella con l'HBV (33).

Il virus dell'epatite C sembrerebbe giocare un ruolo chiave nella patogenesi dell'ICC, come evidenziato da uno studio che dimostra la presenza del genoma virale nelle cellule del tumore (34). Inoltre, è stato rilevato come il virus causi un danno delle cellule dell'epitelio biliare, che può condurre a fenomeni di proliferazione, infiammazione e degenerazione (35).

Alcuni studi, nei paesi orientali (ad eccezione del Giappone) hanno dimostrato anche il ruolo del virus dell'epatite B come fattore di rischio per lo sviluppo di ICC (36). Sono state, inoltre, osservate alcune analogie clinico-patologiche tra l'HCC e l'ICC associati all'infezione da HBV, per esempio la distribuzione per età e sesso, la presenza di capsula e la tendenza all'invasione vascolare. Sembra dunque che i due

tumori condividano lo stesso processo patogenetico e forse la stessa origine dalle cellule staminali epatiche.

Il ruolo dell'HBV nella patogenesi dell'ICC appare legato, anche in questo caso (come per l'HCC), agli antigeni del virus, in particolare all'*antigene X* (HBxAg), che è stato ritrovato in concentrazioni elevate nel tessuto tumorale e nel parenchima circostante in pazienti con ICC. L'*antigene X* è un attivatore in vitro di numerosi proto-oncogeni, quali c-jun e c-fos. Inoltre, attraverso il legame con la proteina p-53, inibisce in vitro e in vivo i processi di apoptosi da essa mediati (37).

In aggiunta ai fattori di rischio ben descritti in passato, le infezioni da HBV e HCV e la cirrosi epatica in sé rappresentano dunque cause importanti nello sviluppo di ICC.

L'infezione cronica, infatti, gioca un ruolo fondamentale non solo attivando proto-oncogeni e/o disattivando geni oncosoppressori, ma anche causando un'inflammatione cronica. La continua proliferazione cellulare in un microambiente ricco di cellule infiammatorie, citochine/chemochine, fattori di crescita e agenti danneggianti il DNA (quali le specie reattive dell'ossigeno) conduce ad un'alterazione genetica permanente e alla conseguente trasformazione neoplastica (38).

-Altri fattori di rischio

Infine, ricordiamo che altri agenti, quali il diabete mellito, il fumo di sigaretta e l'infezione da HIV, sono stati correlati ad un aumento del rischio di insorgenza di ICC; tuttavia sono necessari ulteriori studi per confermare il ruolo di questi fattori di rischio (14).

PATOGENESI

Il CC risulta dalla trasformazione maligna dei colangiociti. Numerosi studi hanno dimostrato che sia il CC che l'epato-colangiocarcinoma derivano dalle cellule progenitrici epatiche (39) (40). Esistono numerosi fattori coinvolti nella formazione

del CC. Elenchiamo nella tabella 3 i principali geni e le vie di segnale deregolate nello sviluppo di CC.

Fenotipo di malignità	Geni/Pathways deregolati
Proliferazione	IL-6, recettore per IL-6 (gp130)
	HGF/Met
	ErbB2
	K-ras
	BRAF
	COX-2
Inibizione dell'apoptosi	Caspasi-9
	Mcl-1
	Bcl-2
	Bcl-XL
	COX-2
Riduzione della senescenza	Telomerasi
Deregolazione del ciclo cellulare	Ciclina D1
	p21
	p27
	pRb
	p53
	mdm-2
	DCP4/Smad4
	p16
Invasività/Metastasi	E-caderina
	$\alpha\beta$ -caderina
	Aspartyl β -idrossilasi
	WISP1v
	Metalloproteasi della matrice
Angiogenesi	VEGF
	TGF- β

Tabella 3 Geni e vie di segnale deregolate nello sviluppo di Colangiocarcinoma. Blechacz B, Gores G.J. *Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis and treatment. Hepatology* 2008; 48:308-21.

Tutti i fattori di rischio e gli studi sperimentali hanno evidenziato che l'infiammazione e la colestasi giocano un ruolo chiave nella patogenesi del CC, creando un contesto in cui si vengono a danneggiare i "DNA mismatch repair genes",

gli oncosoppressori e si vengono ad attivare gli oncogeni (41) . Questo dato si associa ad uno squilibrio fra la proliferazione e l'apoptosi dei colangiociti.

Tale cambiamento sembra essere legato all'aumentata produzione di citochine, fattori di crescita ed acidi biliari in corso di flogosi e colestasi. Le citochine stimolano l'espressione, nelle cellule epiteliali, della ossido nitrico sintetasi inducibile (iNos); tale iperespressione è presente nelle patologie delle vie biliari e nel CC. L'aumento dell'iNOS porta alla generazione di ossido nitrico e di specie reattive (RNOS), che interagiscono con il DNA e le proteine, portando alla formazione di mutazioni e rotture (42).

Nel CC sono state individuate diverse mutazioni a carico dei diversi oncogeni; la presenza di tali mutazioni dipende dallo stadio del tumore, dall'istotipo, dalla localizzazione anatomica, dall'eziologia e dall'origine etnica della popolazione (2). E' importante sottolineare come la maggior parte degli studi genetici è stata effettuata su ICC, in quanto la natura desmoplastica e paucicellulare dell'ECC non rende agevole l'analisi del tessuto (2).

A differenza del carcinoma duttale pancreatico, che nel 90% dei casi presenta la mutazione del proto-oncogene k-ras, il CC presenta tale mutazione solo nel 20-54% dei casi, nonostante esista una comune derivazione dei dotti pancreatici e dell'albero biliare (43).

La mutazione dell'oncosoppressore p53 è stata riportata in una percentuale variabile dal 21% al 76% dei CC (44). Altri geni oncosoppressori coinvolti sono p16INK4a, DPC4/Smad4 e APC (45) (46). La correlazione tra tali marcatori e la prognosi è variabile a seconda dei diversi studi.

Un'altra proteina fondamentale nella patogenesi di molte neoplasie è l'IL-6 e numerosi studi hanno riportato un suo incremento anche a livello del CC; tale proteina viene prodotta dalle cellule tumorali, stimulate sia da altre citochine infiammatorie che dalla perdita del normale meccanismo di regolazione a feedback negativo. Tra gli effetti del "signaling" dell'IL-6 nel CC ricordiamo l'iperespressione della proteina antiapoptotica Bcl-2, l'aumento dell'attività della telomerasi,

l'attivazione della p44/p42 MAPK e p38MAPK, entrambe critiche per la proliferazione cellulare (47) (48).

I recettori tirosin-chinasi sono iperespressi in molti tumori e ne modulano il comportamento biologico. Per esempio, è stato osservato come l'inibizione del segnale dell'EGFR possa sopprimere la crescita cellulare nel CC (49). L'EGFR può essere attivato, direttamente, dagli acidi biliari e può promuovere la proliferazione di cellule neoplastiche (50) (51). La fosforilazione di EGFR determina l'attivazione della cascata delle p42/44 MAPK e p38 MAPK, che aumentano l'espressione della ciclossigenasi 2 (COX-2) nelle cellule del CC (51).

COX-2, indotta anche da altri fattori tra cui acidi biliari, iNOS e la tirosin-chinasi ErbB2, gioca un ruolo importante nella carcinogenesi del CC, attraverso l'inibizione dell'apoptosi e la stimolazione della crescita (52).

Il fattore di crescita degli epatociti e il suo recettore c-met sono anch'essi frequentemente iperespressi nel CC (53) (54); questo fattore di crescita è mitogeno e la sua aumentata produzione da parte delle cellule del CC, insieme all'iperpressione del suo recettore, rappresenta un meccanismo autocrino per la crescita tumorale (55). Nel CC è stata, inoltre, dimostrata una riduzione nei meccanismi di inibizione della crescita tumorale (2).

Cellule staminali epatiche

Recentemente numerosi studi hanno suggerito che alcuni tumori possono originare da cellule staminali tumorali, che si formano dalla carcinogenesi di normali cellule staminali.

E' stato ipotizzato che epatociti e colangiociti derivino dallo stesso pool di cellule precursori epatiche, chiamate anche "*cellule ovali*". La carcinogenesi di queste cellule staminali potrebbe causare l'insorgenza dell'epatocarcinoma e del colangiocarcinoma intraepatico (36) (40).

Le cellule ovali sono piccole cellule con un alto rapporto nucleo/citoplasma e un nucleo con caratteristica forma ovoidale, da cui deriva il nome.

L'origine di queste cellule è stata a lungo indagata. Sembra che esse siano localizzate nei canali di Hering, una zona di transizione tra gli epatociti periportali e i colangiociti dei piccoli dotti biliari terminali. Studi più recenti, tuttavia, indicano che almeno una parte delle cellule staminali epatiche deriva dalle cellule del midollo osseo (56) (57).

Le cellule ovali sono progenitori multipotenti, che possiedono la capacità di differenziarsi in diverse linee cellulari, tra cui gli epatociti e i colangiociti.

In seguito ad un danno epatico severo, la loro proliferazione e differenziazione viene attivata da diversi fattori di crescita, quali il fattore di crescita degli epatociti (HGF), il fattore di crescita epiteliale (EGF) e il TGF- α . Esse sono le uniche cellule che persistono nel tessuto per un tempo sufficientemente lungo da accumulare mutazioni genetiche che inducano la trasformazione neoplastica (57).

Le cellule ovali sarebbero quindi implicate sia nella normale rigenerazione epatica che nella carcinogenesi.

La teoria che sia l'HCC che l'ICC derivino dalle cellule ovali è supportata dall'esistenza del carcinoma epato-colangiocellulare, in cui entrambe le componenti istologiche sono presenti. Questo tumore sembrerebbe originarsi dalle cellule staminali epatiche che hanno conservato la capacità di differenziarsi in entrambe le linee cellulari, epatocitarie e biliari (38) (58).

CLINICA

Il CC è spesso asintomatico o si presenta con sintomi aspecifici in fase precoce; da ciò si deduce che la diagnosi avviene casualmente, in fase precoce, attraverso le tecniche di imaging oppure viene posta in fase tardiva, solitamente in seguito alla comparsa di sintomi quali astenia, calo ponderale, malessere generale; purtroppo in tale ultima fase non è più possibile un approccio chirurgico alla malattia, ricorrendo solo alla terapia palliativa (2).

Solitamente l'ICC viene diagnosticato, alle diverse tecniche di immagine, come una massa epatica asintomatica.

L'ECC, invece, si presenta con segni e sintomi legati all'ostruzione biliare: ittero progressivo, non associato a dolore, prurito, feci acoliche e urine ipercromiche, dolore addominale, febbre. Solo il 10% dei casi presenta delle colangiti ascendenti.

Pazienti con lesioni papillari mostrano un'ostruzione biliare intermittente.

L'esame obiettivo in questi pazienti può mettere in evidenza un'epatomegalia, una colecisti distesa (segno di Courvoisier) o segni di ipertensione portale secondari a trombosi portale da infiltrazione o compressione. (14) (21)

-Esami di laboratorio

Esistono alcuni parametri biochimici che possono aiutare il clinico nella diagnosi di CC, ma raramente questi parametri diventano di per se stessi diagnostici. L'ittero compare solo se è presente un'ostruzione dei due dotti biliari principali intraepatici o del dotto biliare comune; in questi due casi si assiste a un incremento dei valori di bilirubina, della gamma-glutamilttransferasi (GGT) e della fosfatasi alcalina (ALP) (59) (60). In caso di ostruzione di uno solo dei due dotti intraepatici non si avrà la comparsa di ittero, né l'elevazione della bilirubina pur essendo possibile elevazione della GGT e della ALP (19). E' inoltre possibile riscontrare altre alterazioni laboratoristiche fra cui l'ipoalbuminemia e l'allungamento del tempo di protrombina (PT). (19)

-Marcatori tumorali

Molti marcatori tumorali possono supportare la diagnosi di CC, ma nessuno è sufficientemente sensibile da poter essere usato ai fini dello screening. I due marcatori più usati sono l'antigene carcinoembrionario (CEA) e l'antigene carboidratico (CA19-9). Entrambi questi marcatori non sono molto specifici in quanto si possono elevare anche in altre condizioni sia maligne (pancreas, stomaco, colon, ecc.) che benigne (colangiti, epatoliti, ecc.) (60).

Nei pazienti senza PSC, il riscontro di livelli sierici di Ca 19-9 superiori a 100 UI/ml ha una sensibilità del 53% e una specificità del 75-90% per la diagnosi di CC (61). In pazienti con PSC, la sensibilità sale al 75-89% e la specificità è dell'80-86% (62).

Uno studio recente della Mayo Clinic fissa a 20 U/ml il valore del CA 19-9, nei pazienti con PSC; tale dato correla con una sensibilità del 78% e una specificità del 67% nella diagnosi di CC. Il marcatore sierico CA 19-9, associato all'ecografia, alla Tomografia Computerizzata (TC) con mezzo di contrasto (MDC) o alla Risonanza Magnetica (RM) con MDC, raggiunge una sensibilità, rispettivamente, del 91%, del 100% e del 96% (63).

Il CA 19-9 è inoltre utilizzato nel monitoraggio della patologia in corso di trattamento (64).

Livelli aumentati di CEA si riscontrano in circa il 30% dei pazienti con CC, ma anche questo marcatore non è specifico e può risultare elevato nelle infiammazioni croniche intestinali, nell'ostruzione biliare non neoplastica, in altri tumori e nel danno epatico severo (2).

Altri marcatori sono stati più recentemente correlati al CC, ma ulteriori studi sono necessari. Tra questi, ricordiamo l'IL-6, il Tripsinogeno-2 e la Mucina umana 5 (14).

DIAGNOSTICA D'IMMAGINE

Per quanto riguarda la diagnosi del CC dobbiamo analizzare separatamente le due forme, in quanto modalità di crescita e localizzazioni differenti richiedono differenti tecniche d'approccio per raggiungere la diagnosi.

In prima battuta analizzeremo l'utilità delle diverse tecniche d'immagine nell' ECC.

L'ECC tende a crescere longitudinalmente lungo il dotto biliare e non in senso radiale, senza perciò portare alla formazione di grandi masse epatiche; da ciò si deduce che TC, RM e ecografia (US) non presentano alta sensibilità per tale patologia (64).

L'ICC invece tende a formare delle masse epatiche e quindi le tecniche d'immagine più sensibili saranno l'ecografia, la TC con MDC e la RM con MDC.

-Ecografia

L'ecografia rappresenta la metodica di prima linea nel sospetto di un'ostruzione delle vie biliari in quanto permette di escludere la presenza di materiale litiasico all'interno

della via biliare, di valutare il parenchima epatico, l'eventuale dilatazione dei dotti biliari e la localizzazione della sede dell'ostruzione; infatti lesioni distali causeranno dilatazione delle vie biliari intra ed extraepatiche mentre le lesioni più prossimali causeranno solo dilatazione delle vie biliari intraepatiche (64).

La sensibilità e l'accuratezza dell'ecografia nella diagnosi di ECC sono rispettivamente dell'89% e dell'80%-95%. In caso, però, di piccole masse periampollari o di valutazione dell'estensione della malattia, l'ecografia perde in sensibilità.

L'uso del color Doppler è utile nel determinare la compressione tumorale e l'infiltrazione, da parte della neoplasia, del tronco portale o dell'arteria epatica (15).

La sensibilità e la specificità dell'indagine dipendono, comunque, dalla localizzazione della patologia e dall'esperienza dell'operatore e possono essere incrementate dalla presenza di alti livelli sierici di CA 19-9 (14).

Per quanto riguarda l'ICC, l'ecografia senza mezzo di contrasto evidenzia la presenza di formazioni nodulari epatiche, ma perde in specificità in quanto mancano caratteristiche specifiche che lo distinguano dalle altre formazioni nodulari epatiche.

Per quanto riguarda, invece, l'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) esistono pochi studi che descrivono il comportamento vascolare dell'ICC in tale metodica e questi studi solitamente sono su noduli di grandi dimensioni e in pazienti non cirrotici (65) (66).

Stando a questi dati di letteratura il comportamento CEUS più tipico dei noduli di ICC è un ipervascolarizzazione arteriosa ad anello con centro ipoecogeno (corrispondente al centro fibrotico della neoplasia) e successivo wash out in fase portale e tardiva (Fig.3).

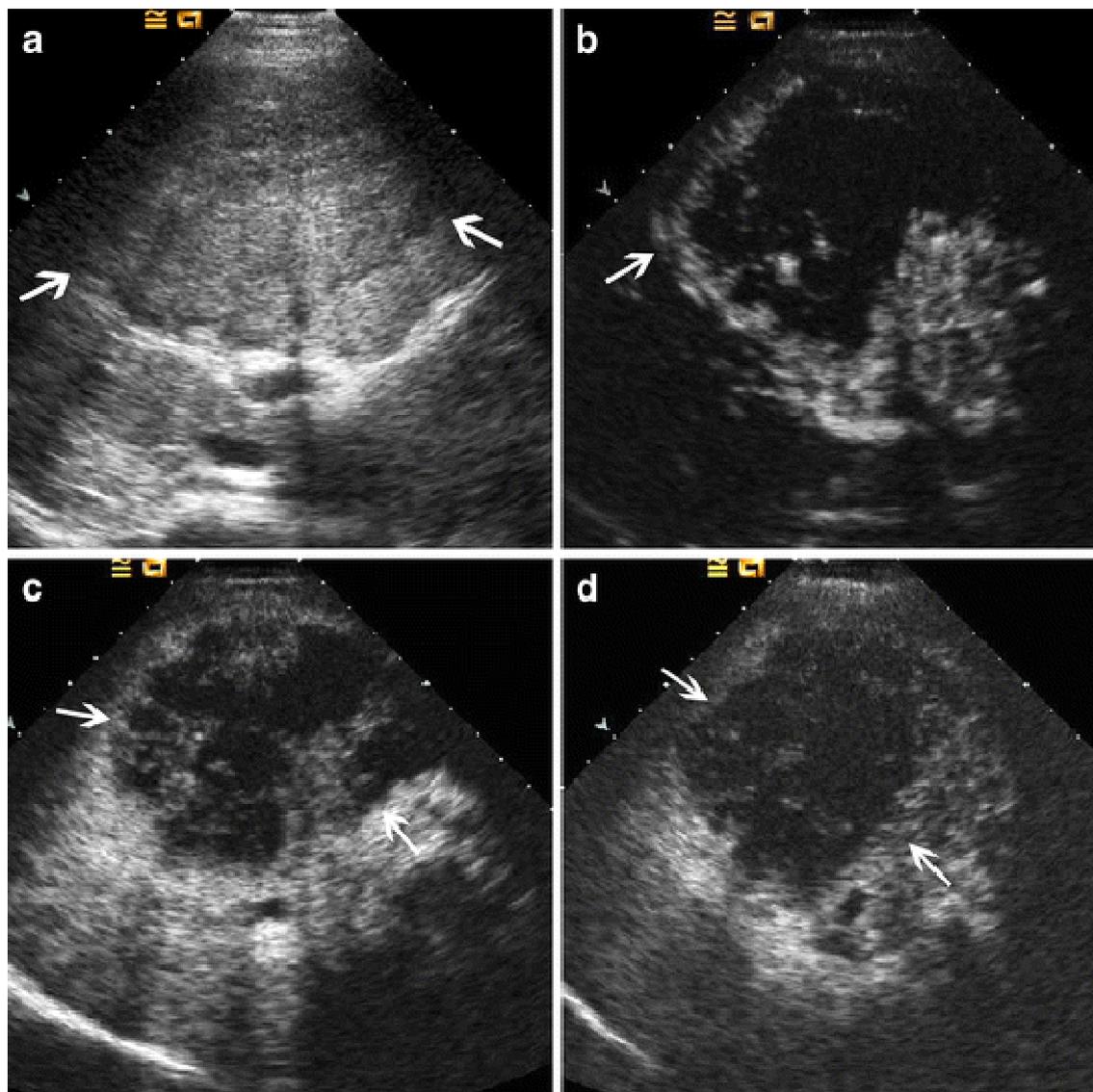


Fig.3 Ecografia con mezzo di contrasto di un nodulo di ICC. Tale lesione presenta iperecogenità ad anello in fase arteriosa con successivo wash out. Chen LD, Xu HX, Xie XY, et Al. Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma: differential diagnosis with contrast enhancement ultrasound. Eur Radiol 2010; 20: 743-753.

In un recente studio (67) Vilana et Al hanno analizzato il comportamento alla CEUS di diversi noduli di ICC, insorti su cirrosi epatica, riscontrando che solo il 52,4% dei noduli presentava la tipica vascolarizzazione ad anello in fase arteriosa mentre il restante 47,6% mostrava un enhancement arterioso omogeneo con successivo wash out (comportamento tipico per HCC). Alcune di queste lesioni risultavano di dimensioni superiori ai 2 cm e per tale ragione, secondo le linee guida AASLD, sarebbero stati considerati e trattati come HCC. Alla luce di questi dati gli autori concludevano che, alla CEUS, l'ICC e l'HCC possono presentare il medesimo comportamento vascolare e pertanto la CEUS non può essere usata come unica

tecnica nella diagnosi non invasiva di HCC. E' stata, quindi, richiesta e successivamente attuata una revisione delle linee guida AASLD per la diagnosi non invasiva di HCC.

D'altra parte altri studi, condotti in accordo con le linee guida EFSUMB del 2008, descrivono, come caratteristica dell'ICC, la presenza di un wash out più marcato in fase tardiva. Tale aspetto viene considerato significativo soprattutto in mancanza del tipico enhancement arterioso ad anello. In particolare risulta interessante lo studio di Chen et Al che mostra un enhancement più intenso per l'HCC e un wash out più marcato per l'ICC (66).

-TC con MDC

Spesso nei pazienti con ECC viene fatta una TC di stadiazione perché permette di valutare il coinvolgimento linfonodale, la presenza di metastasi a distanza, l'invasione vascolare o la diffusione locale (14). Tuttavia la TC non riesce con esattezza a valutare l'estensione di malattia per cui al momento si preferisce eseguire una RM con metodica MRCP subito dopo l'ecografia (21).

Per quanto riguarda l'ICC, invece, non esistono molti studi in letteratura che analizzino il comportamento vascolare dell'ICC alla TC (65) (68) (69). Il comportamento che appare maggiormente descritto è un enhancement periferico del nodulo con ipodensità centrale. In fase tardiva solitamente viene descritta un'assenza di wash out in quanto il centro fibroso è in grado di trattenere il mezzo di contrasto iodato in maniera maggiore rispetto al parenchima circostante (Fig.4a e b).



A



B

Fig. 4 A e B. TC addome TC con mezzo di contrasto di ICC di 6 cm di diametro. **A** In fase arteriosa si nota un enhancement periferico della lesione (freccia). **B.** Durante la fase portale, la lesione mostra un enhancement centripeto (freccia). Kim SJ, Lee JM, Han JK, et Al. *Peripheral mass-forming cholangiocarcinoma in cirrhotic liver.* AJR Am J Roentgenol 2007; 189:1428-1434.

Alcuni studi, però, hanno evidenziato che tale comportamento è solitamente influenzato dalle dimensioni della lesione. Lesioni di dimensioni superiori a 3 cm solitamente presentano comportamento vascolare simile a quello descritto sopra, mentre lesioni di dimensioni inferiori a 3 cm mostrano un comportamento vascolare

più simile a quello dell'epatocarcinoma rendendo più difficile la diagnosi differenziale fra le due forme insorte su cirrosi (68).

D'Onofrio et Al sostengono l'importanza di eseguire TC e CEUS nella diagnosi dell'ICC in quanto una discordanza fra il wash out della CEUS e un'assenza di wash out della TC rafforza l'ipotesi diagnostica di un ICC (65).

-RM con MDC e MRCP

Nel ECC la RM, soprattutto associata all'angiografia (MRCP), ha migliorato la diagnosi e la determinazione dell'estensione della malattia e in centri esperti rappresenta ad oggi la tecnica di scelta per la diagnosi di questa neoplasia.

Essa permette, infatti, di definire l'anatomia del fegato e delle vie biliari, l'estensione locale del tumore, il grado di coinvolgimento dei dotti biliari (tramite la MRCP), l'anormalità del parenchima epatico e l'interessamento linfonodale e vascolare (70), (14); permette, inoltre, una ricostruzione tridimensionale dell'albero biliare con un'accuratezza pari a quella delle altre metodiche invasive (ERCP, PTC) (14). Attualmente viene pertanto considerata come la metodica di scelta nel programmare il trattamento del ECC (15).

Per quanto riguarda l'ICC, invece, solitamente è sufficiente l'esecuzione di una RM addome con MDC; la lesione si presenta come una massa ipointensa in T1 con iperintensità in T2. In fase arteriosa mostra iperintensità periferica ad anello con tendenza all'omogenizzazione in assenza di fenomeni di wash out (Fig.5) (71) (72). Tale fenomeno, come per la TC, è spiegato dal fatto che il mezzo di contrasto iodato e quello della RM (a differenza di quello ecografico) non sono solo vascolari, ma diffondono nello spazio interstiziale accumulandosi nel tessuto fibroso dell'ICC.

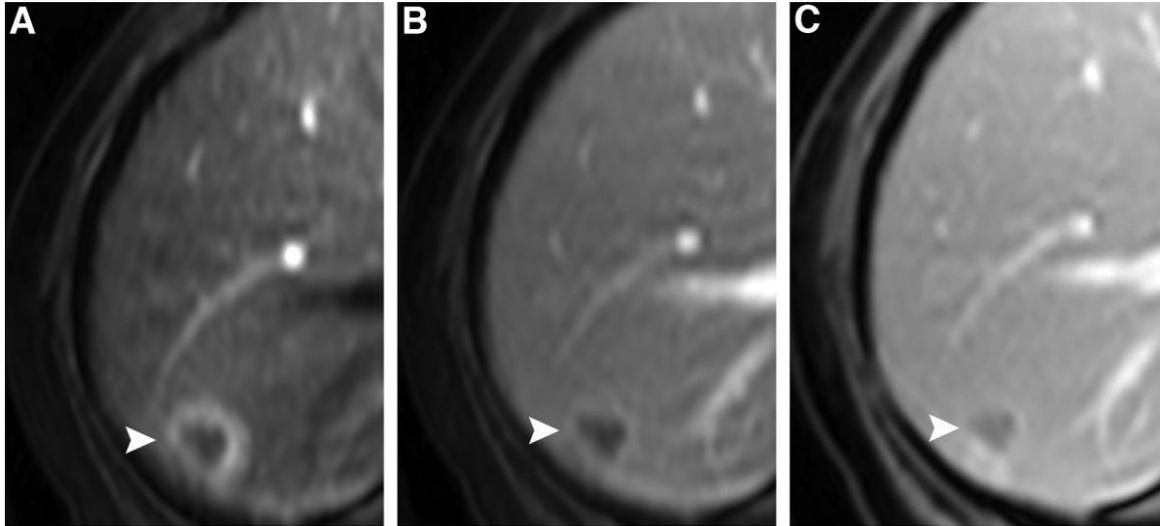


Fig. 5. RM con mezzo di contrasto di ICC del lobo destro del fegato (freccie). Le fasi arteriosa (A), portale (B) e tardiva (C) mostrano un enhancement periferico ad anello della lesione, che rimane stabile durante tutte le fasi dello studio dinamico. Rimola J, Forner A, Reig M, et Al. *Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma.* Hepatology 2009; 50: 791-798.

Lo studio di Vilana et Al indaga anche il comportamento dell'ICC alla RM giungendo a conclusione che questa metodica è abbastanza specifica nel differenziare l'ICC dall'HCC (67).

-ERCP e PTC

La colangiopancreatografia retrograda endoscopica (ERCP) e la colangiografia percutanea transepatica (PTC) sono due metodiche, con approccio invasivo, che consentono di visualizzare eventuali anomalie dell'albero biliare, la localizzazione e l'estensione del ECC all'interno dei dotti. Normalmente i segni di malignità appaiono come strutture asimmetriche o irregolari (64). Il vantaggio principale di queste due metodiche, rispetto a quelle non invasive, sta nella possibilità di effettuare brushing e/o biopsia per l'analisi citologica o istologica per confermare la presenza di CC. Purtroppo tale indagine è limitata dall'importante reazione desmoplastica del tumore per cui si rischia di avere dei falsi negativi. Per tale ragione non si deve escludere l'ipotesi di un CC solo sulla base di un esame citologico negativo per neoplasia. Il dosaggio del CA 19-9 e la ripetizione di più esami citologici o istologici aumentano la possibilità di giungere ad una diagnosi certa (14).

Tali metodiche possono essere utilizzate anche, a scopo palliativo, per il posizionamento di uno stent. Solitamente viene preferito l'utilizzo dell'ERCP, ma la scelta tra le due metodiche dipende dalla loro disponibilità e dalle caratteristiche anatomiche del tumore (15).

Tali metodiche, proprio per la loro invasività, appaiono tuttavia gravate da alcuni effetti collaterali quali la possibilità di una pancreatite post ERCP (60), batteriobilia, il sanguinamento, sepsi e, anche se raramente, morte. (73) (74)

-Ecografia endoscopica

Il vantaggio dell'ecoendoscopia risiede nella possibilità di visualizzare tessuti e organi a diretto contatto con lo stomaco e il duodeno, aumentando così la capacità di identificare anomalie che potrebbero sfuggire all'approccio percutaneo. L'ecoendoscopia consente, dunque, una buona visualizzazione dei dotti biliari extraepatici, della colecisti, dei linfonodi e dei vasi regionali.

Attraverso tale metodica è possibile effettuare un citoaspirato con ago sottile, un brushing della lesione o il prelievo di un linfonodo sospetto, consentendo una più corretta stadiazione preoperatoria. La sensibilità del FNA è dell'86% (64).

Si deve comunque porre attenzione per quanto riguarda i pazienti candidabili all'intervento nell'eseguire un FNA in quanto è presente rischio di disseminazione della neoplasia (14).

-PET

Come la maggior parte delle neoplasie maligne le cellule del CC hanno la proprietà di captare il glucosio. La PET con 18 fluorodesossiglucosio (18-FDG) permette quindi una buona visualizzazione di lesioni superiori ad 1 cm. (64)

Attualmente tale indagine è considerata metodica di scelta per la stadiazione della patologia neoplastica. La sua capacità di evidenziare metastasi a distanza varia dal 70% al 100% nel caso del CC.

Negli ultimi anni tale dato è stato migliorato dalla possibilità di combinare immagini funzionali PET con quelle anatomiche TC (PET/TC) (14).

È stata dimostrata l'utilità della PET anche nel monitoraggio della risposta tumorale al trattamento, con una sensibilità dell'80% nella diagnosi di recidive locali dopo resezione (14).

Le limitazioni della PET consistono nei risultati falsamente positivi in pazienti con condizioni di infiammazione biliare, come la colangite sclerosante primitiva, e risultati falsamente negativi nei casi di CC mucinoso, le cui cellule captano debolmente il glucosio (64).

STADIAZIONE

Per la corretta stadiazione e per programmare un eventuale trattamento del CC è importante conoscere la via di diffusione della neoplasia; il CC può diffondere lungo i dotti biliari, dare invasione perineurale e vascolare e può dare metastasi ai tessuti adiacenti, ai linfonodi o a distanza (14).

La diffusione longitudinale del CC può essere mucosale (superficiale), come accade soprattutto per la forma papillare (intraduttale) e nodulare (mass-forming), oppure sottomucosa (invasiva), più frequente invece per la forma sclerosante (infiltrante) (14). Margini di resezione di più di 1 cm sono raccomandati per il tipo infiltrante, e di più di 2 cm per i tipi papillare e nodulare (14).

In circa il 75% dei casi si può osservare l'invasione perineurale che rappresenta un fattore prognostico negativo (75).

L'infiltrazione della vena porta (circa 30% dei CC) è un fattore molto discusso (14) perché da alcuni viene considerato fattore prognostico negativo (76) mentre per altri è un fattore positivo (77) perché, a seguito dell'ipertrofia del lobo controlaterale, permette l'esecuzione di resezioni più ampie.

L'ECC distale può infiltrare direttamente il pancreas o il duodeno, mentre la forma ilare diffonde al parenchima epatico in più dell'80% dei casi, tramite infiltrazione diretta o estensione longitudinale lungo i dotti biliari. Quest'ultimo meccanismo

spiega il coinvolgimento del lobo caudato nel tumore di Klatskin, motivo per cui il trattamento di tale neoplasia prevede anche la resezione del caudato (14).

L'invasione linfonodale è presente in circa il 45% dei casi, raggiungendo la sua massima incidenza nella forma extraepatica distale; normalmente sono coinvolti i linfonodi ilari e, meno frequentemente, quelli para-aortici (14). L'interessamento linfonodale riduce la sopravvivenza a 5 anni dopo resezione chirurgica dal 30-40 % al 10-15% (14).

Metastasi a distanza sono presenti nel 30% dei casi al momento della diagnosi ed sono associate ad una prognosi di solo alcuni mesi (14).

Esistono due sistemi di stadiazione diversi per classificare l'ICC e l'ECC.

L'ICC viene studiato in base al sistema di stadiazione UICC (Union Internationale Contre le Cancer) e AJCC (American Joint Committee in Cancer), chiamato anche sistema di stadiazione TNM (tabelle 4 e 5), che si basa sulla stadiazione patologica e quindi richiede spesso la resezione chirurgica del tessuto (2).

Stadio TNM	Diffusione tumorale
T1	Tumore solitario, senza invasione vascolare
T2	Tumore solitario con invasione vascolare oppure Tumori multipli, tutti ≤ 5 cm
T3	Tumori multipli > 5 cm oppure Tumore coinvolgente un ramo maggiore della vena porta o della vena epatica
T4	Invasione degli organi adiacenti oppure Perforazione del peritoneo viscerale
N0	Assenza di metastasi ai linfonodi regionali
N1	Metastasi ai linfonodi regionali
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Metastasi a distanza

Tabella 4. Stadiazione TNM del colangiocarcinoma intraepatico

Stadio UICC	Tumore	Linfonodi	Metastasi
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3	N0	M0
IIIB	T4	N0	M0
IIIC	qualsiasi T	N1	M0
IV	qualsiasi T	qualsiasi N	M1

Tabella 5. Stadiazione UICC del colangiocarcinoma intraepatico

Nathan et Al hanno proposto un nuovo sistema di stadiazione che si basa sul numero di tumori, sull'invasione vascolare, sullo stato linfonodale e sulla presenza di metastasi a distanza. Tumori multipli sono associati ad una prognosi sfavorevole, essendo indice di diffusione ematogena o linfatica di cellule neoplastiche (78).

L'ECC si basa sul sistema di stadiazione dell'AJCC (79); tale classificazione è basata su dati anatomico-patologici che risultano utili per stabilire la prognosi del paziente, ma poco applicabili nel determinare la resecabilità della lesione. Il Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) ha proposto un sistema di stadiazione per il tumore di Klatskin basato sulla localizzazione e sull'estensione del coinvolgimento duttale, sulla presenza o assenza di invasione portale e di atrofia lobare epatica (tabella 6) (78).

Stadio	Criteri
T1	Tumore che coinvolge la confluenza biliare con o senza estensione unilaterale alle radici biliari di secondo ordine
T2	Tumore che coinvolge la confluenza biliare con o senza estensione unilaterale alle radici biliari di secondo ordine e coinvolgimento della vena porta omolaterale con o senza atrofia lobare epatica omolaterale
T3	Tumore che coinvolge la confluenza biliare con estensione unilaterale alle radici biliari di secondo ordine oppure Estensione unilaterale alle radici biliari di secondo ordine con coinvolgimento della vena porta controlaterale oppure Estensione unilaterale alle radici biliari di secondo ordine con atrofia

	lobare epatica controlaterale oppure Coinvolgimento del ramo principale o bilaterale della vena porta
--	---

Tabella 6. Stadiazione MSKCC del tumore di Klastkin

Questo sistema correla con la resecabilità e la sopravvivenza: il 59% delle lesioni T1 sono resecabili, con una sopravvivenza media di 20 mesi, rispetto allo 0% di resecabilità e ad una sopravvivenza media di soli 8 mesi per le lesioni T3 (78).

TERAPIA

Il CC è un tumore a cattiva prognosi con una sopravvivenza media di 6-12 mesi alla diagnosi (80).

L'unico trattamento curativo rimane la resezione epatica che è, per lo più, attuabile nell'ICC piuttosto che nell'ECC (45%-29%) (21). Purtroppo, anche dopo resezione, il tasso di sopravvivenza a 5 anni risulta inferiore al 50% (13-42%) (81).

Negli ultimi anni, sono state introdotte diverse tecniche palliative con l'obiettivo di prolungare la sopravvivenza dei pazienti e migliorarne la qualità di vita (23); fra queste metodiche palliative ricordiamo il drenaggio biliare, la chemioterapia con Gemcitabina, la radioterapia e la terapia con farmaci biologici come il Sorafenib.

-Resezione chirurgica

La resezione chirurgica con intento curativo è il trattamento di scelta per entrambe le forme di CC, con l'obiettivo di ottenere la completa escissione della neoplasia con margini liberi da neoplasia (R0) (14).

La valutazione preoperatoria comprende un attento esame generale del paziente e una corretta stadiazione della patologia neoplastica; si dovranno, pertanto, valutare le condizioni fisiche, il performance status, il grado di nutrizione e le comorbidità del paziente da un lato, dall'altro andrà valutata l'estensione della malattia, la quantità di parenchima epatico residuo, il coinvolgimento linfonodale e le metastasi a distanza (82) (83).

Gli stadi III e IV della classificazione AJCC dell'ICC e dell'ECC distale sono considerati non resecabili.

I criteri di non resecabilità della forma ilare sono i seguenti:

- estensione ad entrambi i lobi epatici, con coinvolgimento delle radici biliari secondarie;
- estensione ad un solo lobo epatico con coinvolgimento dei rami controlaterali delle vena porta o dell'arteria epatica;
- coinvolgimento dei rami bilaterali della vena porta o dell'arteria epatica
- metastasi intraepatiche o a distanza;
- metastasi linfonodali a distanza;
- comorbidità importanti. (2)

Una tecnica chirurgica introdotta di recente, la resezione en-bloc (2) seguita da ricostruzione vascolare, ha reso possibile in pazienti selezionati una chirurgia radicale anche in casi con coinvolgimento portale, con una mortalità perioperatoria di solo il 10%.

Il ruolo del drenaggio biliare preoperatorio rimane, al momento, controverso. Oggi non viene raccomandato routinariamente, ma ne sono stati dimostrati i benefici in caso di colangite, severa malnutrizione, anomalie della coagulazione e quando è necessaria una resezione epatica estesa (14).

Per la forma ilare, il tipo di resezione si basa sulla classificazione di Bismuth:

- tipo I e II: resezione en-bloc dei dotti biliari extraepatici e della colecisti con linfoadenectomia regionale e successiva epaticodigiunostomia Roux-en-Y;
- tipo III: come sopra più epatectomia destra o sinistra;
- tipo IV: come sopra più epatectomia allargata destra o sinistra.

A questo intervento si deve sempre associare la resezione del lobo caudato che è la sede preferenziale delle metastasi da CC ilare (14).

L'embolizzazione portale preoperatoria, causando ipertrofia del lobo controlaterale, è una tecnica che può risultare utile nel caso di resezioni epatiche estese, che comportino un volume residuo epatico inferiore al 20-25% in pazienti con normale

funzionalità epatica, oppure inferiore al 40% in pazienti con funzionalità epatica già compromessa (84).

La sopravvivenza a 5 anni dopo resezione per la forma ilare del CC è del 25-40% e fattori prognostici favorevoli includono la resezione R0, l'assenza di metastasi linfonodali, di invasione perineurale e il grado istologico ben differenziato (14).

L' ECC distale richiede solitamente una duodenocefalopancreasectomia (intervento di Whipple) con linfadenectomia regionale. La sopravvivenza a 5 anni è del 25-50% (14).

Per quanto riguarda l'ICC, invece, è prevista la segmentectomia o la lobectomia, a seconda dei casi. La linfadenectomia non è raccomandata perché si è visto non migliorare la sopravvivenza, che oggi raggiunge il 40% a 5 anni (14). Fattori prognostici sfavorevoli comprendono margini di resezione positivi, invasione linfatica e vascolare, patologia periduttale infiltrante e scarsa differenziazione cellulare all'istologia (85). La localizzazione più frequente di recidive da ICC, dopo resezione, è intraepatica (86).

-Trapianto di fegato

Il trapianto di fegato rappresenta una terapia emergente per i CC non resecabili con assenza di metastasi a distanza. Sono candidabili i pazienti che richiederebbero un'epatectomia totale per avere margini liberi da neoplasia o con insufficienza epatica tale da impedire la resezione (14).

I risultati fino ad ora ottenuti sono piuttosto scoraggianti, con un tasso di recidiva molto alto e una sopravvivenza a 5 anni del 10-20% (87). Recentemente, grazie all'introduzione della chemioterapia adiuvante e di criteri di selezione molto ristretti, la sopravvivenza, secondo alcuni studi (88) (89), a 5 anni dopo trapianto per CC ilare può raggiungere l'80%, ma questi dati sono da interpretare con molta cautela.

Oggi il trapianto di fegato per CC viene attuato solo in pazienti altamente selezionati e in centri specializzati.

-Chemioterapia

La chemioterapia viene utilizzata come trattamento palliativo nei pazienti affetti da CC metastatico o inoperabile, con un buon performance status e che non possono beneficiare di un trattamento loco-regionale (14).

La Gemcitabina si è dimostrata l'agente più efficace e oggi viene routinariamente utilizzata. Inoltre, sono stati fatti diversi tentativi associando l'uso della Gemcitabina al Cisplatino, Oxaliplatino, Doxorubicina, Epirubicina, ecc (2). Molti di questi studi, però, non sono randomizzati. Pertanto, diventa necessario condurre studi clinici randomizzati di valutazione dei diversi protocolli di trattamento (2).

Il ruolo della chemioterapia neoadiuvante rimane dibattuto, mentre la chemioterapia postoperatoria non ha dimostrato benefici significativi in termini di sopravvivenza (2).

Recentemente, la chemioembolizzazione arteriosa transcatetere (TACE) con Gemcitabina, Cisplatino e Doxorubicina in diverse combinazioni è stata utilizzata in pazienti con ICC non resecabili, con buona tollerabilità. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per provare i benefici di questa tecnica, affinché venga ampiamente accettata dalla comunità scientifica (90).

-Radioterapia

Anche se non ci sono dati conclusivi a riguardo, uno studio ha evidenziato che la radioterapia adiuvante è utile nei pazienti con margini di resezione positivi (R1), per eradicare i residui microscopici di malattia, aumentando la sopravvivenza a 5 anni dal 14% (in pazienti trattati con la sola chirurgia) al 34% (23).

La combinazione di radio e chemioterapia adiuvante sembra dare risultati positivi solo per l'ECC distale e anche in questo caso non ci sono dati sufficienti per raccomandarne l'uso routinario (14).

La radioterapia a scopo palliativo si divide in due forme: radioterapia esterna e radioterapia intraluminale (brachiterapia) e viene utilizzata in pazienti con CC

localmente avanzato non resecabile fornendo benefici in termini di riduzione del dolore, dell'ittero e aumento della sopravvivenza (14).

Essa è, tuttavia, associata a complicanze quali sanguinamento gastrointestinale, stenosi biliare, scompenso epatico, colangiti e aumento del tempo di degenza in ospedale (2) e per questo motivo non viene routinariamente impiegata in molti centri. Sono necessari ulteriori studi per una migliore valutazione dell'efficacia e della sicurezza di questi trattamenti.

Un nuovo approccio brachiterapico per l'ICC è rappresentato dalla radioembolizzazione con microsferi di Itrio-90 (Y90) (14), che consiste nell'introduzione all'interno dell'arteria femorale di un catetere con cui si incanala l'arteria afferente alla neoplasia e attraverso questo catetere vengono iniettate delle microsferi di Y90. Successivamente viene eseguita l'embolizzazione dell'arteria afferente. Questo trattamento si è dimostrato efficace nello stabilizzare la malattia nel 68% dei pazienti, con scarsi effetti collaterali (91) (92). Oggi quindi questa tecnica, nei centri in cui è disponibile, è diventata la modalità principale di palliazione per l'ICC (14).

-Drenaggio biliare

L'ostruzione biliare rappresenta la maggiore causa di morbilità e mortalità nei pazienti con CC. La decompressione biliare è quindi una tecnica palliativa fondamentale per ridurre l'ittero, il dolore, il prurito e per prevenire le colangiti e l'insufficienza epatica da colestasi nei casi inoperabili (23).

1)Stent biliare (14)

Gli stent biliari possono essere posizionati per via endoscopica o percutanea. La via endoscopica è quella più utilizzata, mentre quella percutanea viene riservata ai casi di ICC periferici o in cui la tecnica endoscopica fallisca o non sia possibile.

Esistono stent endoscopici metallici e di plastica (polietilene). I metallici sono più costosi, ma hanno un diametro maggiore, permettendo quindi un miglior drenaggio, e

possono rimanere in sede per più di 9 mesi (93). Quelli in plastica, invece, devono essere sostituiti ad intervalli di 2 o 3 mesi. Il rapporto costo/beneficio per gli stent metallici è quindi favorevole per quei pazienti con un'aspettativa di vita superiore a 5 mesi (94).

Oggi sono disponibili anche stent metallici rivestiti da una membrana che previene la crescita tumorale e quindi impedisce la chiusura dello stent, favorendo il drenaggio per un tempo maggiore.

Gli stent percutanei possono essere interni o esterni. Quelli esterni impediscono il ricircolo enterico degli acidi biliari, causando un maggior malessere per il paziente e riducendone la qualità di vita. Generalmente, quindi, sono candidati al posizionamento di stent percutanei esterni solo quei pazienti con tumori avanzati ed ostruzione biliare completa (14).

2)Drenaggio biliare chirurgico (14)

L'anastomosi bilio-enterica ha il vantaggio di assicurare un miglior drenaggio biliare e di prevenire la necessità di sostituire lo stent.

Oggi il drenaggio biliare chirurgico è indicato in pazienti con CC non resecabile, che non sopporterebbero ripetute sostituzioni endoscopiche o percutanee dello stent e con una lunga aspettativa di vita.

-Terapia fotodinamica

La terapia fotodinamica è una strategia palliativa, che si è dimostrata utile nel migliorare la qualità di vita, favorire il drenaggio biliare e prolungare la sopravvivenza nei pazienti con CC avanzato, solitamente associata al posizionamento di stent biliari.

Essa consiste nella somministrazione endovenosa di agenti fotosensibilizzanti, che vengono captati preferenzialmente dalle cellule neoplastiche. La successiva

applicazione di una luce ad una specifica lunghezza d'onda causa una reazione con necrosi delle cellule tumorali (95).

Recentemente, la terapia fotodinamica è stata utilizzata anche come tecnica neoadiuvante, con buoni risultati.

I principali effetti collaterali sono rappresentati dalla fotosensibilità e dalle colangiti (96) (97).

-Terapia molecolare (2)

La conoscenza della patogenesi molecolare del CC ha aperto la strada all'avvento di nuovi farmaci, che agiscono su specifici bersagli molecolari implicati nella stimolazione della crescita cellulare e nell'inibizione dell'apoptosi.

Il perché della scarsa risposta alla chemioterapia da parte del CC non è completamente chiarito. Potrebbero essere implicate l'iperespressione di geni responsabili di una multifarmacoresistenza e l'iperespressione di proteine antiapoptotiche, quali bcl-2 (98). Le nuove terapie con target molecolare permetterebbero quindi di superare questi ostacoli nel trattamento del CC.

Alcuni farmaci, che hanno come bersaglio le vie patogenetiche essenziali del CC, sono stati approvati dalla FDA e sono impiegati nella terapia di altri tumori. Tra essi, ricordiamo gli inibitori di EGFR (Cetuximab), di VEGF (Sorafenib) e di Her-2 (Trastuzumab) (99).

PARTE SPERIMENTALE

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il recente incremento dell'incidenza dell'ICC e il riscontro della cirrosi epatica come suo fattore di rischio, hanno aperto la strada a un nuovo filone di ricerca: l'ICC insorto su cirrosi. Attualmente, in letteratura, sono presenti solo pochi lavori che analizzano il comportamento vascolare di tale neoplasia alle diverse tecniche d'immagine ed il problema della diagnosi differenziale con l'HCC. Non sono presenti, inoltre, lavori sulla prognosi e sul trattamento di tale neoplasia insorta su cirrosi.

Scopo, innovativo, del nostro lavoro è valutare il comportamento vascolare dell'ICC insorto su cirrosi alle diverse tecniche d'immagine e, successivamente, analizzare la sopravvivenza e il trattamento dei pazienti affetti da tale patologia, ponendo un'attenzione particolare ai possibili fattori correlati con la prognosi.

MATERIALI E METODI

Per condurre lo studio, sono stati raccolti, retrospettivamente, tutti i casi di ICC riscontrati presso il Policlinico S. Orsola-Malpighi di Bologna e presso la Medicina Interna Rossi del Policlinico San Matteo di Pavia, nell'arco di tempo compreso fra il 2005 ed il 2011; sono state, inoltre, stimate le nuove diagnosi di HCC su cirrosi, poste nello stesso periodo, nel Policlinico S.Orsola-Malpighi.

L'analisi è stata ristretta ai soli casi di ICC corrispondenti ai seguenti criteri d'inclusione:

1. Diagnosi di ICC confermata dal punto di vista anatomico-patologico tramite biopsia e/o resezione epatica;
2. Noduli insorti su cirrosi epatica.

Sono stati, pertanto, esclusi tutti i casi di epato-colangiocarcinoma.

Il nostro lavoro è stato diviso in due fasi:

- FASE I: analisi dei pazienti, con particolare attenzione alla loro storia clinica, all'anamnesi, al successivo trattamento e alla sopravvivenza generale. Per raccogliere queste informazioni ci siamo avvalsi dell'ausilio delle cartelle informatizzate (in cui era raccolta la storia clinica dei diversi pazienti) e, quando possibile, del ausilio del paziente stesso.

Nel corso dello studio, sono stati indagati diversi fattori (età del paziente alla diagnosi, funzione epatica, bilirubina totale, albumina, INR, valore del CA 19-9, presenza o meno di varici o di diabete mellito, pazienti in follow up, dimensioni del nodulo maggiore, malattia mono o multifocale, malattia metastatica, tipo di trattamento) al fine di individuare l'eventuale esistenza di variabili correlate alla sopravvivenza nei pazienti affetti da ICC su cirrosi; attraverso il software di statistica SPSS (INC., Chicago, Illinois, USA, 1999) è stata analizzata, mediante curva di Kaplan-Meier, un'eventuale correlazione fra la sopravvivenza ed i diversi fattori citati sopra. Successivamente è stata eseguita un'analisi multivariata (regressione di Cox) fra tutti i parametri che raggiungevano, all'analisi univariata, un $p < 0,10$; è stato valutato significativo solo ciò che all'analisi multivariata aveva raggiunto un $p < 0,05$.

- FASE II: analisi del comportamento contrastografico dei noduli di ICC alle diverse tecniche d'immagine (CEUS, RM con mdc, TC con mdc) con particolare attenzione al ruolo delle stesse nella diagnosi differenziale fra ICC e HCC su cirrosi.

CEUS: è stato, dapprima, eseguito uno studio dei noduli in ecografia di base (b-mode) e, successivamente all'iniezione di mezzo di contrasto ecografico (SonoVue, Bracco), è stato analizzato il loro comportamento vascolare descrivendo le 3 fasi: arteriosa, portale e tardiva; in accordo con le linee guida EFSUMB aggiornate al 2008 è stata posta diagnosi di ICC in presenza di un wash out marcato; è stato, inoltre, valutato, quando presente, l'orientamento diagnostico proposto dall'ecografista nel referto.

TC con mdc: è stata eseguita analisi del comportamento vascolare dei noduli dopo somministrazione di mezzo di contrasto (Iomeron 350) distinguendo le tre fasi: arteriosa, portale e tardiva.

RM con mdc: sono state valutate le sequenze pesate T1 e T2 e, dopo somministrazione di mezzo di contrasto (Gadolinio o Primovist), le 3 fasi vascolari: arteriosa, portale e tardiva. Qualora il mezzo di contrasto utilizzato fosse stato il Primovist (Bayer) è stata valutata anche la fase epatospecifica.

Si fa presente che, al fine di identificare correttamente il pattern vascolare, abbiamo sottoposto ad un radiologo esperto le diverse immagini radiologiche. Qualora ciò non fosse possibile per mancanza di immagini radiologiche ci siamo affidati al referto stesso dell'indagine.

RISULTATI

Anamnesi, trattamento e sopravvivenza dei pazienti affetti da ICC

-Caratteristiche Biumorali dei pazienti

Nel periodo di tempo definito sopra, nel Policlinico S.Orsola-Malpighi, sono state poste circa 850 nuove diagnosi di HCC e 14 diagnosi di ICC su cirrosi (1,6% dei noduli neoplastici insorti su cirrosi); in quello stesso arco di tempo, nella Medicina Interna Rossi del Policlinico di Pavia sono stati diagnosticati 16 casi di ICC su cirrosi.

Nel nostro studio sono stati, pertanto, inclusi 30 pazienti con diagnosi istologica di ICC su cirrosi. Tale casistica, così costituita, raccoglieva 22 maschi e 8 femmine con un'età mediana alla diagnosi di 65 anni (range 45-77 anni). Il follow up medio dei pazienti è stato di 30 mesi (range 4-86).

L'eziologia della cirrosi è risultata eterogenea, comprendendo 15 casi secondari ad infezione da HCV, 3 da HBV, 2 da HBV-HCV, 7 da assunzione di alcol, 1 da steatoepatite e 2 criptogenetiche.

La maggior parte dei pazienti presentava una buona funzione epatica alla diagnosi; 20 pazienti su 30 ricadevano nella fascia A5 dello score di Child-Pugh (CPT), 5 erano A6, 3 erano B7 e 2 B8.

Dei 30 pazienti inclusi, 15 erano seguiti con follow up (FU) ecografico per la presenza di cirrosi e 1 per un pregresso carcinoma del colon retto; per tale motivo il riscontro del nodulo è avvenuto nel corso di un programma di sorveglianza. Per i 14 rimanenti, non in FU, il riscontro del nodulo è avvenuto casualmente o nel corso di accertamenti per sintomatologia aspecifica.

La maggior parte dei pazienti presentava, alla diagnosi, un singolo nodulo epatico; solo 3 pazienti avevano più di 3 noduli. La dimensione mediana dei noduli era 40 mm. Abbiamo analizzato, inoltre, la differenza fra la dimensione media e la mediana dei noduli di maggiori dimensioni fra i pazienti in FU e i pazienti non in FU. I pazienti in FU presentavano una dimensione media di 31 mm con una mediana di 30 mm, mentre i pazienti non in FU presentavano una dimensione media di 47 mm con una mediana di 45 mm.

Nessuno dei pazienti, al momento della diagnosi, presentava trombosi portale neoplastica o metastasi a distanza.

Nella tabella 7 riportata qui di seguito sono descritte le principali caratteristiche cliniche e i parametri bioumorali dei pazienti in studio.

Età, mediana (range)	65 anni (45-77)
Sesso (M/F)	22/8
Eziologia della cirrosi:	
HCV	15
Alcol	7
HBV	3
Criptogenetica	2
HBV-HCV	2
NASH	1
Child Pugh Score (%)	
A5	20 (67%)
A6	5 (16%)
B7	3 (10%)
B8	2 (7%)
Encefalopatia ----n (%)	
Assente	30 (100%)
Ascite ----n (%)	
Assente	27 (90%)
Presente	3 (10%)
Diabete Mellito (sì/no)	7/23
Varici esofagee (no/F1/F2)	20/7/3
Albumina, mediana (range)	3.6 g/dl (2.8-4.5)
Bilirubina Totale, mediana (range)	0.82 mg/dl (0.31-2.87)
INR, mediana (range)	1.17 (1.02-1.61)
Alfa-fetoproteina, mediana (range)	7 ng/dl (1-126)
Ca 19-9, mediana (range)	34 U/ml (1-10.000)
Numero di noduli per paziente (1/2/3/>3)	21/4/2/3
Dimensione dei noduli, mediana (range)	40 (10-110)
Trombosi neoplastica o metastasi —n (%)	
Assente	30 (100%)
Follow up (sì/no)	16/14

Tabella 7. Nella tabella sono raccolte le principali caratteristiche bioumorali e cliniche dei pazienti arruolati.

- Trattamento

Dopo la diagnosi, 12 pazienti sono stati sottoposti a intervento di resezione epatica; l'esame istologico post resezione ha evidenziato che in 5 di questi casi la resezione risultava incompleta per la presenza di infiltrazione dei margini o per margine libero da malattia inferiore a 1 cm. Un paziente è stato trapiantato con diagnosi erronea di HCC, per uno dei noduli minori. Altri 11 pazienti sono stati sottoposti a un trattamento considerato curativo, cioè a trattamento di Radiofrequenza (RF) percutanea o intraoperatoria; alla luce di tale dato possiamo affermare che 24 dei pazienti in studio sono stati sottoposti ad una terapia curativa. Dei restanti 6 pazienti, 2 sono stati sottoposti a chemioembolizzazione (TACE), 1 a radioembolizzazione con Y90, 2 a chemioinfusione (TAE) con successiva RF e 1 a terapia sistemica con gemcitabina.

Abbiamo effettuato una sottoanalisi mirata a capire se il riscontro dei noduli in regime di follow up potesse aver influito sulle scelte terapeutiche successive e abbiamo riscontrato che su 16 pazienti in follow up, 13 sono stati sottoposti a trattamenti curativi, mentre, dei restanti tre, 1 è stato sottoposto a chemioterapia con gemcitabina, 1 a radioembolizzazione con Y 90 e 1 a TACE.

Dei 14 pazienti che non erano in follow up, 11 sono stati sottoposti a trattamento curativo, mentre, degli altri tre, 2 sono stati sottoposti a TAE con successiva RF e 1 a TACE.

-Sopravvivenza

La sopravvivenza mediana globale è stata di 22 mesi, con una media di 30 mesi. Dei 30 pazienti, a febbraio 2012, 17 sono deceduti, mentre 13 risultavano ancora in vita. Dei pazienti in FU, 10 erano ancora in vita mentre 6 sono deceduti, dei pazienti non in FU 11 sono deceduti mentre 3 erano ancora in vita.

L'analisi univariata ha identificato alcuni fattori che presentano una correlazione statisticamente significativa con la sopravvivenza.

In particolare è stata evidenziata la presenza di una correlazione ($p= 0,027$) fra la sopravvivenza e l'essere inseriti in un programma di sorveglianza; infatti, i pazienti in

FU presentavano una sopravvivenza maggiore rispetto ai pazienti non in FU (Fig. 6)

followup	Mean(a)				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
0	29,538	6,745	16,319	42,758	22,000	4,194	13,780	30,220
1	55,233	9,294	37,017	73,449	48,000	.	.	.
Overall	42,703	6,230	30,493	54,914	29,000	14,173	1,222	56,778

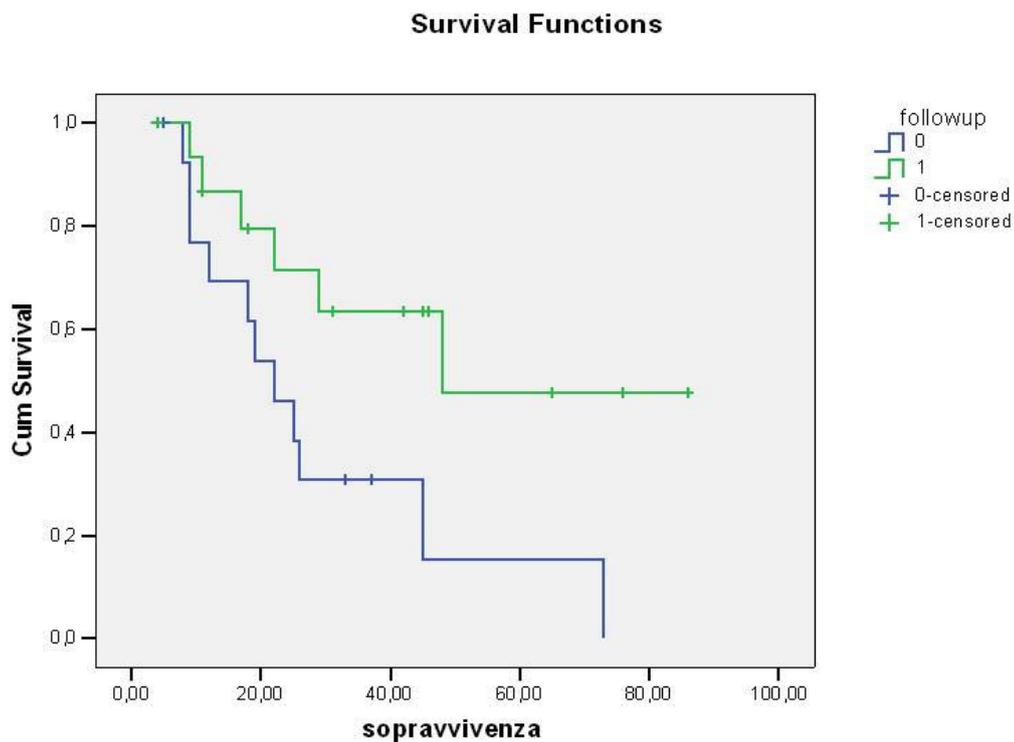


Fig. 6. Nelle parte alta della figura si può evidenziare la differenza di sopravvivenza media e mediana, espressa in mesi, fra i pazienti in FU e quelli non in FU. Nella parte inferiore della figura si può vedere la curva di sopravvivenza delle due popolazioni.

Altro dato che correla con la sopravvivenza, all'analisi univariata, è la dimensione dei noduli. Per eseguire tale indagine è stato preso come valore di riferimento la mediana dei noduli (40 mm). L'analisi univariata ha evidenziato una sopravvivenza media di 51,2 mesi per i noduli \leq a 40 mm e una sopravvivenza media di 25,8 mesi per i noduli $>$ 40 mm ($p=0,017$). (Fig.7)

Diam nodulo magg4	Mean ^a			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
<0=4	51,264	8,338	34,921	67,607
>4cm	25,800	7,890	10,335	41,265
Overall	42,703	6,230	30,493	54,914

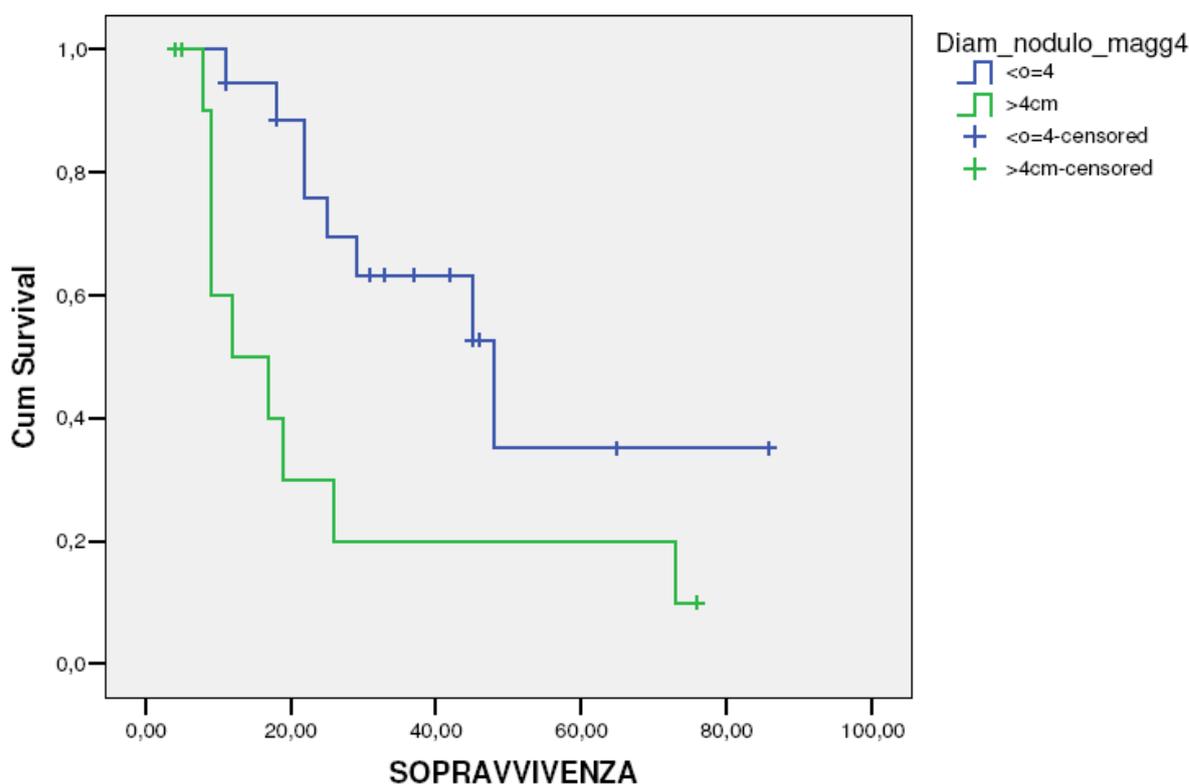


Fig.7. Nella parte alta della figura si può evidenziare la differenza di sopravvivenza media, espressa in mesi, fra i pazienti con nodulo di dimensioni inferiori o uguali a 4 cm e quelli con dimensioni maggiori ai 4 cm. Nella parte inferiore della figura si può vedere la curva di sopravvivenza delle due popolazioni.

Un ulteriore dato correlato con la sopravvivenza nella nostra casistica è il valore di CA19-9. E' stato preso come cut off la mediana del valore di CA 19-9, cioè, 30 U/ml e con tale valore è stata evidenziata una correlazione con $p=0,031$. (Fig.8)

Ca19_9_2	Mean ^a			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
<0=30	64,238	10,398	43,858	84,617
>30	30,800	7,850	15,414	46,186
Overall	44,626	7,219	30,477	58,774

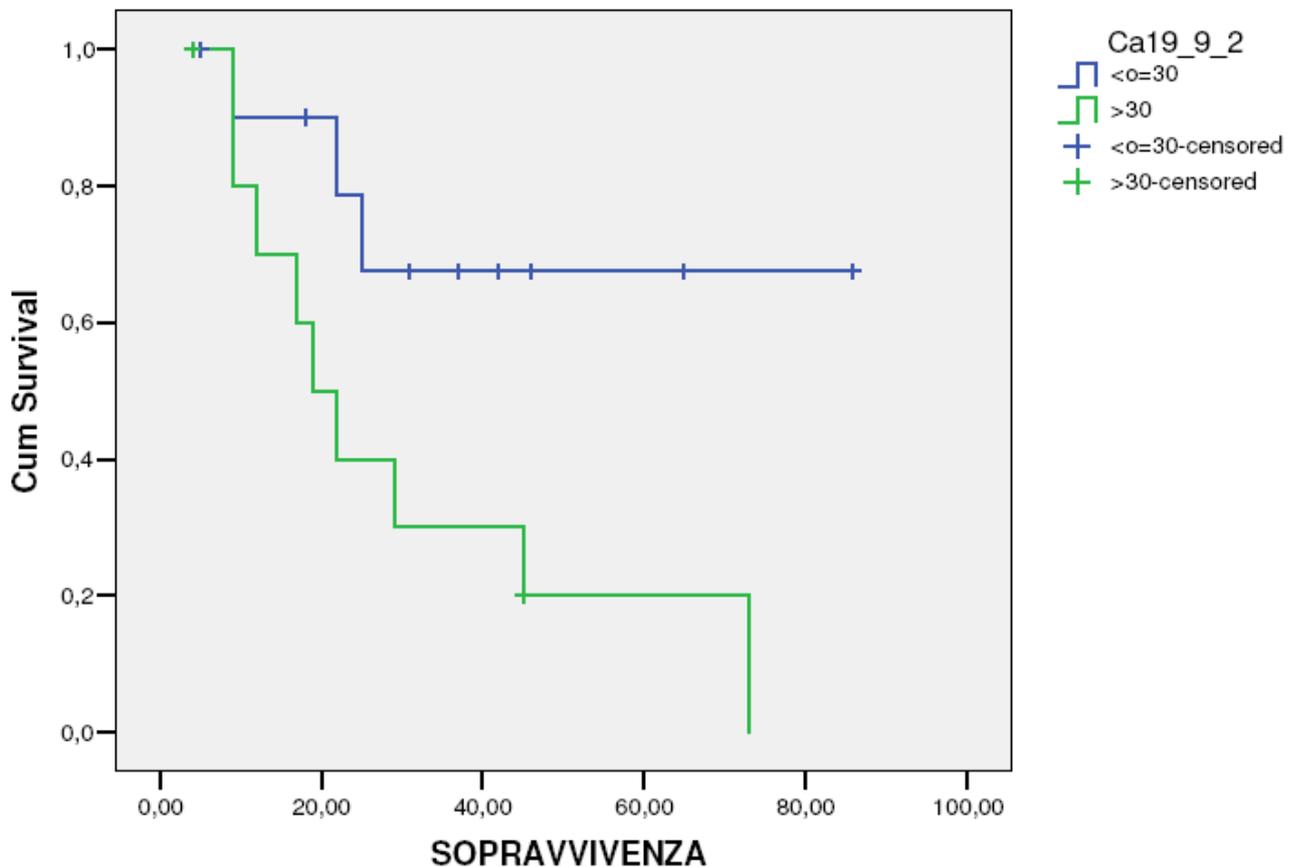


Fig.8. Nella parte alta della figura si può evidenziare la differenza di sopravvivenza media, espressa in mesi, fra i pazienti con valore di CA19-9 inferiore o uguale a 30 U/ml e quelli con valore superiore. Nella parte inferiore della figura si può vedere la curva di sopravvivenza delle due popolazioni.

Un elemento che, invece, non è risultato correlato con la sopravvivenza, è l'esecuzione di trattamenti curativi. Tale dato era stato valutato in quanto la nostra casistica studiava pazienti con una neoplasia insorta su cirrosi epatica. La cirrosi riduce, normalmente, la funzione del fegato; pertanto trattamenti potenzialmente curativi potrebbero risultare dannosi in un quadro di ridotta funzionalità epatica.

Nella nostra casistica, la sopravvivenza media dei pazienti sottoposti a trattamenti curativi è di 45,6 mesi, mentre la sopravvivenza dei pazienti non sottoposti a trattamenti curativi è di 21,8 mesi. Tuttavia, nonostante la sproporzione fra le due sopravvivenze medie, non è stata raggiunta la significatività statistica ($p= 0,26$). (Fig.9) Tale dato può essere legato al fatto che il gruppo dei trattamenti palliativi era piuttosto esiguo e i valori presentavano una distribuzione molto ampia. Segnaliamo, inoltre, un possibile limite dell'analisi: 3 dei 6 pazienti non sottoposti a trattamento curativo presentavano già al momento della diagnosi un'alterazione (anche se modesta) della funzione epatica (2 erano in classe B7 di CPT e 1 in classe B8).

trattamento curativo	Mean ^a			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
no	21,889	4,677	12,722	31,056
sì	45,659	6,942	32,053	59,265
Overall	42,703	6,230	30,493	54,914

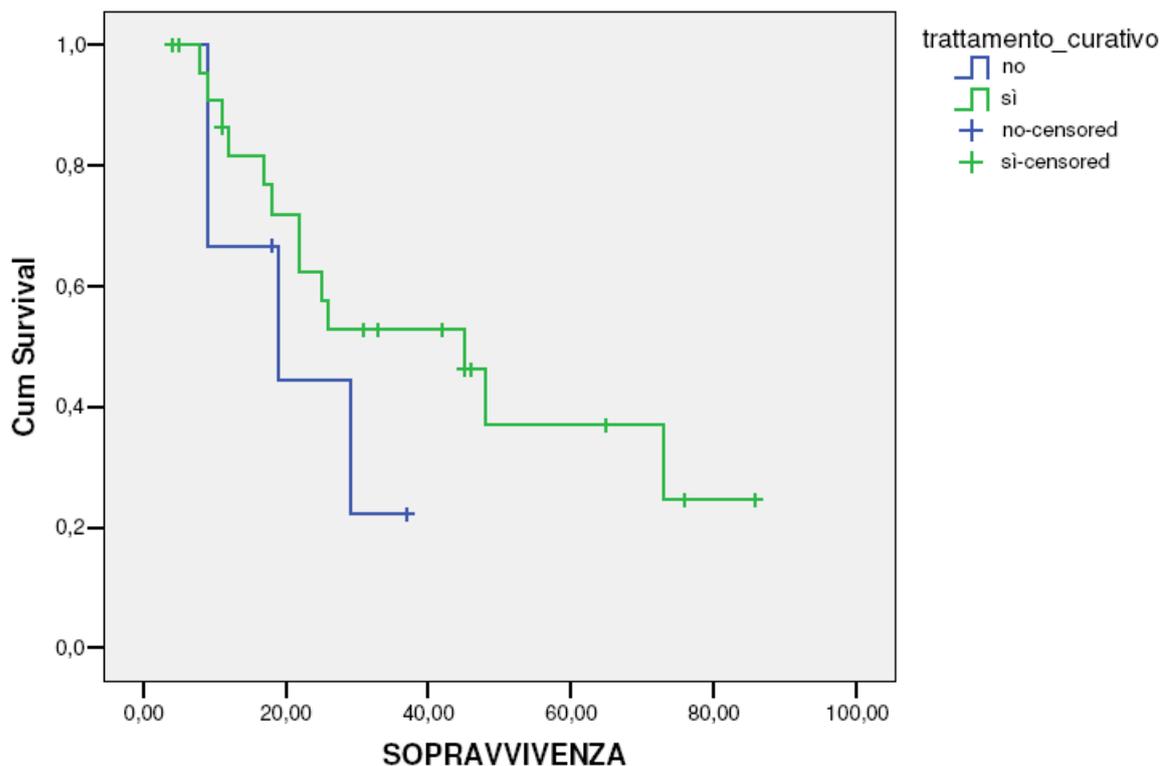


Fig.9. Nelle parte alta della figura si può evidenziare la differenza di sopravvivenza media, espressa in mesi, fra i pazienti trattati con trattamento curativo e quelli con trattamento palliativo. Nella parte inferiore della figura si può vedere la curva di sopravvivenza delle due popolazioni.

Nel corso dello studio è stata valutata anche la correlazione della sopravvivenza con altri fattori, quali l'età del paziente alla diagnosi, il CPT, la presenza di varici esofagee, il diabete mellito, il valore di INR, albumina e bilirubina totale, la mono o multifocalità della neoplasia; tale indagine non ha tuttavia evidenziato ulteriori correlazioni.

E' stata quindi condotta un'analisi multivariata analizzando la correlazione del follow up, delle dimensioni del nodulo e del valore di CA 19-9. All'analisi multivariata eseguita tramite regressione di Cox l'unico parametro risultato significativamente correlato alla sopravvivenza è stata la dimensione del nodulo inferiore o uguale a 4 cm ($p = 0,004$).

-Diagnosi tardive

Nel corso dello studio abbiamo visto che 3 pazienti, in follow up per una cirrosi epatica nota, hanno ricevuto una diagnosi tardiva di ICC su cirrosi non per una mancanza di riscontro del nodulo alle tecniche d'immagine, quanto per una mancanza di aggressività dei medici nel voler raggiungere una diagnosi della natura dei noduli.

Paziente	Ritardo nella diagnosi	Effettuata biopsia in precedenza	Strumento diagnostico	trattamento
1	18	No	Resezione	Resezione
2	22	No	Resezione	Resezione
3	18	Sì	Biopsia	TACE

Tabella.8

Dalla tabella 8 si evince che uno dei tre pazienti era già stato sottoposto a una biopsia del nodulo, risultata non diagnostica e, nonostante la successiva progressiva crescita del nodulo, la biopsia non era stata più ripetuta fino all'arrivo nel nostro centro. Il secondo paziente non era stato sottoposto a biopsia dopo le tre tecniche d'immagine per decisione del Medico Curante, mentre il 3° paziente non era stato sottoposto a

biopsia in quanto il nodulo non era chiaramente visibile all'ecografia ed era localizzato in una posizione difficilmente raggiungibile.

In 2 pazienti la diagnosi è stata raggiunta a 18 mesi dal primo riscontro del nodulo mentre nell'ultimo caso la diagnosi è stata posta 22 mesi dopo. In un caso la diagnosi è stata raggiunta con una nuova biopsia del nodulo quando purtroppo la lesione non era più suscettibile di trattamento curativo e il paziente è deceduto a 10 mesi dalla diagnosi, mentre nei due casi rimanenti la diagnosi è stata posta dopo resezione epatica, risultata non radicale in entrambi i casi.

Comportamento dei noduli alle diverse tecniche d'immagine

Dei 30 pazienti raccolti 21 pazienti presentavano un nodulo singolo, 4 presentavano due noduli, 2 avevano 3 noduli all'istologia (solo uno dei due pazienti aveva tutti tre i noduli visibili alle diverse tecniche d'immagine), mentre 3 pazienti presentavano un quadro multinodulare in cui spiccava un nodulo dominante.

Nella tabella 9 di seguito riassumiamo il numero dei noduli per paziente e le tecniche d'immagine a cui sono stati sottoposti.

Paziente	Num. Noduli	CEUS	TC	RM	Tecniche che hanno portato a erronea diagnosi di HCC
1	1	X	X	X	
2	1	X	X	X	
3	3	X	X	X	
4	2	X	X	X	
5	>3	X	X		
6	1	Non vede il nodulo	X		TC
7	1	X	X	X	
8	>3		X	X	
9	2	X	X	X	
10	1	X	X		
11	1	Non vede il nodulo	X	X	
12	3	X	Non vede il nodulo	X	
13	1	X	X		
14	>3	X	X		CEUS, TC
15	1	X	X		
16	1	X	X		CEUS
17	1	X	X		
18	1	X	X		
19	1	X	X		CEUS
20	1	X	X		TC
21	1	X	X		
22	1	X	X		
23	1	X			
24	1	X	X		TC
25	1	X	X		TC
26	2	X	X	X	
27	1	X	X		
28	2	X	X		TC
29	1	X	X		TC
30	1	X		X	CEUS RM

Tabella 9

-CEUS

Nella nostra casistica sono state eseguite 29 ecografie per lo studio dei noduli. In 12 casi i noduli erano disomogenei, in 11 casi erano ipoecogeni, in 2 casi iperecogeni, in 2 casi non era descritta l'ecografia di base e in 2 casi i noduli non erano visibili. La CEUS è stata eseguita solo sui noduli visibili all'ecografia di base; segnaliamo che di due casi non è disponibile il referto e per tale ragione la CEUS è stata analizzata solo in 25 casi. Riportiamo nella figura 10 i diversi comportamenti vascolari evidenziati dalla CEUS nei noduli di ICC.

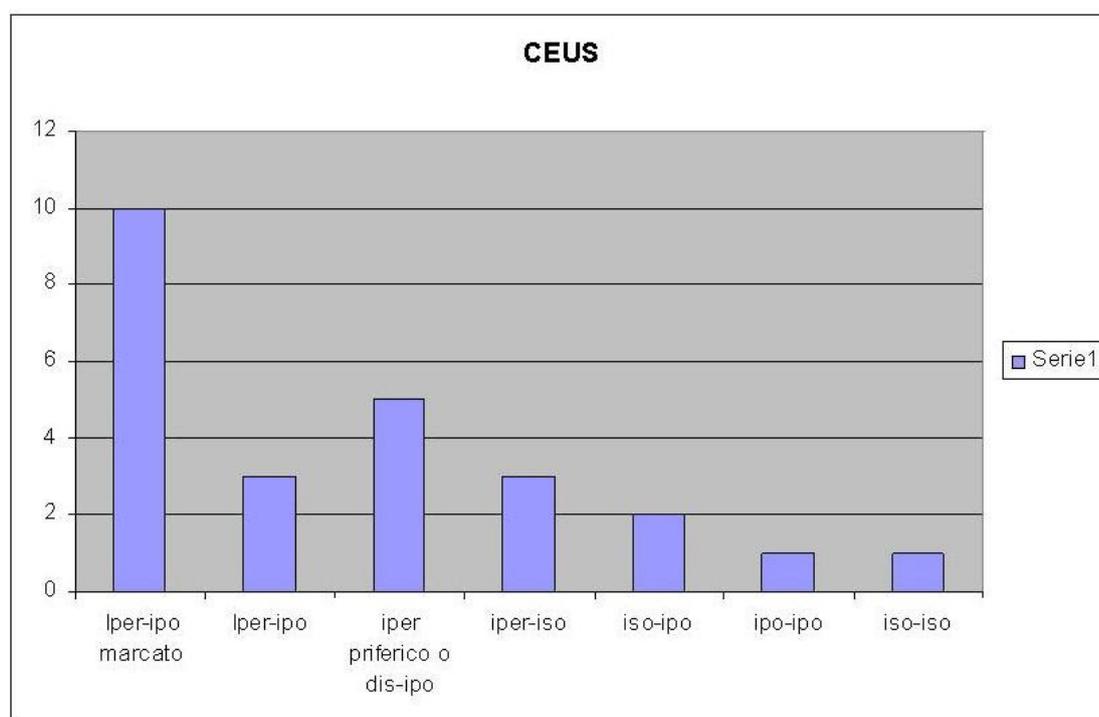


Figura 10. Nella tabella è riportata la descrizione dei principali comportamenti vascolari dei noduli di ICC alla CEUS.

Come si può dedurre dal grafico il principale comportamento contrastografico (10 casi) dei noduli di ICC alla CEUS è stato un enhancement arterioso seguito da wash out marcato (comportamento sospetto per CC) (Fig. 11 e 12); in uno solo di questi casi l'ecografista ha erroneamente posto diagnosi di HCC su cirrosi. Altri 5 pazienti presentavano un wash out marcato preceduto, tuttavia, da un enhancement atipico per HCC (ring periferico o enhancement disomogeneo).



Fig. 11. Nella figura è riportata l'analisi CEUS di un nodulo di ICC. Nella parte sinistra si evidenzia un enhancement sfumato in fase arteriosa seguito da un wash out marcato in fase portale.

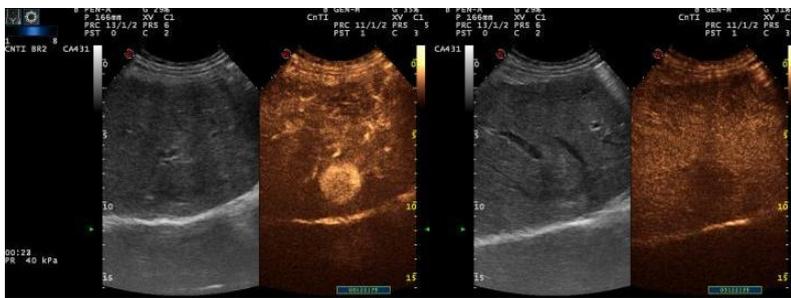


Fig. 12. La figura evidenzia il comportamento vascolare tipico di un HCC insorto su cirrosi. Nella parte sinistra della figura è rappresentata l'iperecogenicità in fase arteriosa del nodulo (che appare più evidente rispetto ai noduli di ICC); nella parte destra della figura è rappresentato il wash out in fase portale (meno evidente rispetto al wash out del nodulo di ICC).

In questo caso non ci sono state false diagnosi di HCC. E' importante segnalare, invece, che 3 pazienti (12%) hanno presentato un quadro ecografico realmente suggestivo per HCC ovvero enhancement arterioso con progressivo e sfumato wash out. Dei restanti casi, 3 erano iperecogeni in fase arteriosa con isoecogenicità nelle restanti fasi, 2 avevano solo wash out in fase tardiva, 1 era isoecogeno in tutte le fasi e 1 era ipoecogeno in tutte le fasi. Dai dati analizzati non emergeva l'esistenza di una correlazione fra il pattern vascolare osservato e la dimensione dei noduli in studio.

-TC con mdc

28 pazienti sono stati sottoposti a TC addome con mdc; in un caso la TC non riusciva a individuare il nodulo, mentre in 7 casi (26%) poneva diagnosi erronea di HCC; è stato esaminato se il rischio di alterata diagnosi dipendesse dalla dimensione del nodulo in studio e si è visto che non esiste una correlazione fra il comportamento

vascolare e la dimensione del nodulo in studio. Nella figura 13 è riportato il diverso comportamento vascolare dei noduli di ICC alla TC con mdc.

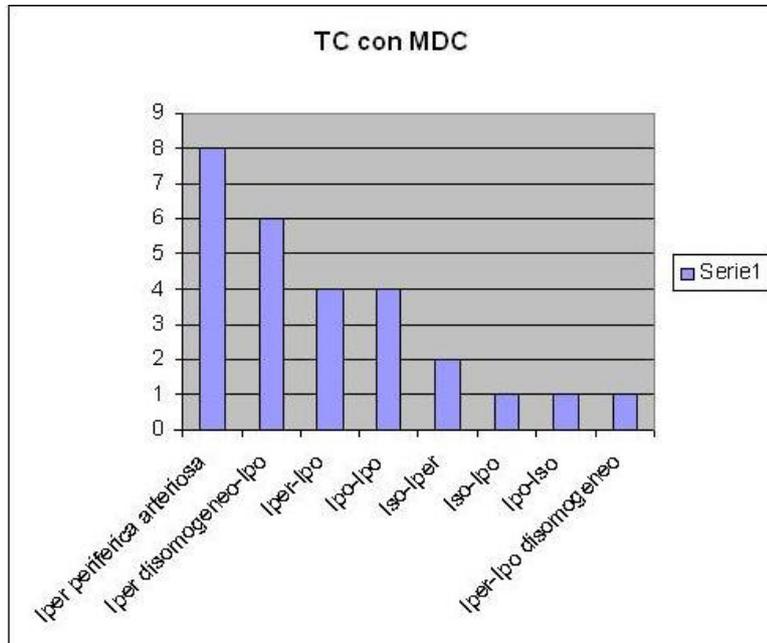


Fig. 13. Nel grafico sono riportati i diversi comportamenti vascolari dei noduli di ICC alla TC addome con mdc.

Il comportamento più frequente (8 pazienti) era rappresentato da un ring periferico iperdenso in fase arteriosa (Fig.14); tale fase arteriosa poteva poi evolvere in maniera differente: in 2 casi la lesione diveniva omogeneamente ipodensa, in 3 casi isodensa (talvolta con alcune areole ipodense), in 1 caso il ring diventava isodenso con centro ipodenso e in 2 casi permaneva iperdensità periferica con centro ipodenso.

4 pazienti presentavano un omogeneo enhancement con successivo wash out.

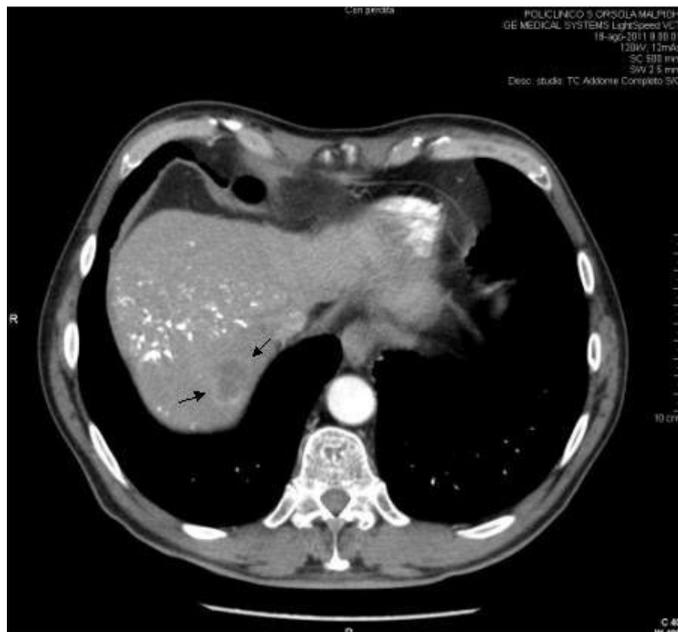


Fig. 14. Fase arteriosa di una TC addome con mdc, eseguita su uno dei noduli di ICC della nostra casistica. Le frecce indicano il caratteristico ring periferico iperdenso con ipodensità centrale.

6 pazienti presentavano un enhancement disomogeneo con wash out nelle fasi successive (1 scambiato per HCC); in 4 casi la lesione appariva costantemente ipodensa (talvolta con alcune areole disomogenee all'interno), in 1 caso presentava ipodensità centrale solo in fase tardiva, in 2 casi iperdensità in fase tardiva; in 1 caso si aveva ipodensità arteriosa con successiva omogenea isodensità e 1 caso, scambiato per HCC, evidenziava enhancement arterioso con wash out disomogeneo.

Abbiamo, inoltre, confrontato la presenza di wash out in fase tardiva alla CEUS con la presenza del wash out in fase tardiva alla TC; 5 casi (20%), che non risultavano ipodensi alla TC in tale fase, presentavano wash out alla CEUS. Tale dato trova giustificazione nel fatto che il mdc della TC non è un mdc esclusivamente endovascolare ma diffonde nello spazio extravascolare; il mdc della CEUS è solamente endovascolare e pertanto riflette esclusivamente il comportamento vascolare del nodulo in analisi .

-RM addome con mdc

Sono state eseguite 11 RM addome con mdc; di queste 1 caso non è stato valutato in quanto non erano disponibili le immagini radiologiche e la descrizione delle diverse

fasi vascolari nel referto appariva piuttosto vaga (il radiologo refertava solamente comportamento sospetto per metastasi). (Fig.15)

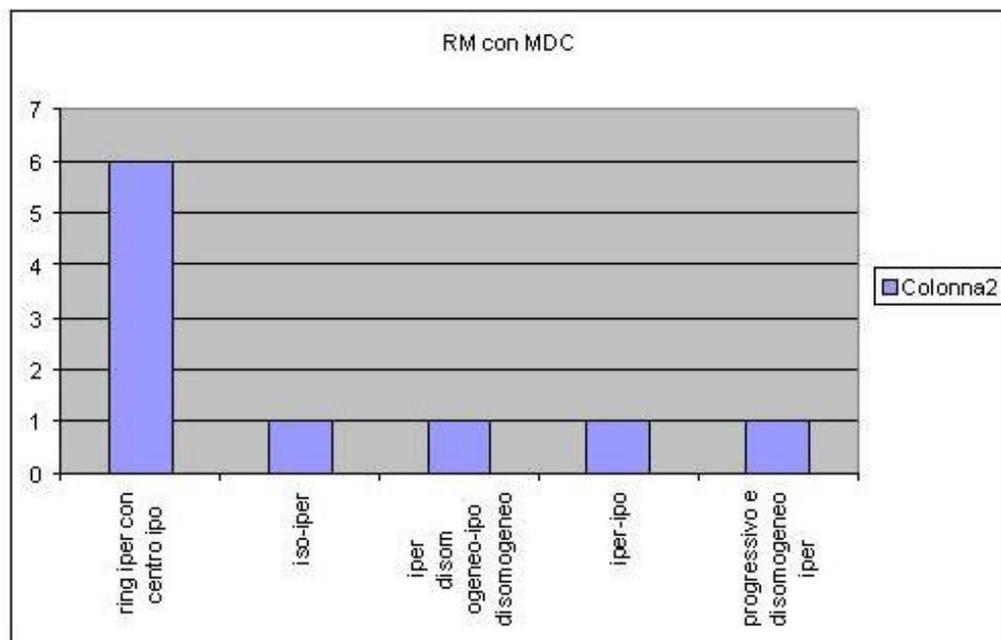


Fig. 15. Nel grafico sono riportati i principali comportamenti vascolari dei diversi noduli di ICC del nostro studio.

La fase T1, descritta in 9 casi, era sempre ipointensa, mentre la T2 era omogeneamente iperintensa in 4 casi e in 5 casi solo a livello periferico.

Per quanto riguardava, invece, il comportamento vascolare dei noduli di ICC alla RM, in 1 solo caso (10%) il comportamento vascolare del nodulo evidenziava un enhancement arterioso con successivo wash out in fase tardiva ed è stato, pertanto, scambiato per HCC. Anche in questo caso non è stata riscontrata una correlazione fra il comportamento vascolare e la dimensione del nodulo in studio.

In 6 casi la RM mostrava un'iperintensità periferica ad anello con porzione centrale ipointensa in fase arteriosa (Fig.16); la fase portale e tardiva era piuttosto variabile: in 2 casi il ring diveniva iso-intenso con centro ipointenso, in 1 caso il centro diveniva disomogeneamente iperintenso, in 1 caso ring ipointenso con centro iperintenso, in 1 caso tutta la lesione ipointensa e in 1 caso rimaneva uguale in tutte le fasi.



Fig. 16. Fase arteriosa di una RM addome con mdc di uno dei noduli di ICC appartenenti alla nostra casistica. La freccia mostra il caratteristico ring periferico iperintenso con ipointensità centrale.

Nei restanti casi abbiamo evidenziato un nodulo isointenso in fase arteriosa con iperintensità in fase tardiva, 1 nodulo con enhancement e wash out disomogenei, 1 nodulo con disomogeneo enhancement progressivo e 1 nodulo, come già detto, con enhancement omogeneo seguito da wash out e scambiato per HCC.

Solo in 5 casi il mezzo di contrasto utilizzato è stato il Primovist (Acido Gadoxetico); in tutti questi casi la fase epatospecifica era risultata ipointensa.

DISCUSSIONE

Il primo dato che emerge dal nostro studio è che, nonostante l'incidenza dell'ICC su cirrosi sia in aumento, stiamo ancora parlando di una neoplasia poco frequente che, nella nostra casistica, rappresenta circa l'1,6% dei noduli neoplastici insorti su cirrosi. Tale dato appare sostanzialmente sovrapponibile a quanto descritto da Sangiovanni in uno studio pubblicato su Gut (100) sulla natura dei noduli insorti su cirrosi.

Dai dati raccolti si evince che il programma di sorveglianza nei pazienti cirrotici aiuta a identificare i noduli di ICC quando sono ancora di "piccole" dimensioni con un incremento di sopravvivenza di 25,7 mesi rispetto ai pazienti non in sorveglianza. Tale dato è, tuttavia, da valutare criticamente poiché al momento non è stato ancora studiato il lead time dell'ICC insorto su cirrosi. Sulla base delle presenti

considerazioni, l'incremento della sopravvivenza potrebbe essere correlabile solamente all'aumento del tempo di osservazione secondario alla diagnosi più precoce senza un reale guadagno in termini di sopravvivenza globale; pertanto, tale riscontro, apre le porte a ulteriori studi di conferma.

Un dato che correla in maniera significativa con la sopravvivenza alla multivariata è la dimensione del nodulo inferiore a 4 cm. Questo può essere legato alla sopravvivenza attraverso diversi fattori: pazienti con noduli più piccoli possono avere una sopravvivenza maggiore perché sono più suscettibili di trattamenti curativi o perché iniziano il periodo di osservazione prima degli altri pazienti con noduli di dimensioni maggiori.

E' importante soffermarsi su un limite di questa multivariata: follow up, dimensioni del nodulo e valori di CA 19-9, dal punto di vista clinico, sono tre parametri correlati fra loro; infatti, i pazienti in follow up trovano, per lo più, noduli di dimensioni ridotte e i valori di CA 19-9, solitamente, correlano con l'estensione della malattia. Per tale ragione questi parametri non sarebbero dovuti entrare nella stessa analisi multivariata. Per valutare il grado di correlazione fra le diverse variabili è stato eseguito test di χ^2 . Nessuno dei parametri è risultato significativamente correlato all'altro e, pertanto, sono stati inseriti nella stessa analisi multivariata. E', però, importante sottolineare come la mancanza di correlazione delle tre variabili suddette nel nostro studio non rispecchi una reale assenza di correlazione fra i diversi parametri; tale dato può infatti derivare dall'esiguità della popolazione del nostro studio.

Ulteriore dato d'interesse, per quanto all'univariata non raggiunga la significatività statistica, è la differenza di sopravvivenza in termini di mesi fra i pazienti sottoposti a trattamenti curativi e quelli sottoposti a trattamenti palliativi. Tale dato deriva molto probabilmente dalla scarsa confrontabilità numerica dei due gruppi; ricordiamo, infatti, che l'unico trattamento efficace per l'ICC è la resezione o in alternativa la RF per cui, fatta eccezione per i pazienti con controindicazioni assolute, il trattamento risulta il più aggressivo possibile. Un ulteriore elemento da valutare è che la

neoplasia che stiamo analizzando è insorta su cirrosi epatica. Per tale ragione il trattamento deve tener conto non solo dell'estensione della neoplasia, ma anche della funzione epatica residua. Quindi, nel riportare questo dato non possiamo prescindere dal fatto che il 50% dei pazienti non trattati con metodica curativa aveva già una modesta compromissione della funzione epatica e, di conseguenza, una sopravvivenza spontanea inferiore rispetto ai pazienti con funzione epatica perfetta. Segnaliamo, come ulteriore via di discussione, il caso del paziente trapiantato per HCC su cirrosi al quale è stato successivamente diagnosticato (sul fegato espantato) la presenza di un ICC; il paziente ha ben tollerato il trapianto, non vi sono stati segni di recidiva ed è tuttora in vita a 86 mesi dal trapianto. Anche in questo caso sono necessari ulteriori studi per identificare criteri adeguati alla selezione dei pazienti candidabili per tale trattamento.

Per quanto riguarda le tecniche d'immagine, non emerge un comportamento univoco dell'ICC su cirrosi alle diverse metodiche.

Il comportamento maggiormente descritto alla RM nelle fasi precontrastografiche è un'ipointensità in T1 con un'iperintensità omogenea o periferica in T2; la fase che maggiormente guida nella diagnosi di ICC è la fase arteriosa caratterizzata da un enhancement periferico con centro ipointenso. Nella fase tardiva il comportamento della lesione non appare univoco.

La fase epatospecifica del Primovist, quando presente, è risultata ipointensa nel 100% dei casi e pertanto può essere utilizzata come sussidio diagnostico in quei pazienti in cui non si ha wash out nella fase tardiva.

Il comportamento più frequente alla TC è un ring periferico iperdenso in fase arteriosa, mentre in fase portale e tardiva non si ha un comportamento univoco. Per quanto riguarda la CEUS, per lo più si ha un enhancement che può essere omogeneo o solo periferico seguito da un wash out marcato.

I casi di erronea diagnosi di HCC delle diverse tecniche diagnostiche sono stati 3 per la CEUS, 7 per la TC e 1 per la RM, che quindi si conferma come la metodica

migliore per la diagnosi differenziale fra le diverse lesioni epatiche in particolare se viene utilizzato un mezzo di contrasto epatospecifico.

Da questi dati deriva la consapevolezza che non esiste, al momento, una tecnica in grado di distinguere al 100% i noduli di HCC dai noduli di ICC insorti su cirrosi; possiamo, inoltre, asserire che la CEUS è effettivamente la metodica più delicata in quanto è operatore dipendente e, pertanto, il quadro dell'ICC può essere facilmente confuso con quello dell'HCC se eseguita da operatori non esperti; nella nostra casistica 3 casi presentavano lo stesso pattern dell'HCC, ma 10 ulteriori casi potevano essere distinti dall'HCC solo grazie al wash out più marcato e in un caso, infatti, l'inesperienza dell'operatore ha portato al mancato riconoscimento del pattern diagnostico; pertanto, eseguire tale indagine presso centri d'esperienza permette di ridurre al minimo la possibilità di confondere un ICC su cirrosi con un HCC.

Il ruolo della CEUS rimane, in tali centri, importante in quanto è una metodica a basso costo senza lunghi tempi d'attesa che permette di orientare la diagnosi mostrando l'eventuale presenza di un wash out portale e tardivo, qualora non evidenziato dalla TC e dalla RM.

BIBLIOGRAFIA

- 1.** "Natural history" of unresected cholangiocarcinoma: patient outcome after noncurative intervention. Farley DR, Weaver AL, Nagorney DM. *Mayo Clinic Proc.* 1995; 70(5):425-9.
- 2.** Cholangiocarcinoma: Advances in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. Blechacz B, Gores GJ. *Hepatology.* 2008; 48(1): 308–321.
- 3.** Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatitis C and B virus infection, alcohol intake, and hepatolithiasis: a case–control study in Italy. Donato F, Gelatti U, Tagger A, Favret M, Ribero ML, Callea F, Martelli C, Savio A, Travisi P, Nardi G. *Cancer Causes and Control* 2001; 12: 959–964.
- 4.** Management of Hepatocellular Carcinoma. Bruix J, Sherman M. *Hepatology,* 2005; Vol. 42, No. 5.
- 5.** Management of Hepatocellular Carcinoma: An Update. Bruix J, Sherman M. *Hepatology,* 2011; Vol. 53, No. 3.
- 6.** The epidemiology of cholangiocarcinoma. Shaib Y, El-Serag HB. *Semin Liver Dis* 2004;24:115–125.
- 7.** Racial and ethnic variations in the epidemiology of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. McLean L, Patel T. *Liver Int* 2006;26:1047–1053.

- 8.** Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? Shaib YH, Davila JA, McGlynn K, El-Serag HB. *J Hepatol* 2004;40:472–477.
- 9.** Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. Patel T. *Hepatology* 2001;33:1353–1357.
- 10.** Increasing incidence of cholangiocarcinoma in Crete 1992–2000. Mouzas IA, Dimoulios P, Vlachonikolis IG, Skordilis P, Zoras O, Kouroumalis E. *Anticancer Res* 2002;22:3637–3641.
- 11.** Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 2: molecular pathology and treatment. Okuda K, Nakanuma Y, Miyazaki M. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1056–1063.
- 12.** Descriptive epidemiology of cholangiocarcinoma in Italy. Alvaro D, Crocetti E, Ferretti S, et al. *Digestive and Liver Disease* 2010; 42:490-5.
- 13.** Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. Bismuth H, Corlette MB. *Surg Gynaecol Obstet* 1975; 140:170-178.
- 14.** Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009. Aljiffry M, Walsh MJ, Molinari M. *World Journal of Gastroenterology* 2009; 34: 4240-62.
- 15.** Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. Khan SA, Davidson BR, Goldin R, et al. *Gut* 2002; 51:vi1-vi9.
- 16.** Harrison's Principles of Internal Medicine. s.l. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et Al. Mc Graw Hill, 2008.

- 17.** Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. Jaiswal M, LaRusso NF, Gores GJ. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281:G626 – G634.
- 18.** Natural history and prognostic variables in primary sclerosing cholangitis. Farrant JM, Hayllar KM, Wilkinson ML, Karani J, Portmann BC, Westaby D, Williams R. *Gastroenterology* 1991; 100: 1710-1717.
- 19.** Malignancies of the biliary tree. Pitt HA, Dooley WC, Yeo CJ, Cameron JL. *Curr Probl Surg* 1995; 32: 1-90.
- 20.** Cholangiocarcinoma complicating primary sclerosing cholangitis. Rosen CB, Nagorney DM, Wiesner RH, Coffey RJ Jr, LaRusso NF. *Ann Surg* 1991; 213: 21-2521.
- 21.** Cholangiocarcinoma in Italy: A national survey on clinical characteristics, diagnostic modalities and treatment. Results from the "Cholangiocarcinoma" committee of the Italian Association for the Study of Liver Disease. Alvaro D, et al. *Digestive and Liver Disease* 2010.
- 22.** Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Watanapa P, Watanapa WB. *Br J Surg* 2002; 89: 962-970.
- 23.** Cholangiocarcinoma: A position paper by the Italian Society of Gastroenterology (SIGE), the Italian Association of Hospital Gastroenterology (AIGO), the Italian Association of Medical Oncology (AIOM) and the Italian Association of Oncological Radiotherapy. Alvaro D, et al. 2010.

- 24.** Cross-sectional study of *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma in communities within a high-risk area in northeast Thailand. Haswell-Elkins MR, Mairiang E, Mairiang P, Chaiyakum J, Chamadol N, Loapaiboon V, Sithithaworn P, Elkins DB. *Int J Cancer* 1994; 59: 505-509.
- 25.** Intraductal papillary neoplasm of the bile duct associated with *Clonorchis sinensis* infection. Jang KT, Hong SM, Lee KT, Lee JG, Choi SH, Heo JS, Choi DW, Choi D, Lim JH. *Virchows Arch* 2008; 453: 589-598.
- 26.** Choledochal cysts in adults. Hewitt PM, Krige JE, Bornman PC, Terblanche J. *Br J Surg* 1995; 82: 382-385.
- 27.** Choledochal cyst disease. A changing pattern of presentation. Lipsett PA, Pitt HA, Colombani PM, Boitnott JK, Cameron JL. *Ann Surg* 1994; 220: 644-652.
- 28.** Carcinoma arising in choledochoceles. Ohtsuka T, Inoue K, Ohuchida J, Nabae T, Takahata S, Niiyama H, Yokohata K, Ogawa Y, Yamaguchi K, Chijiwa K, Tanaka M. *Endoscopy* 2001; 33: 614-619.
- 29.** Intrahepatic cholangiocarcinoma arising 10 years after the excision of congenital extrahepatic biliary dilation. Goto N, Yasuda I, Uematsu T, Kanemura N, Takao S, Ando K, Kato T, Osada S, Takao H, Saji S, Shimokawa K, Moriwaki H. *J Gastroenterol* 2001; 36: 856-86.
- 30.** Thorotrast-induced cholangiocarcinoma: case report. Sahani D, Prasad SR, Tannabe KK, Hahn PF, Mueller PR, Saini S. *Abdom Imaging* 2003; 28: 72-74.
- 31.** Cholangiocarcinoma. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. *Lancet* 2005; 366: 1303-1314.

- 32.** Risk of liver and other types of cancer in patients with cirrhosis: a nationwide cohort study in Denmark. Sorensen HT, Friis S, Olsen JH, et al. *Hepatology* 1998; 28:921-5.
- 33.** Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study. Shaib YH, El-Serag HB, Davila JA, et Al. *Gastroenterology* 2005; 128:620-6.
- 34.** Detection of hepatitis C virus RNA sequences in hepatic portal cholangiocarcinoma tissue by reverse transcription polymerase chain reaction. Yin F, Chen B. *Chin Med J (Engl)* 1998; 111:1068-70 .
- 35.** Cholangiocarcinoma. Ahrendt SA, Nakeeb A, Pitt HA. *Clinical Liver Disease* 2001; 5:191-218.
- 36.** Hepatitis B virus-associated intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma may hold common disease process for carcinogenesis. Zhou H, Wang H, Zhou D, et al. *European Journal of Cancer* 2010; 46:1056-61.
- 37.** Hepatitis B virus and intrahepatic cholangiocarcinoma. Gatselis NK, Tepetes K, Loukopoulos A, et Al. *Cancer Investigation* 2007; 25:55-58.
- 38.** Viral hepatitis-associated intrahepatic cholangiocarcinoma shares common disease process with hepatocellular carcinoma. Lee CH et Al. *British Journal of Cancer* 2009;100:1765-70.

- 39.** Intrahepatic cholangiocarcinoma arising in cirrhotic liver frequently expressed p63-positive basal/stem-cell phenotype. Nomoto K, Tsuneyama K, Cheng C, Takahashi H, Hori R, Murai Y, et Al. *Pathol Res Pract* 2006;202:71–76.
- 40.** Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. Sell S, Dunsford HA. *Am J Pathol* 1989;134:1347–1363.
- 41.** Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. Jaiswal M, LaRusso NF, Gores GJ. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G626– G634.
- 42.** Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res* 2000;60:184–190.
- 43.** Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. Dergham ST, Dugan MC, Kucway R, Du W, Kamarauskiene DS, Vaitkevicius VK, et Al. *Int J Pancreatol* 1997;21:127–143.
- 44.** Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: K-ras mutations and Tp53 dysfunction are implicated in the neoplastic development. Boberg KM, Schrupf E, Bergquist A, Broome U, Pares A, Remotti H, et Al. *J Hepatol* 2000;32:374–380.
- 45.** Mutation of p53 and K-ras, and loss of heterozygosity of APC in intrahepatic cholangiocarcinoma. Kang YK, Kim WH, Lee HW, Lee HK, Kim YI. *Lab Invest* 1999;79:477–483.

- 46.** p16INK4a promoter mutations are frequent in primary sclerosing cholangitis (PSC) and PSC-associated cholangiocarcinoma. Tanai M, Higuchi H, Burgart LJ, Gores GJ. *Gastroenterology* 2002;123:1090–1098.
- 47.** Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to SOCS-3 epigenetic silencing. Isomoto H, Mott JL, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Haan S, et al. *Gastroenterology* 2007;132:384–396.
- 48.** Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. *Gastroenterology* 2005;128:2054–2065.
- 49.** Enhanced epidermal growth factor receptor activation in human cholangiocarcinoma cells. Yoon JH, Gwak GY, Lee HS, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. *J Hepatol* 2004;41:808–814.
- 50.** Bile acids activate EGF receptor via a TGF- α -dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. Werneburg NW, Yoon JH, Higuchi H, Gores GJ. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G31–G36.
- 51.** Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. Yoon JH, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ. *Gastroenterology* 2002;122:985–993.
- 52.** ERBB-2 overexpression and cyclooxygenase-2 up-regulation in human cholangiocarcinoma and risk conditions. Endo K, Yoon BI, Pairojkul C, Demetris AJ, Sirica AE. *Hepatology* 2002;36:439–450.

- 53.** *cerbB-2* and *c-Met* expression relates to cholangiocarcinogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. Aishima SI, Taguchi KI, Sugimachi K, Shimada M, Tsuneyoshi M. *Histopathology* 2002;40:269–278.
- 54.** Immunohistochemical demonstration of MET overexpression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and in hepatolithiasis. Terada T, Nakanuma Y, Sirica AE. *Hum Pathol* 1998;29:175–180.
- 55.** Unique epithelial cell production of hepatocyte growth factor/scatter factor by putative precancerous intestinal metaplasias and associated “intestinal-type” biliary cancer chemically induced in rat liver. Lai GH, Radaeva S, Nakamura T, Sirica AE. *Hepatology* 2000;31:1257–1265.
- 56.** Hepatic "stem" cells: coming full circle. Petersen BE. *Blood cells, Molecules and Diseases* 2001; 27(3):590-600.
- 57.** Hepatic "stem" cells in liver regeneration. Oh S, Hatch HM, Petersen BE. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2002;13:405-409.
- 58.** Liver development, regeneration, and carcinogenesis. Kung JWC, Currie IS, Forbes SJ, Ross JA. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010.
- 59.** The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 204-207.
- 60.** The assessment of biliary CA 125, CA 19-9 and CEA in diagnosing cholangiocarcinoma--the influence of sampling time and hepatolithiasis. Chen CY, Shiesh SC, Tsao HC, Lin XZ. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 616-620.

- 61.** Role of tumour markers, cytogenetics. Lamerz R. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 4: 145-149.
- 62.** The effect of benign and malignant liver disease on the tumour markers CA19-9 and CEA. Maestranzi S, Przemioslo R, Mitchell H, Sherwood RA. *Ann Clin Biochem* 1998; 35 (Pt 1): 99-103.
- 63.** Utility of serum tumor markers, imaging, and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Halling KC, Lindor KD. *Hepatology* 2008; 48: 1106-1117.
- 64.** Diagnostic approaches for cholangiocarcinoma. Weber A, Schmid RM, Prinz C. *World Journal of Gastroenterology* 2008; 26:4131-36.
- 65.** Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma (IPCC): comparison between perfusion ultrasound and CT imaging. D'Onofrio M, Vecchiato F, Cantisani V, et Al. *Radiol Med* 2008; 113:76-86.
- 66.** Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma: differential diagnosis with contrast-enhanced ultrasound. Chen LD, Xu HX, Xie XY, et Al. *Eur Radiol* 2010;20:743-53.
- 67.** Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma in cirrhosis patients may display a vascular pattern similar to hepatocellular carcinoma on contrast-enhanced ultrasound. Vilana R, Forner A, Reig M, et Al. *Hepatology* 2010;51:2020-2029.
- 68.** Peripheral mass-forming cholangiocarcinoma in cirrhotic liver. Kim SJ, Lee JM, Han JK, et Al. *AJR Am J Roentgenol* 2007;189:1428-34.

- 69.** Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: CT evaluation. Valls C, Gumà A, Puig I, et Al. *Abdominal Imaging* 2000;25:490-6.
- 70.** Differentiation of extrahepatic bile duct cholangiocarcinoma from benign stricture: findings at MRCP versus ERCP. Park MS, Kim TK, Kim KW, Park SW, Lee JK, Kim JS, Lee JH, Kim KA, Kim AY, Kim PN, Lee MG, Ha HK. *Radiology* 2004; 233: 234-240.
- 71.** Imaging of intrahepatic and hilar cholangiocarcinoma. Choi BI, Lee JM, Han JK. *Abdom Imaging* 2004; 29: 548-557.
- 72.** CT features of intraductal intrahepatic cholangiocarcinoma. Lee JW, Han JK, Kim TK, Kim YH, Choi BI, Han MC, Suh KS, Kim SW. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 175: 721-725.
- 73.** Relative merits of ultrasonography, computed tomography and cholangiography in patients of surgical obstructive jaundice. Kumar M, Prashad R, Kumar A, Sharma R, Acharya SK, Chattopadhyay TK. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 2027-2032.
- 74.** Association of preoperative biliary stenting with increased postoperative infectious complications in proximal cholangiocarcinoma. Hochwald SN, Burke EC, Jarnagin WR, Fong Y, Blumgart LH. *Arch Surg* 1999; 134: 261-266.
- 75.** Multivariate statistical analysis of clinicopathologic factors influencing survival of patients with bile duct carcinoma. He P, Shi JS, Chen WK, Wang ZR, Ren H, Li H. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 943-946.

- 76.** Hepatectomy with portal vein resection for hilar cholangiocarcinoma: audit of 52 consecutive cases. Ebata T, Nagino M, Kamiya J, Uesaka K, Nagasaka T, Nimura Y. *Ann Surg* 2003; 238: 720-727.
- 77.** Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. Jarnagin WR, Fong Y, DeMatteo RP, Gonen M, Burke EC, Bodniewicz BS J, Youssef BA M, Klimstra D, Blumgart LH. *Ann Surg* 2001; 234: 507-517; discussion 517-519.
- 78.** A proposed staging system for intrahepatic cholangiocarcinoma. Nathan H, Aloia TA, Vauthey JN, Abdalla EK, Zhu AX, Schulick RD, Choti MA, Pawlik TM. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 14-22.
- 79.** AJCC (American Joint Committee on Cancer). Greene FL, Page DL, Fleming ID. *Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.
- 80.** Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas. Carriaga MT, Henson DE. *Cancer* 1995; 75: 171-190.
- 81.** Current status of intrahepatic cholangiocarcinoma. Yang J, Yan L. *World Journal of Gastroenterology* 2008;41:6289-97.
- 82.** Multi-disciplinary treatment for cholangiocellular carcinoma. Shimoda M, Kubota K. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1500-1504.
- 83.** Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. Anderson CD, Pinson CW, Berlin J, Chari RS. *Oncologist* 2004; 9: 43-57.

84. Preoperative portal vein embolization for extended hepatectomy. Hemming AW, Reed AI, Howard RJ, Fujita S, Hochwald SN, Caridi JG, Hawkins IF, Vauthey JN. *Ann Surg* 2003; 237: 686-691; discussion 691-693.

85. Randomized prospective trial of pylorus-preserving vs Classic duodenopancreatectomy (Whipple procedure): initial clinical results. Seiler CA, Wagner M, Sadowski C, Kulli C, Büchler MW. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 443-45.

86. Clinicopathological factors predicting long-term overall survival after hepatectomy for peripheral cholangiocarcinoma. Jan YY, Yeh CN, Yeh TS, Hwang TL, Chen MF. *World J Surg* 2005; 29: 894-898.

87. Surgical treatment in proximal bile duct cancer. A single-center experience. Pichlmayr R, Weimann A, Klempnauer J, Oldhafer KJ, Maschek H, Tusch G, Ringe B. *Ann Surg* 1996; 224: 628-638.

88. Liver transplantation for unresectable perihilar cholangiocarcinoma. Heimbach JK, Gores GJ, Haddock MG, Alberts SR, Nyberg SL, Ishitani MB, Rosen CB. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 201-207.

89. Liver transplantation with neoadjuvant chemoradiation is more effective than resection for hilar cholangiocarcinoma. Rea DJ, Heimbach JK, Rosen CB, Haddock MG, Alberts SR, Kremer s WK, Gores GJ , Nagorney DM. *Ann Surg* 2005; 242: 451-458; discussion 458-461.

90. Transcatheter arterial chemoembolization or chemoinfusion for unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma: clinical efficacy and factors influencing outcomes. Kim JK, Yoon HK, Sung KB, et Al. *Cancer* 2008; 113:1614-1622.

- 91.** Radiation lobectomy: preliminary findings of hepatic volumetric response to lobar yttrium-90 radioembolization. Gaba RC, Lewandowski RJ, Kulik LM, Riaz A, Ibrahim SM, Mulcahy MF, Ryu RK, Sato KT, Gates V, Abecassis MM, Omary RA, Baker TB, Salem R. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1587-1596.
- 92.** Treatment of unresectable cholangiocarcinoma using yttrium-90 microspheres: results from a pilot study. Ibrahim SM, Mulcahy MF, Lewandowski RJ, Sato KT, Ryu RK, Masterson EJ, Newman SB, Benson A 3rd, Omary RA, Salem R. *Cancer* 2008; 113: 2119-2128.
- 93.** Palliative treatment with self-expandable metallic stents in patients with advanced type III or IV hilar cholangiocarcinoma: a percutaneous versus endoscopic approach. Paik WH, Park YS, Hwang JH, Lee SH, Yoon CJ, Kang SG, Lee JK, Ryu JK, Kim YT, Yoon YB. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 55-62.
- 94.** Endoscopic stenting for malignant biliary obstruction. Cheung KL, Lai EC. *Arch Surg* 1995; 130: 204-207.
- 95.** Photodynamic therapy in cholangiocarcinomas. Ortner MA. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 147-154.
- 96.** Photodynamic therapy for advanced bile duct cancer: evidence for improved palliation and extended survival. Berr F, Wiedmann M, Tannapfel A, Halm U, Kohlhaw KR, Schmidt F, Wittekind C, Hauss J, Mössner J. *Hepatology* 2000; 31: 291-298.
- 97.** Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study. Ortner ME, Caca K, Berr F, Liebetruh J, Mansmann

U, Huster D, Voderholzer W, Schachschal G, Mössner J, Lochs H. *Gastroenterology* 2003; 125: 1355-1363.

98. Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase-pi-specific inhibitor O1- hexadecyl-gamma-glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester. Nakajima T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Hayashi T, Abe T, et Al. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:861–869.

99. ClinicalTrials.gov. List results for search of “cholangiocarcinoma”. 2008 [Accessed January, 2008]. Available at:
<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cholangiocarcinoma>.

100. The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis. Sangiovanni A, Manini M, Iavarone M, Romeo R, Forzenigo LV, Fraquelli M, Massironi S, Della Corte C, Ronchi G, Rumi MG, Biondetti P, Colombo M. *Gut* 2010; 59:638-44.