

TESI DI DOTTORATO

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Ultrasonologia in Medicina Umana e Veterinaria

Ciclo XXII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/B1

Settore Scientifico disciplinare: MED09

TITOLO TESI

Tumori misti epatocolangiocellulari su cirrosi: aspetti diagnostici e caratteristiche clinico- demografiche

Presentata da: Elisabetta Sagrini

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Nicola Rizzo

Prof. Fabio Piscaglia

Esame finale anno 2015

INDICE

1 - INTRODUZIONE	3
1.1 - EPIDEMIOLOGIA	5
1.1.1 - FATTORI DI RISCHIO	7
1.1.1.1 - Epatocarcinoma	7
1.1.1.2 - Colangiocarcinoma	10
1.1.1.3 - Epatocolangiocarcinoma	11
1.2 - CLASSIFICAZIONE	13
1.2.1 - IL PROBLEMA DELL'IDENTITÀ DEL TUMORE COMBINATO	13
1.2.2 - CLASSIFICAZIONI PIÙ UTILIZZATE:	14
1.3 - PATOGENESI	15
1.4 SINTOMATOLOGIA	18
1.5 - DIAGNOSI ISTOLOGICA	18
1.5.1 - ASPETTO MACROSCOPICO:	19
1.5.2 - ASPETTO MICROSCOPICO E MARKER IMMUNO-ISTOCHEMICI:	19
1.5.3 - POSSIBILI ERRORI INTERPRETATIVI:	20
1.6 - IMAGING, MARKER TUMORALI, BIOPSIA E DIFFICOLTÀ DIAGNOSTICHE	22
1.6.1 - ECOGRAFIA B-MODE E CON MEZZO DI CONTRASTO	22
1.6.2 - TC E RM CON MEZZO DI CONTRASTO	23
1.6.2.1 - Pattern contrastografici HCC e CC all'imaging dinamico TC e RM	24
1.6.2.2 - TC e RM nel CHC	25
1.6.3 - PET E PET-TC	28
1.6.4 - CONCLUSIONI SULL'IMAGING	30
1.6.5 - MARCATORI TUMORALI	30
1.6.6 - RUOLO DELLA BIOPSIA	31
1.6.7 - CONCLUSIONI SULLA DIAGNOSI	31
1.7 - STADIAZIONE	33
1.7.1 - CLASSIFICAZIONE TNM - SESTA REVISIONE	32
1.7.2 - CLASSIFICAZIONE TNM - SETTIMA REVISIONE	34
1.8 - TRATTAMENTO	34
1.8.1 - RESEZIONE EPATICA	35
1.8.2 - TRAPIANTO DI FEGATO	38
1.8.3 - ALTRI TRATTAMENTI	39
1.8.3.1 - Terapie ablative loco-regionali	39
1.8.3.2 - Chemoembolizzazione transarteriosa	40

1.8.3.3 - Terapie sistemiche	42
1.9 PROGNOSI	42
1.9.1 - SOPRAVVIVENZA	42
1.9.2 - FATTORI PROGNOSTICI:	43
1.9.3 – IL PROBLEMA DELLE RECIDIVE	45
2 - STUDIO SPERIMENTALE	46
2.1 - OBIETTIVI - INTRODUZIONE	46
2.2 - MATERIALI E METODI	46
2.3 - RISULTATI	51
2.3.3 – ASPETTI DI DIAGNOSTICA PER IMMAGINI	52
1) US b-mode e CEUS	58
2) TC con m.d.c.	61
3) RM con m.d.c.	63
2.3.1 - DATI CLINICI E LABORATORISTICI	65
2.3.2 - ANALISI DELLA SOPRAVVIVENZA	67
2.4 - DISCUSSIONE	74
2.4.1 – DISCUSSIONE DEGLI ASPETTI DI IMAGING	75
2.4.2 – DISCUSSIONE DEI DATI CLINICI E DI SOPRAVVIVENZA	81
2.5 - CONCLUSIONI	85
BIBLIOGRAFIA	88

1 - INTRODUZIONE

I tumori del fegato rappresentano negli uomini e nelle donne rispettivamente la quinta e settima neoplasia mondiale in termini di frequenza di diagnosi e la seconda e sesta in termini di mortalità. [1, 2] Le due principali neoplasie epatiche primitive sono l'epatocarcinoma (HCC) e il colangiocarcinoma intraepatico (ICC), i quali derivano rispettivamente dagli epatociti e dai colangiociti. Più raro è l'epatocolangiocarcinoma, denominato anche carcinoma combinato epatocolangiocellulare (CHC), che consiste in un tumore in cui le componenti neoplastiche epatocitarie e colangiocitarie sono presenti insieme. Nelle casistiche pubblicate dalla sua scoperta, il CHC ha prevalenza variabile, dallo 0,4% al 14,5% di tutte le neoplasie primitive del fegato; l'incidenza globale registrata negli ultimi trent'anni negli USA è stata pari a 3 casi ogni 10 milioni di abitanti. Descritto per la prima volta nel 1949 da Allen e Lisa, questo tumore è stato classificato dagli stessi autori in tre tipi distinti sulla base della separazione che intercorre fra le due componenti principali; il tipo A e il tipo B consistono in neoplasie in cui le cellule neoplastiche di HCC e CC sono ben distinguibili e coesistono, rispettivamente nello stesso fegato (doppi tumori) o nello stesso nodulo (tumori da "collisione"), il tipo C è invece costituito interamente da cellule di transizione che esprimono sia caratteri di epatociti che di colangiociti. E' stato teorizzato che le cellule dei tumori combinati riconoscano un'origine comune dai medesimi progenitori bipotenti epatici, i quali, intrinsecamente dotati della capacità di differenziarsi secondo le due linee cellulari, incorrerebbero in una trasformazione neoplastica ad uno stadio ancora immaturo. L'espressione di marker dei progenitori da parte delle cellule di CHC, dimostrata da alcuni autori mediante analisi immuno-istochimiche, supporterebbe tale teoria.

Gli studi finora pubblicati suggeriscono che i fattori di rischio e le caratteristiche demografiche dei pazienti con CHC siano simili a quelle

conosciute per HCC e CC, con particolare riferimento a un'età avanzata alla presentazione, una predominanza del sesso maschile e una frequente presenza di sottostante epatopatia cronica o cirrosi con relativi fattori di rischio (in particolare epatiti virali B e C).

Tuttavia la rarità del CHC, l'eterogeneità che contraddistingue gli studi relativamente all'area geografica di provenienza, la variabilità dei criteri d'inclusione dei pazienti (in particolare la mancanza di analisi separate di CHC insorti su cirrosi e non) e la bassa numerosità della maggior parte dei campioni rendono difficoltosa una descrizione univoca delle caratteristiche cliniche e demografiche di questo tumore. Per di più la natura mista e la variabilità di sottotipi (classificati secondo criteri talvolta diversi) del CHC aggiungono eterogeneità alle casistiche, rendendone difficoltoso uno studio comparativo. Nonostante le ampie aree di sovrapposizione con l'HCC, il CHC sembra avere delle caratteristiche peculiari che renderebbero una diagnosi pre-operatoria fondamentale per impostare al meglio le strategie terapeutiche. Questo è specialmente vero in quanto la diagnosi di HCC (su cirrosi) è raggiunta di frequente con soli criteri radiologici. Ciò detto, dagli studi emerge come non sia possibile identificare un aspetto imaging tipico per CHC, che anche sotto questo aspetto si conferma un tumore eterogeneo. La prevalenza di una componente tumorale sull'altra (HCC e CC) all'interno dei noduli di CHC sembra essere la principale determinante dell'aspetto all'imaging contrastografico mediante TC (tomografia assiale computerizzata) e RM (risonanza magnetica nucleare) con mezzo di contrasto (mdc). Il tumore combinato mostra pattern contrastografico talora tipico di HCC, talora di CC.

Data la rarità di questa malattia, identificare l'approccio terapeutico più efficace e stimare la prognosi rimangono argomenti controversi; la resezione chirurgica rimane l'opzione più efficace nel migliorare la sopravvivenza dei pazienti con malattia in stadio limitato al fegato.

Negli studi finora pubblicati, al confronto con popolazioni di controllo HCC e CC, alcuni autori riportano una sopravvivenza intermedia rispetto alle

forme pure (migliore di CC, ma peggiore di HCC), altri la rilevano come molto simile a quella del colangiocarcinoma o lievemente peggiore. La natura necessariamente retrospettiva degli studi pubblicati su questa rara neoplasia rappresenta un potenziale fattore confondente in quanto non sempre è stato possibile stabilire se la diagnosi di tumore combinato fosse già nota pre-operativamente e se, in caso negativo, un differente approccio avesse potuto migliorare la sopravvivenza (globale o libera da malattia).

1.1 - Epidemiologia

L'epatocolangiocarcinoma è un cancro raro: il range di prevalenza dei CHC tra i tumori primitivi del fegato estrapolato dalla letteratura è del 1,0-4,7%. [3-10] Il primo lavoro organico pubblicato sull'argomento, datato 1949, riportava un range più ampio, 0,4-14,2%, ma ciò è probabilmente anche dovuto ai diversi criteri d'inclusione dell'epoca. [11] Wang et al. [12] hanno pubblicato nel 2010 uno studio su vasta scala (*population-based*) basato sui dati raccolti dal 1973 al 2004 dal registro tumori unificato di diverse regioni degli Stati Uniti. Sono stati identificati 380 pazienti con CHC in un pool di 42.654 soggetti affetti da neoplasie epato-biliari con una frequenza così calcolata pari allo 0,87%. L'incidenza aggiustata per età è rimasta costante in tutto il periodo preso in esame, contando essa 0,03 casi ogni 100,000 abitanti.

Diversi soprattutto appaiono essere i risultati di studi condotti in paesi Occidentali ed Orientali (intesi come estremo Oriente) in termini di epidemiologia, clinica e prognosi. Le differenze fra Occidente e Asia per quanto concerne le neoplasie epatiche, sono note, in particolare per l'esposizione ai fattori di rischio per malattie epatiche e cirrosi, virus epatotropi B e C in primis, che predispongono all'insorgenza di neoplasie epatiche e che sono documentatamente diversi nelle varie regioni del mondo. [2, 13]

La **Tabella 1.1** mostra tali differenze, selezionando alcune casistiche pubblicate e quando disponibile, con l'analisi comparativa con popolazioni di HCC e CC.

Tabella 1.1 - Sono riportati: il primo autore del lavoro, l'anno di pubblicazione, la maxi-area geografica di provenienza in un'ipotetica distinzione Occidente (W) e Oriente (E). Ove disponibili, sono stati indicati i dati relativi ai 3 tumori primitivi del fegato; il CHC è evidenziato in azzurro. Sono riportati anche la numerosità del campione, l'incidenza sul totale delle neoplasie primitive del fegato, l'età mediana d'insorgenza (in alcuni casi, ove indicato, la media) e la prevalenza di sesso maschile.

TABELLA 1.1 - DATI DEMOGRAFICI IN ALCUNI STUDI SUL CHC - analisi comparativa

Studio	East Vs West	Anno	Campione	Incidenza	Età mediana	M	
Chock et al.	E	2009	CHC	25	2,40%	48	64%
			HCC	945	92,10%	55	81%
			CC	56	5,40%	61,5	55%
Park et al.	E	2010	CHC	32	3,30%	55	81%
			HCC	368		53	75%
			CC	128		61	67%
Yin et al.	E	2012	CHC	103	1,50%	50	81%
			HCC	6679		51	87%
			CC	386		56	41%
Koh et al.	E	2005	CHC	24	6.50%	55	67%
			HCC	301		53	79%
			CC	44		60	68%
Chantajitr e'	E	2006	CHC	25	n/r	53,4 (media)	72%
			HCC	50		53,3 (media)	74%
Liu et al.	E	2003	CHC	12	2,30%	60	66%
			HCC	476		53	81%
			CC	25		63	64%
Yano et al.	E	2003	CHC	26	2,40%	57	88%
			HCC	1093		61	83%
			CC	53		63	66%
Zuo et al.	E	2007	CHC	15	n/r	44	
			HCC	132		49	
			CC	44		50	
Tang et al.	E	2006	CHC	13	2,30%	57+-1,9	92%
			HCC	509		60+-9	83%
			CC	41		61,5+-9,7	54%
Tickoo et al.	W	2002	CHC	27	n/r		52%
Bhagat et al	W	2006	CHC	8		65	38%
Fowler et al	W	2013	CHC	29		61,2 (media)	81%
Janargin et :	W	2001	CHC	27	3,60%	61	52%
			HCC	27		65	67%
			CC	23		64	30%

La mediana di età alla diagnosi si attesta fra gli 48 e 65 anni [3, 5-9]. Il sesso maggiormente colpito è quello maschile, e rappresenta il 52-81% (rapporto M/F maggiore di 1 e minore di 4,4) delle casistiche. In un solo

studio condotto su soli otto pazienti, è stata riportata una maggiore prevalenza di donne (5/9). [3]

Il grande database di Wang et al. [12] ha fornito valori compatibili con questi range: rapporto M/F pari a 1,8; età media pari a 64 anni (± 12); età mediana pari a 65 (range 19-98).

1.1.1 - Fattori di rischio

Poiché il CHC è un tumore caratterizzato dalla compresenza, nello stesso fegato, nodulo o cellula, di componenti epato- e colangiocitarie, è ragionevole ipotizzare che i fattori di rischio per le forme primitive di HCC e CC possano giocare un ruolo nella patogenesi dello stesso.

Di seguito sono stati sintetizzati i dati disponibili in letteratura sul tumore combinato.

1.1.1.1 – Fattori di rischio per Epatocarcinoma

Cirrosi epatica

La cirrosi epatica è presente in un 70-80% dei casi di epatocarcinoma e ne rappresenta il fattore predisponente principale. [1]

L'infiammazione cronica (associata o meno ad infezione virale), di cui la cirrosi rappresenta l'espressione finale, gioca un ruolo fondamentale attivando proto-oncogeni e/o disattivando geni oncosoppressori negli epatociti. La proliferazione cellulare in un microambiente ricco di citochine/chemochine, fattori di crescita e agenti danneggianti il DNA (quali le specie reattive dell'ossigeno) conduce ad un'alterazione genetica permanente e alla trasformazione neoplastica. [14]

Qualunque agente che provochi un danno epatico cronico e quindi cirrosi può essere considerato un oncògeno. Il più importante agente eziologico è l'infezione cronica da virus epatotropi di tipo C (HCV) e B (HBV) ai quali si possono attribuire (a livello mondiale) il 57% delle cirrosi e il 78% degli HCC. [13]

Seguono il consumo eccessivo d'alcol, l'aflatossina B1 e la steatoepatite non alcolica (NASH). Altre cause di danno epatico persistente sono le

malattie da accumulo di ferro (emocromatosi) e rame (M. di Wilson), la cirrosi biliare primitiva (PBC) e l'epatite autoimmune. [15]

1) HBV

L'infezione da virus B è molto diffusa in Africa e in alcune regioni dell'Asia. La maggioranza dei casi di HCC si registra nei paesi del Sud-Est asiatico (Tailandia, Corea, Hong Kong, Singapore, Malaysia e Cina del Sud) e dell'Africa sub Sahariana, nei quali le infezioni virali sono endemiche. In Cina i casi di epatocarcinoma HBV-correlati superano l'80%. [16] [17] In queste regioni ad alta prevalenza essa è acquisita spesso alla nascita o nelle fasi precoci della vita con un altissimo tasso di conversione dalla forma acuta a quella cronica di epatite. Naturalmente questo aumenta a sua volta il tempo di esposizione all'azione infiammatoria e quindi determina una maggiore incidenza di cirrosi e di HCC. La capacità intrinseca del virus B di integrarsi cronicamente nel genoma epatocitario ne potenzia le capacità oncogeniche e rende possibile lo sviluppo di tumore anche nel caso in cui l'infezione sia controllata e in assenza di cirrosi. [15] Beasley et al. [18], hanno riscontrato in uno studio prospettico controllato che l'incidenza annua di HCC nei portatori di epatite B era dello 0,5% all'anno e l'età avanzata aumentava questo valore, tanto che nei pazienti di 70 anni raggiungeva l'1% annuo. In presenza di cirrosi l'incidenza era del 2,5% all'anno. Globalmente il rischio relativo degli infetti era 100 volte quello della popolazione sana di riferimento. L'entità del rischio di sviluppare tumore sembra essere influenzato da fattori diversi per le varie etnie. In Europa e Nord America questo dipende soprattutto dalla presenza di cirrosi e dall'entità della risposta infiammatoria e della replicazione virale, tanto che, sicuramente i pazienti non Asiatici non cirrotici con avvenuta sierconversione dell'antigene di superficie HBsAg, ma anche i pazienti HBeAB positivi e con bassi livelli di replicazione virale sono soggetti ad un rischio piuttosto basso. [19, 20] Gli asiatici, al contrario, sviluppano un rischio dello 0,2% all'anno dalla quinta/sesta decade di vita (maschi/femmine rispettivamente), indipendentemente dalla presenza di cirrosi o dallo stato di attività dell'infezione. [21]

Globalmente parlando, i fattori che possono aumentare l'incidenza di HCC in presenza d'infezione B sono: sesso maschile, età avanzata, alte copie di HVB-DNA, genotipi D (più importante in Occidente) e C (più importante in Oriente), mutazioni nella regione del promotore del core, presenza di cirrosi, coinfezione con HCV o HIV e presenza simultanea di altre malattie epatiche. [17]

2) HCV

Il virus C è il principale fattore di rischio di epatocarcinoma in alcune aree, in particolare Giappone, dove la prevalenza di tale infezione raggiunge il 75% degli HCC. Anche in Europa e Nord America l'epatite C ha una notevole diffusione e si sovrappone come importanza alla cirrosi alcol-correlata. [16, 22] L'aumentata incidenza di HCC nei portatori d'infezione cronica da HCV sembra essere più strettamente associata allo stadio di fibrosi/cirrosi epatica di quanto non accada per il virus B. Il rischio relativo dei pazienti HCV-RNA positivi rispetto ai negativi è di 20 volte e in presenza di cirrosi l'incidenza annua raggiunge il 2-8%. [17, 23, 24]

Tra i metodi non invasivi per stabilire lo stadio di fibrosi si ricordano: (1) la conta piastrinica plasmatica, i cui valori inferiori a $100 \times 10^9/L$ sembrano essere associati ad un aumento di rischio di sviluppo di HCC [25]; (2) l'uso dell'elastografia ad ultrasuoni per determinare la percentuale di fibrosi epatica, che sembra essere un metodo promettente per lo screening di questi pazienti. [26]

3) Cirrosi epatica non virus-relata

La maggior parte degli studi sul ruolo della cirrosi alcol-correlata sono stati condotti in un'epoca in cui il virus C non era conosciuto e, dal momento che l'epatite C è piuttosto comune negli alcolisti, i risultati sono probabilmente sovrastimati [17, 27]. Tuttavia la prevalenza di steatoepatite alcolica nei pazienti affetti da HCC è elevata (32-35%) [28, 29].

La cirrosi dovuta a steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è un fattore di rischio per HCC, anche se l'incidenza e il rischio relativo dei pazienti affetti da questa specifica patologia non sono conosciuti. In uno studio di coorte

[30], il 20% dei pazienti con HCC non presentava fattori di rischio specifici diversi dal diabete mellito; la prevalenza di cirrosi in tale coorte non è stata tuttavia riportata. L'emocromatosi ereditaria, la cirrosi biliare primitiva, il deficit di alfa1-antitripsina e l'epatite autoimmune sono comunemente segnalati come importanti fattori di rischio di cirrosi e sono stati associati all'insorgenza di epatocarcinoma. [17]

1.1.1.2 - Colangiocarcinoma

Nonostante l'eziologia della maggior parte di casi di **colangiocarcinoma** rimanga inspiegata, sono stati identificati con buona sicurezza diversi fattori di rischio; alcuni di questi sono condivisi con l'HCC, altri sono invece specifici per CCC. [31] L'aumento dell'incidenza dell'ICC registrato negli ultimi anni ha indotto a valutare più approfonditamente il ruolo di virus epatotropi B e C, alcol e cirrosi in sé, come possibili fattori di rischio anche per questo tumore. 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 è sembrata essere più debole [32]. Uno studio caso-controllo condotto da Donato et al. nel 2001 [32] ha rilevato una prevalenza significativa dell'infezione da HCV nei casi affetti da ICC, rispetto ai controlli sani. Lo studio ha inoltre individuato il ruolo della cirrosi in sé come elemento fondamentale nella carcinogenesi dell'ICC, essendo essa presente nel 38,5% dei casi. Anche negli Stati Uniti, la correlazione dell'ICC con l'infezione da HCV è evidente, mentre è più debole quella con HBV. [33]

Tra i fattori specifici per CCC si ricordano: la colangite sclerosante primitiva (PSC), più importante nei paesi occidentali in cui è associata all'8-40% dei casi di CC [34, 35]; le infezioni parassitarie, in particolare da *Opisthorchis Viverrini* e *Clonorchis Sinensi*, che sono più comuni invece nel Sud-Est asiatico e che comportano un aumento notevole del rischio di contrarre malattia [36]; l'epatolitiiasi; le patologie cistiche congenite del dotto biliare; alcuni agenti chimici, quali diossina, cloruro di vinile, Thorotrast e nitrosamine alimentari. [37]

1.1.1.3 - Epatocolangiocarcinoma

Come si è detto, gli studi condotti finora sul CHC hanno preso in esame i fattori di rischio più comuni per i carcinomi primitivi del fegato. In particolare sono stati considerati l'età, il sesso, la prevalenza di cirrosi epatica e d'infezione virale B e C. Ciò che emerge immediatamente da un primo sguardo ai dati è la considerevole eterogeneità degli stessi fra i vari studi. Un fattore importante per interpretare le differenze nei risultati sembra essere la regione di provenienza delle coorti di pazienti presi in esame. L'incidenza dell'HCC varia in funzione dell'area geografica e, anche all'interno della stessa area, in base alla razza e all'etnia. [2]

Anche i fattori di rischio hanno un peso diverso: in molti paesi occidentali la cirrosi, specialmente virus-relata, è globalmente meno frequente, la prevalenza di sesso maschile è meno spiccata e l'eziologia è più varia rispetto alla media dei paesi dell'Estremo Oriente. [2] E' probabile che le stesse differenze esistano anche per i pazienti affetti da epatocolangiocarcinoma. Considerando i valori riportati nelle **Tabella 1.1 e 1.2** (che riassumono i risultati di alcuni dei lavori più importanti pubblicati sul CHC), età media alla diagnosi nella sesta decade di vita, predominanza del sesso maschile, alta prevalenza d'infezioni da virus B e C e di cirrosi sottostante caratterizzano mediamente i dati provenienti da studi condotti in paesi Orientali, in primis Cina e Giappone. Queste caratteristiche riflettono maggiormente il comportamento dell'HCC più che del CC. Per questa ragione, alcuni autori sostengono che il CHC sia, dal punto di vista clinico-epidemiologico, una variante dell'HCC ordinario con alcune caratteristiche colangiocitarie piuttosto che un'entità a sé stante. [20] Nei capitoli successivi verrà d'altra parte illustrato come la questione del confronto tra il CHC e le due forme pure sia più controversa per quanto concerne l'imaging, le caratteristiche biologiche del tumore e la prognosi.

Contrariamente a quanto osservato in molti altri lavori, lo studio di Jarnagin et al. del 2001 [6], che è stato condotto in un centro occidentale su 27 casi di CHC, ha mostrato una assai modesta prevalenza di epatiti virali B e C (15%) e una assenza di casi di cirrosi documentabile

istologicamente fra i pazienti presi in esame. Fowler et al. riportano dati simili (10% di prevalenza di infezioni virali e 20% di cirrosi) nella loro casistica “occidentale” di 29 casi di CHC. [38]

Kassahun e Hauss, nella review del 2010 sul CHC [16], fanno le stesse osservazioni riguardo alle differenze tra i vari studi in relazione all’area geografica. Inoltre postulano come, visto il documentato aumento dell’incidenza di HCC HCV- e HBV-correlato nei paesi occidentali negli ultimi anni, sia ragionevole aspettarsi per il prossimo futuro un corrispondente appianamento del suddetto divario.

TABELLA 1.2 - DATI CLINICI IN ALCUNI STUDI SUL CHC - analisi comparativa

Studio	East Vs West	Campione	HBV+	HCV+	Virus tot.	Cirrosi	AFP (ng/mL) mediano	
Chock et al.	E	CHC	25	72%	0%	72%	n/a	118
		HCC	945	85%	0%	85%	n/a	124
		CC	56	27%	0%	27%	n/a	
Park et al.	E	CHC	32	69%	16%	75%	21,9% (>200 ng/mL)	
		HCC	368	81%	7%	54%	14,9% (>200 ng/mL)	
		CC	128	8%	2%	16%	0% (>200 ng/mL)	
Yin et al.	E	CHC	103	73%	1%	67%	58,3% (>20ng/ml)	
		HCC	6679	82%	2%	76%	66,5% (>20ng/ml)	
		CC	386	34%	1%	34%	13,7% (>20ng/ml)	
Koh et al.	E	CHC	24	54%	13%	54%		
		HCC	301	75%	10%	70%		
		CC	44	32%	0%	18%		
Chantajitr et al.	E	CHC	25	67%	13%	50%	5,87	
		HCC	50	78%	3%	44,4%	41,46	
		CC						
Liu et al.	E	CHC	12	58%		25%	19,5	
		HCC	476	82%			162	
		CC	25	20%			5	
Yano et al.	E	CHC	26	27%	38%	65%	54%	75,5
		HCC	1093	16%	48%	64%	54%	44,1
		CC	53	17%	9%	26%	2%	4
Zuo et al.	E	CHC	15		20%		73%	127,5
		HCC	132		20%			166
		CC	44		9%			9,6
Tang et al.	E	CHC	13	39%	0%	39%	23%	769 (media)
		HCC	509	20%	61%	82%	59%	899 (media)
		CC	41	5%	14%	19%	n/a	n/a
Tickoo et al.	W	CHC	27			15%	0%	
Bhagat et al.	W	CHC	8	13%	13%	26%		
Fowler et al.	W	CHC	29	3%	7%	10%	20%	80,9
Janargin et al.	W	CHC	27			15%	0%	187 (media)
		HCC	27			56%	41%	1273 (media)
		CC	23			13%	4%	12 (media)

Tabella 1.2 - Sono riportati: il primo autore del lavoro, la maxi-area geografica di provenienza in un’ipotetica distinzione Occidente (W) e Oriente (E). Ove disponibili, sono stati indicati i dati relativi ai 3 tumori primitivi del fegato; il CHC è evidenziato in azzurro. Sono riportati anche la numerosità del campione, la prevalenza di infezione da HBV e HCV, singolarmente e/o insieme, la prevalenza di cirrosi e i valori di alfa-fetoproteina sierica (ove non diversamente indicato, come mediana).

1.2 - Classificazione

1.2.1 - Il problema dell’identità del tumore combinato

Anche per quanto riguarda la classificazione anatomo-patologica, i termini di paragone naturali per i vari studi sulla rara forma mista epatocolangiocellulare sono stati i più comuni e meglio studiati HCC e CC per così dire “puri”.

Le ragioni delle incongruenze tra i vari studi non si esauriscono nelle

medesime differenze geografiche riscontrate nell'HCC, ma sono da attribuirsi anche all'elevata eterogeneità che contraddistingue le forme intermedie epato- e colangiocellulari, le quali si sono dimostrate avere un range piuttosto ampio di variabilità morfologica e fenotipica. [38, 39] A dimostrazione di ciò alcuni autori hanno cominciato a sostenere che l'intera classificazione delle forme primarie epatiche, basata innanzitutto su concetti anatomo-patologici "classici" di morfologia e differenziazione e che identifica 2 forme principali e una forma mista, debba essere modificata in favore di un approccio maggiormente basato sulla "funzione" e sulle caratteristiche immunofenotipiche delle cellule neoplastiche. In quest'ottica i tumori primitivi del fegato andrebbero visti come uno spettro continuo di lesioni con alle due estremità le forme più differenziate di HCC e CC. [40, 41]

Sono poi stati identificati negli anni nuovi sottogruppi di tumori epatici con caratteristiche, a detta degli autori, almeno in parte peculiari e che sono stati denominati ad esempio: "forme intermedie", "tumori transizionali", "HCC scirrosi", "HCC a piccole cellule", CC-"like HCC". Se oltre a ciò si considera che esistono forme dubbie altamente indifferenziate e primitive e che non possono essere classificate coi criteri usuali si comprende perché le casistiche disponibili sul CHC non siano sempre omogenee fra loro e risultino difficilmente confrontabili. [41-43]

Alla luce dei progressi fatti nello studio della patogenesi dei tumori solidi primitivi del fegato, l'ultima classificazione WHO (2010) ha apportato importanti cambiamenti e perfezionamenti nella classificazione del CHC, che ora si compone di categorie ben dettagliate [vedi dopo].

1.2.2. - Classificazioni più utilizzate:

Tumori epatici primitivi comprensivi di elementi sia di HCC che di CC vennero descritti per la prima volta nel 1903 da Wells [44], ma una classificazione vera e propria si deve al lavoro del 1949 di Allen & Lisa [11], i quali identificarono 3 sottotipi di CHC:

- Tipo A: tumori in cui le componenti HCC e CC sono separate (doppi tumori);
- Tipo B: tumori in cui le due componenti sono contigue e possono mischiarsi durante la crescita (tipo combinato);
- Tipo C: tumori le cui due componenti sono intimamente frammiste l'una all'altra e quindi si suppongono aver avuto origine dallo stesso sito (tipo misto).

Nel 1985 Goodman et al.[42] presentarono una nuova classificazione istologica, anch'essa comprendente 3 sottotipi:

- Tipo I, "tumori da collisione": presenza contemporanea di HCC e CC nello stesso fegato, con la possibilità che questi vengano in contatto l'uno con l'altro; il passaggio è netto e non è presente una zona di transizione;
- Tipo II, "tumori di transizione": in uno stesso nodulo sono identificabili aree a differenziazione HCC ed altre a differenziazione CC, con presenza di zone di transizione fra le due;
- Tipo III, "tumori fibrolamellari": assomigliano alla variante fibrolamellare del HCC ma contengono anche pseudoghiandole mucino-secerenti.

La classificazione WHO, ha identificato fino alla terza edizione [45] il CHC come un "raro tumore contenente elementi inequivocabili di epatocarcinoma e di colangiocarcinoma mischiati intimamente l'uno all'altro". In questa definizione non rientravano i sottotipi A di Allen e 1 di Goodman, che erano invece ritenuti una compresenza di noduli HCC e CC distinti.

La revisione del 2010 [46] ha introdotto importanti differenze: il CHC è stato suddiviso in:

- forma "classica", assimilabile a tipi A di Allen e 1 di Goodman. Consiste in 2 componenti:
 - o HCC tipico, da scarsamente a ben differenziato;
 - o CC tipico, da scarsamente a ben differenziato;

- forma “a cellule staminali” (CHC-SC). Quest’ultima è stata sotto-classificata in 3 forme:
 - o “CHC-SC-tipico”;
 - o “CHC-SC-intermedio”;
 - o “CHC-SC-colangiolocellulare”

Vista la relativa “novità” di questa classificazione e l’alta competenza che la stessa richiede per essere applicata nella diagnosi istologica, sono assai pochi gli studi disponibili al momento che la applichino. [47, 48]

Alcuni gruppi di studio non hanno indicato alcun tipo di criterio d’inclusione nella loro casistica di CHC, altri hanno scelto, in linea con la terza versione della classificazione WHO in vigore fino al 2010, di prendere in esame solo i tumori “misti” o “transizionali” identificabili con il tipo C di Allen. [49]

1.3 - Patogenesi

Per quanto riguarda l’istogenesi dei tumori di transizione, alcuni autori ritengono che la componente CC di alcuni CHC possa aver avuto origine da una deviazione della differenziazione di cellule di HCC, mentre altri suggeriscono che cellule epatiche pluripotenti possano primariamente incorrere in trasformazione maligna ed evolvere poi sia in HCC che in CC, nonché in tumori di tipo intermedio. [50]

La prima teoria ipotizza quindi una “perdita di differenziazione” da parte di epatociti maturi andati incontro a trasformazione tumorale.

La seconda, denominata “teoria dell’arresto di maturazione” si riferisce al concetto molto dibattuto secondo cui le neoplasie maligne del fegato possano derivare direttamente da cellule “staminali” (più correttamente pluri- o bipotenti) epatiche che subiscano primariamente una trasformazione maligna in un certo momento del loro processo di maturazione. [51-53]

Nel lavoro di Sell del 2001 [54] sulla plasticità epatica è stato ipotizzato che il fegato possa rispondere a stimoli proliferativi di vario genere su 3 livelli: (i) proliferazione epatocitaria, caratterizzata da una risposta rapida e massiva in tutto il fegato, ma limitata alla rigenerazione dei soli epatociti;

(ii) proliferazione da progenitori bipolari epato-biliari duttulari, capaci di riprodursi per più cicli degli epatociti e di differenziarsi nelle due linee; sembrerebbero attivarsi nel momento in cui la proliferazione epatocitaria fosse inibita; (iii) cellule staminali periduttulari, dalla possibile origine extraepatica (midollare) [55, 56], multipotenti ma più rare dei progenitori bipolari.

In modelli animali è stata dimostrata la presenza di piccole cellule indifferenziate dalla forma ovalare con alto rapporto nucleo/citoplasma ed esprimenti OV-6 che appaiono e proliferano a livello dei canali di Hering e intorno agli spazi portali nelle fasi iniziali della rigenerazione epatocitaria o della proliferazione colangiocitaria. Queste, dette cellule ovali, sono ritenute essere cellule progenitrici facoltative bipotenti, in grado perciò di evolvere sia in epatociti che in colangiociti ed in modelli animali è stata dimostrata una loro associazione nello sviluppo di neoplasie epatiche. [39, 57] Recentemente è stata confermata la presenza anche nell'uomo di cellule con simili localizzazione e caratteristiche morfologiche, ultrastrutturali, immunofenotipiche e funzionali, le quali sono state denominate "cellule progenitrici epatiche" (HPC) o anche "cellule intermedie epatobiliari". [58] Da notare come il termine "cellule ovali" non sia ritenuto corretto nell'uomo da alcuni autori in quanto, a fronte delle suddette somiglianze fra le due entità in uomo e animali non primati, esistono anche importanti differenze; per citarne una l'espressione di AFP che, mentre caratterizza le cellule ovali, non è normalmente riscontrata nelle HPC. [58] Queste cellule possiedono caratteristiche intermedie fra epatociti e colangiociti e sono state identificate in varie malattie epatiche umane, tra cui cirrosi, epatite virale cronica, FNH e adenoma epatocellulare, comparando in tutti i casi in cui si assista ad una cosiddetta "reazione duttulare" a seguito di stimoli di varia natura. Da notare come tali cellule di transizione non siano riscontrabili in un fegato sano in condizioni basali, nemmeno a livello dei canali di Hering che rappresentano la giunzione anatomo-fisiologica tra il sistema canalicolare intralobulare e l'albero biliare e in cui epatociti e colangiociti vengono a

contatto. [58] Vari studi hanno dimostrato come le HPC possiedano il potenziale di differenziarsi secondo una linea epatocitaria o colangiocitaria e hanno identificato marker immunofenotipici in grado di distinguere le varie fasi di questa maturazione. [51, 59]

Confrontando con metodiche immunoistochimiche l'espressione di questi marker in tessuti pre- e post-tumorali, diversi autori sono inclini ad affermare che la teoria dell'"arresto di maturazione" di precursori HPC sia la più accurata. Questo sarebbe vero in molti casi di HCC, ma ancor più fedelmente si applicherebbe ai casi di CHC di tipo II e III, in cui sono identificabili zone di transizione. [43, 52, 60-62]

L'esistenza stessa di tumori combinati che esprimono marker dei progenitori bipotenti è stata utilizzata come prova a sostegno dell'origine "staminale" della carcinogenesi di almeno una parte degli HCC. [39]

Anche una correlazione fra CC e HPC sembrerebbe essere importante, ma ulteriori studi mirati sarebbero necessari per dare risposte più decisive. [52]

Benché non ci sia ancora un accordo univoco, numerosi marker e tecniche sono stati utilizzati per identificare e caratterizzare le cellule epatiche staminali/progenitrici (HPC). Per esempio l'espressione simultanea all'immunoistochimica di marker epatocitari (HepPar1 o α -fetoproteina) e colangiocitari (citocheratina= CK 19, CK 7, EMA o antigene carcinoembrionario= CEA) è stata ritenuta utile. Anche l'espressione di molecole d'adesione nucleari (NCAM/CD56) e epiteliali (EpCAM) è stata riportata nelle cellule del fegato simili alle cellule ovali degli esperimenti su animali. [47] Altri marcatori generalmente considerati come candidati sono CD133, CD90, CD44, OV6, CD13 e c-kit. [48] Anche DLK1 è stato recentemente confermato rappresentare un candidato affidabile nell'identificazione dei caratteri staminali delle cellule carcinomatose epatiche ed è stato suggerito un suo potenziale utilizzo come target terapeutico nelle neoplasie originate da cellule staminali/progenitrici. [54, 63]

La quarta revisione del 2010 della classificazione WHO [46] ha definitivamente portato ad una “unificazione” dei vari sistemi di classificazione e delle teorie sulla patogenesi dei tumori bifenotipici del fegato. La forma “classica” di CHC comprende aree di HCC e aree di CC. Riconosce 3 possibili origini:

1. HCC e CC hanno origine e si sviluppano indipendentemente nello stesso fegato;
2. Un HCC o un CC ha origine per primo ed una quota di questo si trasforma successivamente nell'altra forma;
3. Uno stesso precursore HPC subisce trasformazione maligna e poi si differenzia, completamente o meno, sia in HCC che in CC. [54]

Per le forme “staminali” è stata confermata l'origine dai precursori HPC.

Due recenti lavori che hanno approfondito l'analisi di queste nuove classi di tumori hanno riscontrato differenze in eziologia, morfologia e fenotipo (anche gli stessi marcatori delle cellule staminali erano diversi). In base a ciò hanno confermato l'accuratezza e l'importanza di questa nuova classificazione nel descrivere la patogenesi dei tumori correlati a cellule staminali. [48, 54]

1.4 Sintomatologia

La sintomatologia del CHC, è poco specifica e compare di solito nelle fasi più tardive della malattia. I sintomi includono ittero non dolente, astenia, discomfort addominale, perdita di peso, prurito e talvolta ascite, colangite acuta, febbre, epatomegalia e distensione colecistica. [16, 62] Mediamente meno della metà dei pazienti manifesta sintomi al momento della resezione. [52]

1.5 - Diagnosi istologica

I criteri utilizzati nella diagnosi istologica di CHC nella grande maggioranza degli studi pubblicati sull'argomento si rifanno alla classificazione WHO precedente al 2010, per cui era sufficiente riscontrare entrambe le componenti HCC e CC nello stesso tumore mediante l'identificazione di pattern microscopici e, eventualmente, immunoistochimici dei due tipi di

differenziazione. Questi criteri sono applicabili anche alla caratterizzazione del CHC di tipo “classico” secondo la classificazione WHO 2010.

1.5.1 - Aspetto macroscopico:

Ad un primo esame macroscopico di un preparato istologico, le aree con predominanza di HCC spesso mostrano caratteristiche che includono un colore verde-giallo dovuto ai pigmenti biliari, aree di necrosi emorragica e una capsula fibrosa. Caratteristiche più propriamente colangiocarcinomatose sono la presenza di una massa infiltrativa biancastra con margini irregolari o di retrazione capsulare. [64]

1.5.2 - Aspetto microscopico e marker immuno-istochimici:

Le principali caratteristiche microscopiche considerate “HCC-like” sono:

- pattern di crescita trabecolare;
- produzione di bile;
- presenza di canalicoli biliari intercellulari;
- citoplasma eosinofilo, nuclei prominenti, corpi ialini (di Mallory-Denk), globuli di alfa1-antitripsina;
- stroma fibroso scarso.

Quelle tipiche per ICC sono:

- formazione di strutture ghiandolari “vere” definite;
- cellule cuboidali, nuclei rotondi;
- produzione di mucina (dimostrabile con reazione dell'acido periodico di Schiff o Alcian blu);
- stroma fibroso (desmoplastico) abbondante;

Per la diagnosi di tumore combinato, entrambe queste componenti dovrebbero essere riscontrate ed idealmente si dovrebbe anche cercare di visualizzare un'interfaccia di contatto in cui sia visibile un intimo mescolamento fra le due. [65, 66]

Alcuni autori hanno scelto di considerare un tumore combinato come tale solo se le due componenti costituivano ciascuna almeno il 10% della massa totale, mancando nella definizione WHO un'indicazione a tal proposito. [5, 67, 68]

Una diagnosi più accurata richiede l'uso di metodiche immunocitochimiche per identificare la presenza simultanea dei due fenotipi. Tipicamente si cercano HepPar1, CEA policlonale o CD10 per la differenziazione epatocitaria e mucina, CK7 e CK19 per quella biliare. [65, 66, 69, 70]

1.5.3 - Possibili errori interpretativi:

Yeh, nella sua review del 2010 sulla patologia del CHC, [65] segnala alcuni elementi che possono creare errori diagnostici in analisi anatomo-patologiche:

- Alcuni HCC esprimono positività per marker tipicamente colangiocitari, come CK 7 e CK 9, i quali non sono quindi assolutamente specifici e non dovrebbero essere presi come unico riferimento per la diagnosi definitiva.
- Il riscontro di pseudoghiandole che riflettono una replicazione neoplastica attiva e rapida è un'evenienza comune negli HCC ed esse non dovrebbero essere confuse con le vere e proprie strutture ghiandolari che appaiono nei CC. La ricerca di produzione di mucina o di bile mediante colorazioni specifiche è utile per differenziare i vari casi (la prima è tipica delle componenti CC, la seconda di quelle HCC).
- Lo sviluppo di una marcata reazione duttulare con atipie adiacente a noduli di HCC dovuta all'effetto massa di questo è un'altra evenienza non rara. Questi duttuli atipici non devono essere interpretati come componenti CC di un tumore misto. Sfortunatamente l'immunocitochimica è di scarso aiuto nel differenziare un epitelio biliare maligno da una reazione duttulare. In generale la reazione duttulare è spesso accompagnata da infiltrato infiammatorio, mentre le componenti CC sono di solito circondate da un abbondante stroma desmoplastico che non contiene cellule infiammatorie.

Yeh ipotizza che alcune delle importanti differenze riscontrate nei vari studi per quanto concerne le caratteristiche clinico-patologiche dei CHC possano essere state in parte causate da diagnosi errate nei casi per così

dire ambigui in cui non siano stati adottati dei criteri anatomopatologici stringenti. HCC atipici potrebbero essere stati per esempio inseriti nelle casistiche, portando alla conclusione che i CHC siano più simili ai HCC di quanto non lo siano ai CC.

Le sottocategorie WHO 2010 dei CHC a cellule staminali sono caratterizzate da:

- CHC-SC “classico”: Presenza di cluster di cellule “stem-like” attorno ad aree di HCC ben differenziato. All’interfaccia sono presenti dei setti con abbondante tessuto fibroso. Queste cellule sono piccole, con alto rapporto nucleo/citoplasma e nucleo ipercromico e occasionalmente appaiono positive per CK19.
- CHC-SC “intermedio”: Presenza di cellule tumorali con caratteristiche intermedie fra HCC e CC organizzate in cordoni, cluster solidi e/o trabecole. Sono piccole, uniformi, con citoplasma scarso e nucleo ipercromico e risultano positive contemporaneamente a HepPar1 e CK19. Lo stroma fibroso è da moderato a abbondante.
- CHC-SC “colangiolocellulare”: Presenza di elementi simili a duttuli biliari reattivi sovrapposti e formanti cordoni ghiandolari anastomotici (pattern a corno “antler-like”) inseriti in uno stroma fibroso abbondante. Le cellule appaiono più piccole dei normali epatociti, cuboidali, con alto rapporto nucleo citoplasma e nucleoli distinti. Sono solitamente positivi a CK7 e/o CK19.

In tutti e 3 i casi non è riscontrata produzione di mucina. [46-48]

1.6 – Imaging, marker tumorali, biopsia e difficoltà diagnostiche

Criteri specifici per la diagnosi pre-operatoria di CHC non sono stati ancora stabiliti, tuttavia molte sono le ragioni per compiere nuovi passi in questo senso. Appurato che il CHC debba essere considerato un tumore a sé e trattato tenendo conto delle differenze che intercorrono tra questo e gli altri tumori primitivi epatici, un forte sospetto diagnostico tramite

tecniche non invasive permetterebbe di impostare al meglio già la diagnosi invasiva. [71] Un esempio di ciò è l'apparente tendenza del CHC, similmente al CC, a mostrare un comportamento infiltrativo locale più aggressivo e a diffondere precocemente ai linfonodi regionali, tanto da rendere necessaria, secondo vari autori, un'epatectomia più allargata e una linfadenectomia regionale primaria (vedi dopo). [72]

1.6.1 - Ecografia B-mode e con mezzo di contrasto

Data la scarsa accuratezza dell'ecografia in B-mode nel caratterizzare le lesioni epatiche in genere, pochi studi hanno riportato risultati con tale metodica nello studio del CHH. Choi et al. In un lavoro del 1994 [73] ne hanno descritto l'aspetto all'ecografia B-mode come di massa ipoecogena con un centro iperecogeno ("a bersaglio") con eterogeneità ecostrutturale, potenzialmente riferibile alla disomogeneità istologica di tale tumore. Si segnala che la casistica di tale studio era costituita da 3 noduli del tipo B di Allen e 3 noduli del tipo C e tutti e 6 i pazienti portatori di cirrosi epatica.

In un lavoro del 2010, Panjala et al. [8] hanno riportato una sensibilità della metodica nel rilevare il tumore di solo il 40%. La metà delle lesioni erano omogenee e l'altra metà eterogenee; un 60% apparivano ipoecogene e un 40% isoecogene. In tutti i casi i noduli identificati erano stati diagnosticati come HCC.

L'introduzione, a cavallo del nuovo millennio, del mezzo di contrasto per ecografia ha aumentato significativamente le potenzialità della metodica (contrast enhanced ultrasound: CEUS), che è diventata uno strumento importante nel valutare lesioni focali benigne e maligne del fegato. In particolare è stata dimostrata la sua utilità nel caratterizzare le lesioni benigne (iperplasia nodosa focale, angiomi) e maligne (secondarismi) su fegato sano. Nel paziente con noduli di HCC su cirrosi la CEUS è entrata nell'iter diagnostico di tale patologia, alla pari di TC e RM, nelle linee guida del 2005 dell'American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) [74]. Nello specifico, una diagnosi di HCC poteva, secondo tali linee guida, essere ottenuta senza ricorso a metodiche invasive con la

sola CEUS, quando un nodulo >2 cm in un paziente cirrotico sotto monitoraggio presentasse le caratteristiche tipiche per HCC, ovvero un'iperenhancement diffuso in fase arteriosa e un successivo lento "wash-out" del mezzo di contrasto nelle fasi portale e tardiva con risultante modesta ipoecogenicità del nodulo. [75, 76]

Questo ruolo della CEUS è stato poi messo in discussione in seguito al riscontro di un aspetto suggestivo per HCC anche di una significativa quota (47.6%) di colangiocarcinomi intraepatici (ICC) su cirrosi. [77] Per tale motivo la CEUS è stata fra il 2011 e 2012 rimossa dall'algoritmo diagnostico delle linee guida americane (AASLD) [17] ed europee (EASL-EORTC) [78], conservando l'ecografia un ruolo nel follow-up stretto delle lesioni sotto al centimetro.

Per quanto concerne il ruolo della CEUS nella diagnosi del CHC, non sono stati, per quanto a nostra conoscenza, compiuti studi mirati. Il presente lavoro si propone, fra i vari obiettivi, di fornire indicazioni a tale riguardo nella specifica "nicchia" dei pazienti affetti da cirrosi epatica in due centri italiani.

1.6.2 - TC e RM con mezzo di contrasto

La tomografia assiale computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM) con mezzo di contrasto endovenoso sono le due metodiche d'imaging cosiddetto "dinamico" utilizzate per porre diagnosi non invasiva in un nodulo epatico insorto "de novo" su cirrosi o comunque durante una sorveglianza in pazienti ad alto rischio per HCC. In generale l'approccio diagnostico preferito, è quello sequenziale: la presenza di un pattern contrastografico tipico per HCC a una di queste metodiche in un nodulo >1 cm su cirrosi è considerata sufficiente per la diagnosi, mentre una negatività od un comportamento dubbio sono indicazioni all'uso della seconda tecnica; nei casi che rimanessero dubbi è raccomandato il ricorso alla biopsia. [17] Diversi autori hanno riportato una certa correlazione fra l'aspetto macro- e microscopico delle lesioni e i risultati delle scansioni TC e RM con mezzo di contrasto per quanto concerne HCC e CC e questi

stessi criteri sono stati applicati nello studio dei CHC. [72] In particolare, l'importanza della possibilità di prevedere per mezzo dell'imaging quale sia la componente principale di un tumore combinato (intesa come predominanza di cellule di HCC o di CC), potrebbe essere importante nel definire in anticipo la gestione del paziente in quanto CHC istologicamente diversi potrebbero necessitare di approcci terapeutici diversi (vedi dopo). [71]

1.6.2.1 - Pattern contrastografici HCC e CC all'imaging dinamico TC e RM

I pattern di assorbimento del mezzo di contrasto considerati "tipici" per le 2 principali neoplasie epatiche sono:

a) HCC: in fase contrastografica arteriosa si assiste ad una rapida e di solito omogenea captazione di mezzo di contrasto (Contrast enhancement: CE) che rende il nodulo nettamente iper-denso/intenso rispetto al fegato circostante. In fase portale e venosa, si verifica un progressivo wash-out del mdc e la lesione appare ipo-densa/intensa rispetto al restante parenchima. La perdita di vascolarizzazione portale e lo sviluppo di un letto arterioso anomalo (neoangiogenesi tumorale) è ciò che caratterizza la progressione verso la malignità nella patogenesi dell'HCC. Questa vascolarizzazione prettamente arteriosa di questo tipo di tumore spiega il suo comportamento all'imaging contrastografico. [17, 78]

Segni ancillari suggestivi per HCC sono anche l'angioinvasione e la formazione di una pseudocapsula. [71, 79]

b) CC: il comportamento contrastografico più frequente è rappresentato da un moderato contrast enhancement arterioso limitato all'area più periferica del nodulo (aspetto anche definito "rim-like" o a orletto/cercine periferico) che può mantenersi in seguito nelle fasi tardive oppure mostrare un avanzamento centripeto con aspetto omogeneamente iso-denso/intenso, senza wash-out. [72, 80, 81] Questo comportamento riflette la frequente presenza di un abbondante stroma fibroso centrale (reazione desmoplastica) che trattiene più a lungo il mezzo di contrasto usato in

TC/RM in questo tipo di tumore, specialmente nei noduli > 3 cm. Murakami et al. [82] segnalano come la componente fibrosa e quindi la comparsa di CE periferico/centrale non siano uguali per tutti i CC ma dipenda dalla natura del CC, che può essere sottoclassificato in midollare e scirroso.

Il motivo dell'enhancement periferico risiederebbe nella relativa ipervascolarità reattiva di questa zona rispetto al resto del nodulo. [83]

Segni ancillari indicativi di CC sono: l'irregolarità dei margini, la retrazione capsulare con atrofia parenchimale dei segmenti epatici contigui al tumore, la dilatazione focale dei dotti biliari attorno al nodulo CC. [64, 67, 71, 79, 84] Un esempio di quest'ultimo segno è visibile più avanti nella **Figura 2.2**, relativa allo studio sperimentale.

1.6.2.2 - TC e RM nel CHC

Alcuni autori hanno indagato retrospettivamente la presenza di una correlazione fra i pattern istologici e radiologici nel CHC.

Dato che la quota di elementi riconoscibilmente epatocitari e colangiocitari dello stesso tumore solitamente non si equivale, i noduli dei pazienti con diagnosi istologica di CHC sono stati in diversi studi divisi in due classi: a predominanza HCC (HCC>50%) e a predominanza CC (CC>50%). [71, 72] Il fatto che una componente prevalga sull'altra sembra essere più importante per quanto riguarda le recidive di malattia post-resezione: in uno studio tali noduli secondari hanno mostrato di possedere differenziazione univoca CC o HCC. Questo è sicuramente logico se si prende in considerazione una malattia primaria del tipo A o B di Allen, in cui le due componenti sono separate, ma sembra essere vero anche nel caso dei tumori misti. [71]

Sia Shin et al. [73] che Fowler et al. [38] riportano come in una grande maggioranza dei casi i radiologi chiamati ad esaminare le immagini TC e RM dei pazienti delle 2 classi sopra citate siano riusciti, conoscendo già la diagnosi finale di tumore combinato, a individuare correttamente i noduli con predominanza dell'una o dell'altra componente e nella (quasi) totalità dei casi abbiano identificato correttamente la natura della recidiva. Come

già accennato, sia nel caso della diagnosi primaria sia in quello della diagnosi delle recidive, conoscere la predominanza di HCC o di CC è importante poiché ciò influenza direttamente la prognosi del paziente e la strategia terapeutica da utilizzare. [71, 85]

L'importanza di questi studi rimane comunque limitata poiché la diagnosi di CHC era già nota al momento della revisione dell'imaging. Resta invece aperto l'interrogativo riguardo alla possibilità di arrivare ad una diagnosi pre-operatoria di tumore combinato basato sulla sola diagnostica per immagini. Ciò che sembra emergere dai pochi studi condotti al riguardo è che tale risultato possa essere raggiunto solo in una percentuale limitata di casi. [38] Alcuni autori hanno cercato di identificare dei pattern che si riproducessero in maniera affidabile, ma le sovrapposizioni con HCC e CC e la variabilità delle presentazioni, oltre alla scarsità del campione preso in esame, hanno portato a risultati non univoci.

Tuttavia possono essere fatte alcune considerazioni:

1. I noduli con comportamento unicamente da HCC tipico (enhancement arterioso in fase precoce e washout in f. tardiva e portale) non possono essere distinti da quest'ultimo in assenza di altri indizi; questi noduli possiedono probabilmente una componente HCC marcata. [72]
2. La variabilità del comportamento contrastografico del nodulo dipende in gran parte dalla componente colangiocitaria, la quale, dotata di una propria intrinseca eterogeneità, influenza un quadro già di per sé complesso.
Da ciò consegue che la maggiore difficoltà stia proprio nel differenziare le forme CHC con comportamento CC-like dai CC. [38, 72]
3. D'altra parte, pattern vascolari atipici per HCC (immagini a bersaglio con enhancement periferico in fase arteriosa, inversione dell'aspetto a bersaglio in fase tardiva [64, 86] o reperti accessori CC-like (dilatazione delle vie biliari, retrazione capsulare, ecc...)

rendono la diagnosi di HCC puro poco probabile e impongono ulteriori esami invasivi per distinguere CC e CHC. [38, 64, 85]

4. La presenza nello stesso tumore di zone con comportamento tipico per HCC e altre, distinte, con comportamento tipico CC (lieve enhancement ritardato) potrebbe invece essere di per sé porre sospetto di tumore misto, rimanendo tuttavia un reperto non specifico (es. aspetto “nodulo in nodulo” degli HCC). [72]
5. In effetti uno studio molto recente ha mostrato come, a fronte di una bassa sensibilità (33-34%), TC e RM potrebbero avere una specificità per la diagnosi primaria di CHC superiore all’80%, stando ciò a significare che, benché si riescano ad identificare questi tumori in solo un minoranza dei casi, quando ciò accade la diagnosi sarebbe molto probabile. Questo discorso rimane comunque limitato all’ambiente sperimentale di quello specifico studio, in cui i radiologi chiamati a revisionare le immagini sapevano a priori di trovarsi di fronte a HCC o CC o CHC e appare difficilmente applicabile a una situazione “reale”. [38]
6. Elementi accessori, come i marker tumorali, possono far sospettare un tumore combinato quando non siano congruenti con l’imaging. [6, 16, 38, 87]

1.6.2.2.1 - Focus sulla risonanza magnetica con m.d.c

La maggioranza degli studi finora pubblicati sull’imaging del CHC si è focalizzata sugli aspetti TC, e i pattern di captazione dei mezzi di contrasto endovenosi con metodiche TC e RM sono stati considerati sovrapponibili fra loro.

Pochi sono gli studi che si sono concentrati sugli aspetti peculiari della risonanza magnetica nell’ambito ristretto della diagnosi di carcinoma combinato, benché quest’ultima sia generalmente accettata come la metodica diagnostica più accurata nello studio dei noduli epatici insorti su cirrosi, specialmente in quelli piccoli, e abbia pari sensibilità e specificità rispetto alla TC nei riguardi del HCC in generale. [88]

In particolare uno studio del 2012 [89] si è concentrato sull'analisi di immagini RM in noduli di CHC. La casistica includeva 11 pazienti, di cui 5 con storia di epatopatia cronica.

L'aspetto RM è risultato essere solitamente una massa solitaria, eterogeneamente iperintensa nelle immagini pesate T2. Il pattern di enhancement più comune nei fegati non cirrotici era un aspetto rim-like (ad anello) con progressiva captazione nelle fasi tardive delle regioni centrali. Questo comportamento è tipico per le metastasi epatiche [90], che sono estremamente più frequenti. Ciò renderebbe una falsa diagnosi di queste ultime estremamente probabile in questi casi. La presenza di aree dimostranti wash-out potrebbe indirizzare la diagnosi, ma si tratta di un'evenienza non comune. Nei fegati cirrotici il pattern più frequente era un enhancement omo-/eterogeneo diffuso con parziale washout e parziale ritenzione di mdc nelle fasi tardive. Il rilevamento di questo tipo di comportamenti dovrebbe richiedere un'esclusione del CHC dalla diagnosi differenziale tramite ad esempio la valutazione di criteri clinici accessori quali i marker tumorali e l'utilizzo di una biopsia allargata in tutti i casi considerati comunque dubbi. [8, 38, 85]

1.6.3 - PET e PET-TC

La tomografia ad emissione di positroni (PET) con utilizzo del tracciante nucleotidico 18-fluorodeossiglucosio (FDG) è diventata uno strumento fondamentale per lo staging in varie neoplasie umane. L'utilizzo di questa tecnica nella diagnosi dei tumori primitivi del fegato è tuttavia stato limitato dal fatto che l'HCC ben differenziato, al pari degli epatociti normali, non mostra una captazione del tracciante sufficiente per distinguere il nodulo tumorale dal restante parenchima. [91] L'attività enzimatica associata al metabolismo glucidico e quindi l'avidità per il FDG sembrano, infatti, andare di pari passo con il grading citologico della neoplasia e risultano massimi per lesioni scarsamente/non differenziate. [92]

A fronte di una bassa sensibilità nella diagnosi dei tumori primitivi epatici in toto (50-55%), la PET è in grado di individuare correttamente un'alta

percentuale (83-89%) [91, 93] di metastasi extraepatiche di HCC o CHC maggiori di 1 cm di diametro, le quali mostrano di solito una differenziazione di grado moderato o minore. [94]

Sebbene la PET sia in grado di raggiungere affidabilità superiori a tutte le altre tecniche nel rilevare localizzazioni secondarie a livello osseo, essa ha dimostrato minore sensibilità nei confronti delle metastasi polmonari, le quali sono spesso piccole (il limite fisico di risoluzione della metodica è di 8 mm) e soggette ai movimenti respiratori. Un'altra differenza rispetto alla TC è la non ottimale capacità della PET di distinguere fra adenopatie benigne e maligne, a fronte di un'ottima sensibilità nel rilevare tutte le stazioni linfonodali alterate nelle scansioni full body. [91]

Le recenti apparecchiature in grado di combinare l'acquisizione d'immagini PET e TC nella stessa seduta sfruttano i punti forti di entrambe le metodiche e portano la sensibilità nel rilevamento di lesioni secondarie extra-epatiche di HCC o CHC sopra al centimetro di diametro a valori molto alti (98%).

La PET-TC ha 2 funzioni principali nello studio di HCC e CHC: [91]

1. nella stadiazione pre-operatoria (resezione o trapianto), per ricercare lesioni extraepatiche secondarie o altre neoplasie;
2. nel monitoraggio delle stesse lesioni dopo trattamenti non chirurgici (es. radioterapia o chemioterapia).

Per quanto a nostra conoscenza, nessuno studio ha focalizzato l'attenzione sulla diagnosi PET di tumore combinato.

1.6.4 - Conclusioni sull'imaging

In conclusione nella maggioranza dei casi non si può raggiungere una diagnosi di certezza di CHC sulla sola base dell'aspetto all'imaging dei noduli perché questo tumore non possiede caratteristiche specifiche. La diagnosi deve tuttavia essere sospettata quando TC o RM mostrino caratteristiche contrastografiche non tipiche per HCC o CC o, soprattutto, quando queste siano combinate assieme nello stesso nodulo. [64] Reperti ancillari all'imaging e marker tumorali possono far sospettare un tumore

combinato quando questi siano in contrasto con quanto suggerito dal pattern contrastografico. [6, 16, 38, 87]

1.6.5 - Marcatori tumorali

L'alfa-fetoproteina umana (AFP) e l'antigene carbocitario 19-9 (CA 19-9) sono normalmente considerati i marker sierologici di riferimento per rispettivamente HCC e CC.

L'AFP è una glicoproteina legata all'albumina che normalmente viene sintetizzata durante lo sviluppo fetale in cellule epatiche non differenziate e di solito non è presente in tessuti adulti normali. Durante lo sviluppo di un HCC la produzione di AFP può riprendere e i livelli sierici di quest'ultima risultano aumentati in un 70-95% dei casi. [95]

Il CHC ha dimostrato un comportamento simile e la misurazione dei livelli di AFP è una prassi comune nella valutazione anche di tale tumore, tuttavia va fatto notare che molti autori riportano una minore frequenza di elevazione e minori valori assoluti rispetto a quanto osservato per il HCC. [4, 49]

Il CA 19-9 è un antigene ad alto peso molecolare localizzato nella membrana cellulare che viene frequentemente utilizzato come marker tumorale di adenocarcinomi a derivazione pancreatica/biliare e quindi anche di CC. Analogamente al caso della AFP, il CHC ha dimostrato di possedere caratteristiche intermedie, mostrando elevazioni di CA 19-9 sierico più significative dell'HCC ma di minore entità rispetto ai colangiocarcinomi puri. [4]

In conclusione, in base a quanto emerso finora dagli studi, si può sostenere con relativa accuratezza che il CHC tenda ad associarsi più frequentemente a livelli di AFP maggiori del CC ed a livelli di CA 19-9 maggiori dell'HCC [4, 49]. La presenza contemporanea di alti livelli di entrambi i marcatori, magari associata a reperti all'imaging tipici per HCC, è considerata da alcuni autori uno dei pochi casi in cui una diagnosi del tumore combinato, molto raro e dai caratteri aspecifici, possa essere sospettata prima di ricorrere a metodiche invasive (vedi dopo). [49, 87]

1.6.6 - Ruolo della biopsia

Come si è visto, nonostante un uso adeguato e competente di tutte le metodiche d'imaging non invasivo disponibili, la maggior parte dei CHC sono tuttora mal interpretati come HCC o ICC. Per questa ragione l'utilizzo della biopsia è ritenuto imprescindibile in tutti i casi che rimangano dubbi. Nonostante ciò, molti CHC vengono identificati solo in seguito a resezione epatica, in un momento in cui una corretta diagnosi avrebbe potuto influenzare l'approccio chirurgico, se non escluderlo. La ragione di ciò è che la diagnosi di questo tumore rimane una sfida difficile anche con l'utilizzo di campionatori bioptici ad ago di grande diametro. Il campione di tessuto prelevato potrebbe infatti non contenere entrambe le componenti del tumore, che come si è visto non sono sempre uniformemente presenti nel nodulo. [65] Per questa stessa ragione, campionamenti che permettano solo esami citologici (come l'agoaspirato) non sono ritenuti sufficienti per il CHC. [96]

1.6.7 – Conclusioni sulla diagnosi

Considerando quanto detto finora, in conclusione si può concludere che la diagnosi di questo tumore richieda l'utilizzo combinato ed il confronto di criteri clinico-laboratoristici, di varie metodiche d'imaging dinamico avanzato in mano ad operatori esperti e di studi istologici morfologici e immunoistochimici all'avanguardia, che utilizzino magari criteri di campionamento più invasivi (biopsia allargata). [16, 65]

1.7 - Stadiazione

1.7.1 - Classificazione TNM - sesta revisione

Fino alla sesta revisione del manuale del 2002 [97] della American Joint Committee on Cancer, al CHC non era assegnato un sistema di classificazione specifico, ma questi era accorpato a HCC e CC in un sistema generico per le neoplasie primitive del fegato.

Tumore primario	
TX	Tumore primario non identificabile
T0	Non evidenza di umore primario
T1	Tumore solitario <2cm di diametro, non invasione vascolare
T2	Tumore solitario <2cm di diametro con presenza d' invasione vascolare
(oppure)	Tumori multipli in un solo lobo, nessuno dei quali >2 cm di diametro, senza invasione vascolare
(oppure)	Tumore solitario >2cm senza invasione vascolare
T3	Tumore solitario >2cm con invasione vascolare
(oppure)	Tumori multipli in un solo lobo, nessuno dei quali >2cm di diametro, con invasione vascolare
(oppure)	Tumori multipli in un solo lobo, uno dei quali >2cm di diametro, con o senza invasione vascolare
T4	Tumori multipli in più di un lobo
(oppure)	Coinvolgimento del ramo maggiore della vena epatica o della vena portale
(oppure)	Invasione diretta di organi adiacenti, esclusa la colecisti
(oppure)	Perforazione del peritoneo viscerale
Linfonodi regionali	
NX	Linfonodi regionali non identificabili
N0	Non evidenza di linfonodi regionali
N1	Metastasi ai linfonodi regionali presenti
Metastasi a distanza	
MX	Metastasi a distanza non identificabili
M0	Non evidenza di metastasi a distanza
M1	Metastasi a distanza presenti
Raggruppamento degli stadi	
Stadio I	T1 - N0 - M0
Stadio II	T2 - N0 - M0
Stadio IIIa	T3 - N0 - M0
	T1 - N1 - M0
Stadio IIIb	T2 - N1 - M0
	T3 - N1 - M0
Stadio IVa	T4 - qualunque N - M0
Stadio IVb	qualunque T - qualunque N - M1

Tabella 1.3 – Classificazione TNM delle neoplasie primitive del fegato (2002)

[Greene, F.L., American Joint Committee on Cancer., and American Cancer Society., AJCC cancer staging handbook : from the AJCC cancer staging manual. 6th ed. 2002, New York: Springer. xv, 469]

1.7.2 - Classificazione TNM - settima revisione

A partire dalla settima revisione del 2010 del manuale di classificazione AJCC [98], il CHC è stato accorpato al colangiocarcinoma intraepatico (ICC) come segue:

Tabella 1.4 – Classificazione TNM delle neoplasie primitive del fegato (2010)

[Edge, S.B., American Joint Committee on Cancer., and American Cancer Society., AJCC cancer staging handbook : from the AJCC cancer staging manual. 7th ed. 2010, New York: Springer. xix, 718]

Tumore primario	
T1	Tumore solitario senza invasione vascolare
T2a	Tumore solitario con invasione vascolare
T2b	Tumori multipli, con o senza invasione vascolare
T3	Perforazione del peritoneo viscerale o invasione diretta degli organi adiacenti
T4	
Raggruppamento degli stadi	
I	T1 - N0 - M0
II	T2 - N0 - M0
III	T3 - N0 - M0
IV A	T4 - N0 - M0
	qualunque T - N1 - M0
IV B	qT - qN - M1

1.8 - Trattamento

Le strategie disponibili per il trattamento del CHC rispecchiano quelle degli altri tumori primitivi epatici, tuttavia non vi è ancora un consenso universale su i criteri da adottare per scegliere tra queste metodiche nel caso specifico del CHC. Tutti sono comunque concordi nell'affermare che la chirurgia sia l'unica opzione curativa disponibile. [12, 16]

Lo studio di Yin et al. [10], di recente pubblicazione (2012), contiene la casistica in assoluto più ampia mai riportata in uno studio monocentrico sul CHC (113 pazienti) con buona omogeneità istologica del campione (tutti i casi sono del tipo C di Allen) e si occupa specificamente del

problema del trattamento di questo tumore. In questa casistica vi era un'alta prevalenza d'infezioni virali (HbsAg+ in 73,4% e anti-HCV+ in 1% dei casi) e di cirrosi (67,0%) e alti livelli medi di AFP (mediana=136 ng/mL, range: 2-34.105), in linea con i risultati di studi condotti in Oriente.

I tumori considerati resecabili con intento radicale (vedi dopo per i criteri di radicalità) ricevevano una chirurgia resettiva primaria. Le eventuali (ma molto frequenti) recidive erano trattate con finalità curative o palliative mediante chirurgia secondaria, terapie ablative regionali (radiofrequenza o iniezioni di etanolo), TACE, terapia sistemica o *best supportive care*.

I tumori non resecabili venivano trattati in base alla funzionalità epatica residua con TACE o terapie locoregionali (Child-Pugh A-B) o *best supportive care* (Child-Pugh C). [10]

La sopravvivenza assoluta e quella libera da malattia sono direttamente correlate alla strategia adottata: sono massime per la resezione radicale, intermedie (ma piuttosto basse) per terapie ablative loco-regionali e resezione palliativa e minime per TACE e *best supportive care*.

Come si è detto, la chirurgia è l'unica opzione terapeutica con finalità curativa disponibile, e la strategia terapeutica, come per HCC, dipende altamente sia dallo stadio TNM che dalle condizioni funzionali del fegato sottostante. Il ruolo del trapianto di fegato è comunque controverso e verrà discusso di seguito. [16, 65]

1.8.1 - Resezione epatica

L'obiettivo primario dovrebbe essere la completa escissione con margini liberi da malattia, con il minimo impatto possibile sulla funzionalità del fegato, poiché quest'ultima, se viene troppo danneggiata, compromette la prognosi indipendentemente dal successo della procedura. [16]

I criteri per definire una resezione "radicale" adottati dall'équipe di Yin [10] sono stati:

1. rimozione completa di tutti i noduli tumorali con margini macro- e microscopicamente liberi da tessuto tumorale;

2. assenza di trombi neoplastici nei due rami principali o nel tronco comune della vena porta, in vene epatiche, e dotti biliari;
3. numerosità dei noduli non eccedenti le 3 unità;
4. assenza di metastasi extraepatiche;

Il CHC sembra “ereditare” il venotropismo e la tendenza a dare invasione della vena cava dall’HCC e l’attitudine alla crescita perineurale e all’invasività ai linfonodi regionali dal CC. [9, 10, 67, 99-101]

La quota di differenziazione CC del CHC sembra essere il fattore più importante a determinarne, negativamente, prognosi e pattern di recidiva. [4, 6, 102, 103] In linea con ciò, Tang et al. [49] hanno riscontrato una netta prevalenza di componenti CC all’interno delle lesioni recidive extraepatiche. Tuttavia non c’è consenso universale in materia e alcuni autori hanno riscontrato un comportamento particolarmente aggressivo da parte di questa neoplasia indipendentemente dalla quota relativa della componente CC e dal tipo di Allen. [68] La resezione epatica con dissezione linfonodale è considerata dalla maggioranza degli autori il trattamento di scelta nel CHC nei non cirrotici. [16, 72, 100, 102]

Zuo et al. [101] hanno studiato la fattibilità e il ruolo della linfadenectomia regionale in pazienti con metastasi al legamento epato-duodenale ritenendo un’epatectomia maggiore combinata alla dissezione dei linfonodi attorno al peduncolo epatico, nello spazio retropancreatico e nell’area intorno all’arteria epatica comune ed al tronco celiaco un approccio relativamente sicuro. La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti di questo studio era comunque bassa e a la questione dell’effettivo impatto positivo sulla prognosi di questa procedura e della sua adottabilità come tecnica standard rimane tuttora controversa. [16, 87, 100, 101, 104]

Nei pazienti affetti da cirrosi la resezione epatica comporta un rischio di complicazioni maggiore e per questo vengono adottati di criteri d’inclusione stringenti. Come accade per l’HCC, la funzionalità epatica ridotta di questi pazienti è il principale fattore limitante la fattibilità e l’aggressività dell’intervento resettivo. [16]

La riserva funzionale può essere approssimativamente calcolata per mezzo di score clinico-laboratoristici, di seguito elencati.

Il **Child-Turcotte-Pugh score (CTP)** è calcolato sulla base dei valori di albumina e bilirubina sieriche, di *international normalized ratio* (INR) e della presenza o meno di ascite e di encefalopatia epatica.

Il CTP-score è stato classicamente utilizzato per selezionare i candidati per la resezione. Teoricamente, i pazienti in classe CTP A dovrebbero poter tollerare resezioni fino al 50% del volume epatico, mentre quelli in classe B fino al 25%. [105] Tuttavia negli anni questo score ha dimostrato di non essere un indice sempre affidabile: alcuni pazienti in classe A, infatti, possono manifestare altri segni di diminuita riserva come l'aumento della pressione portale, non direttamente considerata nel CPT [17]. Alcuni studi hanno mostrato come una normale concentrazione di bilirubina e l'assenza d'ipertensione portale clinicamente significativa (<10mmHg) siano ottimi predittori di un buon risultato della resezione. [106]

Il **Model-for-End-stage-Liver-Disease (MELD) score** è calcolato dai valori di INR, bilirubina sierica totale, creatinina sierica ed eziologia della patologia epatica. Fu inizialmente sviluppato per calcolare la prognosi a breve termine dei pazienti affetti da cirrosi sottoposti a shunt porto-sistemico intraepatico transgiugulare (TIPS) [107], ma è stato utilizzato con successo come predittore di mortalità in pazienti con malattia epatica a prescindere dall'eziologia, e nella valutazione pre-chirurgica, sia per la resezione epatica che per il trapianto ortotopico. In quest'ultimo caso trova un importante ruolo nel sistema di attribuzione dei punti per l'allocazione degli organi disponibili per il trapianto. [108]

Il **verde d'indocianina (ICG)** è un colorante anionico che viene rapidamente captato dagli epatociti ed escreto da questi nella bile. La clearance plasmatica del verde d'indocianina è in grado di predire il rischio d'insufficienza epatica postoperatoria ed è ampiamente utilizzato in questo contesto in alcuni paesi, soprattutto in Giappone [17]. La quantità residua di ICG a 15 minuti dall'iniezione dovrebbe essere, in un fegato normale, inferiore al 10%. Valori di ritenzione superiori al 40% rendono molto

probabile lo sviluppo d'insufficienza epatica anche in seguito a piccole resezioni. [74]

Secondo Jarnagin et al., l'eziologia del CHC influenza indirettamente anche la possibilità di eseguire un intervento radicale: mentre nelle casistiche in cui si registrava un'alta prevalenza di epatiti virali e di cirrosi i CHC erano più simili in termini di comportamento biologico agli HCC e il fattore limitante l'intervento era la funzionalità epatica, nel loro campione, in cui questi fattori erano molto meno presenti, a determinare la reseccabilità era piuttosto il comportamento aggressivo dei tumori, più simili in questo caso ai CC. [6]

1.8.2 - Trapianto di fegato

Il fegato è stato ampiamente riportato essere il più frequente sito di recidiva di malattia nel CHC, anche se questa è l'unica sede in una percentuale più bassa di casi rispetto a quanto accada nel caso dell'HCC. [6, 7, 67, 68, 104, 109, 110]

Il trapianto di fegato è l'unica tecnica che possa assicurare una completa rimozione di tutti i foci tumorali intraepatici e del tessuto a rischio di progressione maligna per malattia epatica cronica [105], tuttavia manca un consenso universale sulle indicazioni al trapianto per CHC, per il quale sono stati compiuti pochi studi e registrati tassi di recidiva piuttosto alti e prognosi in molti casi insoddisfacenti. [8, 68, 85, 111]

Panjala et al. [8] riportano la loro esperienza con 12 pazienti che hanno ricevuto un trapianto di fegato con indicazione per HCC o CC e successivo riscontro anatomico-patologico di CHC sull'espianto. Il 58% ha sviluppato metastasi a un tempo medio di 539 giorni dal trapianto. A un follow-up mediano di 335 giorni, il 58% di pazienti era morto, di cui 86% per metastasi. Un solo paziente è deceduto per complicazioni post-operatorie.

L'analisi della sopravvivenza ha mostrato una probabilità cumulativa di essere in vita a 1, 3 e 5 anni per questi pazienti rispettivamente del 79%, 66% e 16%. Gli autori concludono che il CHC abbia una maggiore sopravvivenza a 3 anni ma peggiore a 5 anni rispetto alla resezione. Il

dato a 5 anni era confrontabile o leggermente migliore rispetto a quello dei pazienti trapiantati affetti da ICC (0-18%), ma peggiore rispetto a quelli affetti da HCC, entro i Criteri di Milano (70-81%).

Sapisochin et al [85], in un recente studio multicentrico spagnolo, riportano i dati relativi al trapianto di fegato in 42 pazienti con ICC o CHC su cirrosi, rispettivamente 27 e 15 pazienti, confrontati con un gruppo di controllo di HCC. La sopravvivenza globale dei pazienti con ICC/CHC insieme risulta essere significativamente più bassa rispetto ai controlli HCC (40.5% vs 14.3%, rispettivamente). Considerando però solo il gruppo CHC, non risulta una differenza significativa nel tasso di sopravvivenza verso il gruppo HCC (78% vs 86% a 5 anni, rispettivamente). Inoltre raggruppando i pazienti in base a dimensioni e numero di noduli, risulta che sopravvivenza e tasso di recidiva era simile tra gruppo di studio e gruppo di controllo nei pazienti con singolo nodulo ≤ 2 cm, mentre la prognosi era decisamente peggiore nei pazienti con ICC/CHC più avanzati, verso rispettivi controlli HCC, a confermare quanto una migliore stratificazione dei pazienti pre-operatoria possa significativamente incidere sulla prognosi. Gli autori sottolineano comunque la difficoltà di una corretta e precoce diagnosi differenziale pre-operatoria tra ICC/CHC e HCC.

Wang et al. [12] analizzano un grande database di 380 pazienti affetti da CHC; dei 79 pazienti che avevano ricevuto una terapia curativa, 20 erano stati sottoposti a trapianto di fegato, con una sopravvivenza a 36 mesi intorno al 50% e cioè pari, se non migliore, a quella della resezione chirurgica radicale (**Fig. 1.1-c**)

1.8.3 - Altri trattamenti

I trattamenti adiuvanti post-resezione migliorano la prognosi, ma in misura minore che in HCC e CC. [101]

1.8.3.1 - Terapie ablative loco-regionali

Le terapie ablative loco-regionali sono considerate l'opzione migliore per i pazienti affetti da HCC in stadi non avanzati che non possano essere trattati con la chirurgia o come tecniche ponte nei pazienti in attesa di

trapianto di fegato. La distruzione delle cellule tumorali può essere ottenuta mediante iniezione di sostanze chimiche (es. alcol etilico o acetico) o sfruttando forti cambiamenti di temperatura (tramite radiofrequenza, microonde, laser, crioterapia). Attualmente la tecnica preferita è la radiofrequenza (che è ritenuta una metodica potenzialmente curativa). Il controllo dell'efficacia della radiofrequenza viene effettuato tramite CT con mezzo di contrasto a un mese dal trattamento, che valuta l'avvenuta necrosi come assenza totale di captazione del mezzo di contrasto. [17, 112] In generale ablazione a radiofrequenza ed alcolizzazione sono parimenti efficaci (>90% necrosi) in noduli più piccoli di 2cm, mentre in tumori più grandi l'efficacia e la prevedibilità della radiofrequenza sono superiori. [113] Cucchetti et al. [69] hanno postulato che la radiofrequenza possa essere non semplicemente alternativa, ma preferibile alla resezione nei casi di piccoli HCC che presentino un accesso chirurgico difficoltoso. Lo studio di Yin et al. [10] è, per quanto a nostra conoscenza, l'unico che abbia preso in esame l'efficacia di queste tecniche nella terapia del CHC. Tre pazienti hanno ricevuto un trattamento primario con radiofrequenza, con una sopravvivenza mediana di 10 mesi, peggiore quindi rispetto alla resezione primaria (mediana= 16,5 mesi), ma migliore di tutte le altre opzioni terapeutiche. Sette dei 67 pazienti trattati per recidiva dopo resezione sono stati trattati con radiofrequenza o iniezioni di etanolo con una sopravvivenza mediana di 20 mesi, inferiore alla resezione secondaria (39,5 mesi), ma ancora superiore alle altre tecniche.

1.8.3.2 – Chemioembolizzazione transarteriosa

La chemioembolizzazione transarteriosa (*transarterial chemoembolization: TACE*) è una tecnica terapeutica che sfrutta la spiccata neoangiogenesi arteriosa e la perdita di vascolarizzazione portale che contraddistinguono l'HCC. La procedura comincia con la cateterizzazione selettiva sotto guida angiografica dei rami arteriosi a monte della lesione. Successivamente si procede all'iniezione di una sospensione di agente chemioterapico (di solito adriamicina o cisplatino) in un mezzo di contrasto oleoso (di solito

Lipiodol) che ha la funzione di trattenere più a lungo il materiale infuso nel nodulo e di permetterne la visualizzazione tramite imaging. Infine si procede, tramite vari materiali, all'embolizzazione del ramo arterioso provocando così necrosi del tessuto tumorale con un alto tasso di successo. [17] La TACE ha mostrato un miglioramento della prognosi nei pazienti con HCC in cui né una resezione chirurgica, né metodiche percutanee siano attuabili (stadio B, intermedio, del BCLC), ma non è considerata una terapia curativa. Controindicazioni sono la diminuzione del flusso portale (per trombosi della porta, shunt porto-sistemici o flusso epatofugo) e la presenza di localizzazioni tumorali extraepatiche. [10, 17, 114, 115] L'efficacia di questa tecnica nell'epatocolangiocarcinoma rimane tuttora poco chiara ed diversi autori sostengono che sia limitata dal fatto che molti CHC, similmente ai CC, hanno una minore vascolarizzazione rispetto agli HCC. [10, 16, 39, 116] Yin et al. [10] hanno rilevato una sopravvivenza mediana di soli 6 mesi nei pazienti con tumori non resecabili sottoposti primariamente a TACE. A fronte di ciò, 30 pazienti con recidive post-resezione in malattia di stadio avanzato trattate secondariamente con TACE hanno mostrato una sopravvivenza mediana di 17 mesi. In base a ciò, gli autori ritengono la metodica indicata per migliorare la prognosi nei pazienti con recidive non operabili.

Kim et al. [116] hanno compiuto uno studio mirato sull'efficacia della TACE in 50 pazienti con CHC non resecabile. Viene riportato un tasso di risposta nel 70% dei casi. Il principale fattore limitante la risposta alla terapia è stato la vascolarizzazione del tumore (rilevabile all'imaging con mezzo di contrasto): CHC ben vascolarizzati hanno risposto in un 85% dei casi a fronte di solo il 10% di casi fra i tumori scarsamente vascolari. Gli autori hanno quindi confermato l'inadeguatezza della metodica in questo sottogruppo e tuttavia segnalano alcuni studi in cui la radioembolizzazione con Itrio-90 ha prodotto buoni risultati in altri tumori ipovascolari (alcuni HCC [117] e alcune metastasi da carcinoma coloretale [118]) e ipotizzano che questa metodica possa essere utile anche nel caso del CHC. Il tasso di sopravvivenza globale per i pazienti trattati nello studio di Kim et al. a 1,

2, 3 e 4 anni è stato rispettivamente del 52%, 38%, 16% e 12%.

1.8.3.3 - Terapie sistemiche

Vari schemi di trattamento con chemioterapia in pazienti con carcinomi biliari non resecabili sono stati riportati, ma non sono ancora stati condotti studi sull'efficacia di terapie adiuvanti in pazienti con CHC dopo la chirurgia. Data l'alta incidenza di recidive dopo chirurgia in questo tumore, queste terapie sono necessarie per migliorare la prognosi e ricerche future sono auspicabili. [68]

1.9 Prognosi

1.9.1 - Sopravvivenza

Il CHC è un tumore molto aggressivo. In generale, la prognosi è stata riportata essere peggiore di quella dell'HCC; in alcuni casi essa era, con differenze statisticamente più o meno significative, intermedia fra HCC e CC [6, 8, 10, 39, 49, 109], in altri peggiore di entrambi. [7, 9, 67, 85, 101, 119] I dati sulla sopravvivenza di questo tumore dei vari studi pubblicati appaiono piuttosto eterogenei tra di loro, ma si attestano tutti su valori piuttosto sfavorevoli. Se ne segnalano alcuni:

Chantajir et al. [4]: mediana 9 mesi;

Yu et al. [62]: mediana 7,9 mesi;

Yano et al. [67]: mediana 22, sopravvivenza a 3, 5, e 10 anni 34.6%, 23.1% e 11.5%;

Jarnagin et al. [6]: mediana 32 mesi;

Yin et al. [10]: mediana 13 mesi; sopravvivenza a 1, 3 e 5 anni 67,7%, 38,6%, 34,0%;

Chok et al. [5]: mediana 25,2 mesi.

Wang et al. [12], come precedentemente menzionato, hanno fornito analisi statistiche condotte sul database più vasto ad oggi presentato in letteratura sul CHC (380 pazienti residenti in varie zone degli Stati Uniti fra il 1973 e 2004); per questa ragione scegliamo di dare particolare rilevanza ai loro risultati. La sopravvivenza globale patologia-specifica era pari al

26.5%, 12.4% e 9.2% rispettivamente a 1, 3 e 5 anni dalla diagnosi. Il fattore più importante nel determinare la prognosi era l'utilizzo o meno di metodiche potenzialmente curative (resezione, trapianto o altra chirurgia). Determinante era anche lo stadio di presentazione della malattia, con sopravvivenze a 1, 3 e 5 anni rispettivamente di 56.3%, 29.0% e 22.1% per lo stadio localizzato, 25.3%, 9.6% e 4.8% per lo stadio di coinvolgimento regionale e di 6.1%, 1.5% e 0% per lo stadio metastatico. Gli autori hanno anche evidenziato un miglioramento globale della prognosi di questo tumore nel corso del tempo dagli anni '70 agli anni 2000, ad indicare i progressi compiuti dalla medicina in questo campo.

1.9.2 - Fattori prognostici:

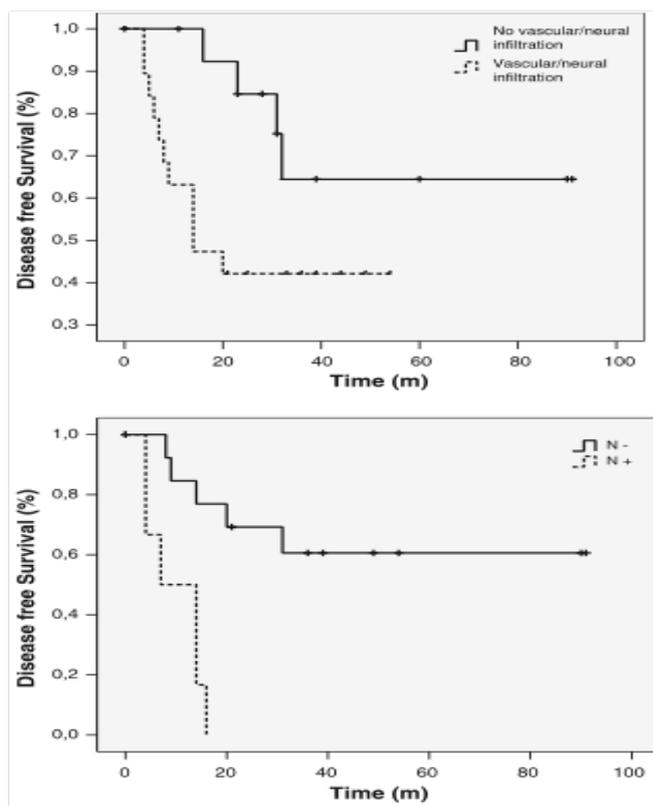
Fra i fattori prognostici negativi più frequentemente riportati figurano:

a) Caratteristiche biologiche del tumore alla diagnosi:

- invasione perineurale;
- invasione vascolare;
- dimensioni del nodulo;
- lesioni satellite intorno al tumore (la probabilità e l'estensione delle quali dipendono dai punti precedenti);
- molteplicità dei noduli;
- metastasi linfonodali;
- metastasi extraepatiche;

Questi fattori sono stati riportati indipendentemente, oltre che globalmente, all'interno del concetto di stadio TNM, il quale è considerato il fattore prognostico più importante. [10, 16] L'invasività vascolare e quella linfonodale, in particolare sono state indicate come decisive per prevedere l'efficacia della resezione chirurgica. [104]

Figura 1.2 – Sopravvivenza libera da malattia in mesi in pazienti con e senza infiltrazione vascolare e/o neuronale (grafico in alto) e in pazienti con e senza metastasi linfonodali (grafico in basso).[Portolani, N., et al., *Intrahepatic cholangiocarcinoma and combined hepatocellular-*



Come già accennato precedentemente, molti autori suggeriscono come la prevalenza della componente colangiocitaria nel nodulo di tumore combinato sia la principale determinante dell'aggressività e della prognosi del CHC. [6, 102] Altri fattori prognostici rilevanti sono il grado di differenziazione [10] e la presenza di dilatazione dei dotti biliari intraepatici. (18)

b) Caratteristiche cliniche:

Alti livelli di CA 19-9 8 (specialmente >80 U/mL) e dilatazione dei dotti biliari intraepatici sembrano essere fattori prognostici negativi indipendenti. [4]

c) Trattamento:

La resezione epatica radicale, come si è detto, è un forte fattore indipendente di prognosi, anche dopo stratificazione dei pazienti per presenza di cirrosi e funzionalità epatica residua (score Child-Pugh). Anche la ripetizione della resezione in seguito a recidiva appare migliore in

termini di prognosi rispetto alle altre tecniche. Ne consegue che tutti i casi di CHC dovrebbero essere trattati, ove possibile, chirurgicamente. Yin et al. [10] riportano sopravvivenze a 1, 3 e 5 anni dopo la resezione del 73.9%, 41.4% e 36,4% nei pazienti con HCC.

1.9.3 – Il problema delle recidive

Il tasso di ricorrenza post-chirurgia del CHC è estremamente alto; in letteratura questo dato arriva al 98,2% a 3 anni dall'intervento. [10]

I principali fattori determinanti la sopravvivenza libera da malattia e globale, come si è detto, sono le dimensioni del tumore e la presenza d'invasività locale (vascolare e perineurale) e regionale linfonodale. Questo comportamento è simile a quello mostrato dal CC. [6, 104]

La mancanza di studi adeguati e d'indicazioni precise per il CHC sui trattamenti utili per affrontare le recidive è un problema cruciale. Alcuni autori sostengono che al CHC, tumore dotato di proprie peculiarità anche all'interno delle neoplasie primitive del fegato, debbano essere attribuiti dei protocolli specifici sulla base delle esperienze maturate al riguardo e che sugli schemi di trattamento debbano essere condotti degli studi statistici mirati. Alcune opzioni terapeutiche più aggressive, come la chemioterapia adiuvante dopo resezione e un trattamento multimodale per le recidive dovrebbero essere prese in considerazione e studiate per migliorare la prognosi dei pazienti affetti da questa neoplasia. [65] Un follow-up molto stretto dopo l'intervento è imprescindibile visto l'alto tasso di recidiva. [16, 39, 104]

2 - STUDIO SPERIMENTALE

2.1 - OBIETTIVI - INTRODUZIONE

Il carcinoma combinato epato-colangiocellulare (CHC) è una rara neoplasia primitiva del fegato che può insorgere su fegato sano o su fegato cirrotico. La presenza negli studi fatti fino ad ora di CHC insorti sia su pazienti cirrotici e non, e la rarità del CHC, rendono difficile interpretare l'eterogeneità dei risultati forniti dagli studi finora condotti su questa neoplasia. In particolare nessun gruppo di studio si è occupato nello specifico dei pazienti con CHC insorto su cirrosi epatica; essi infatti rappresentano una sotto-popolazione con caratteristiche cliniche, prognostiche e diagnostico-terapeutiche specifiche, come noto nel caso dell'epatocarcinoma (HCC) su cirrosi.

Obiettivo del lavoro è di indagare gli aspetti diagnostici e le caratteristiche clinico-demografiche del CHC insorto su cirrosi.

Nella prima parte del lavoro (FASE 1), di diagnostica per immagini, è stato valutato il ruolo delle tre metodiche contrastografiche CEUS, TC, e RM nella diagnosi e caratterizzazione dei tumori misti CHC su cirrosi, allo scopo di valutare quale ruolo attribuire alle diverse tecniche radiologiche nella diagnosi differenziale non invasiva dei noduli di CHC da HCC insorti su fegato cirrotico. In particolare nessuno studio sino ad ora ha valutato il ruolo dell'ecografia con mdc in questa sottopopolazione di tumori epatici. Segnaliamo come l'ecografia con mdc sia stata di recente esclusa dalle linee guida americane per la diagnosi non invasiva di HCC su cirrosi sulla scia di recenti studi dimostranti il rischio di falsi positivi per HCC alla CEUS in caso di tumori colangiocellulari su cirrosi. Al contempo la metodica CEUS è stata confrontata con le altre tecniche d'imaging dinamico (TC e RM con mdc), ove disponibili, nella diagnostica del CHC su cirrosi.

Nella seconda parte del lavoro (FASE 2) sono stati analizzati gli aspetti demografici, clinico-laboratoristici, e gli aspetti prognostici dei pazienti con CHC diagnosticati istologicamente su cirrosi e confrontati tramite match 1:2 con una casistica di HCC su cirrosi.

2.2 - MATERIALI E METODI

Tramite il registro degli esami anatomo-patologici sono stati retrospettivamente individuati tutti i pazienti con CHC insorto su cirrosi afferenti a due centri di riferimento per lo studio dei tumori epatici del Nord Italia (Bologna, Ospedale Universitario S. Orsola-Malpighi e Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Maggiore Hospital) tra il 2003 e il 2013, dei quali fosse disponibile il referto e/o una registrazione digitale di almeno una tecnica di imaging dinamico con mezzo di contrasto (CEUS, TC o RM). La raccolta dei dati è stata prevalentemente retrospettiva, con alcuni casi (gli ultimi) raccolti in senso prospettico poiché giunti al centro di riferimento mentre era in corso la raccolta dei dati.

I criteri d'inclusione sono stati:

1. diagnosi di tumore combinato HCC-CC (entrambe le componenti visibili) confermata da un esame anatomo-patologico condotto su campione biotico e/o chirurgico;
2. noduli insorti su cirrosi o su epatopatia cronica con fibrosi significativa, di qualsiasi origine; si tratta di pazienti ad elevato rischio di sviluppare HCC rispetto alla popolazione sana secondo le linee guida sulla sorveglianza per HCC . [17]

Lo studio dei dati si è incentrato in particolare su due punti: (1) gli aspetti di diagnostica per immagine alle metodiche di imaging dinamico dei tumori combinati su cirrosi del nostro campione (FASE 1), (2) lo studio della sopravvivenza e degli eventuali fattori prognostici significativi nel gruppo di studio di CHC su cirrosi posti a confronto con un gruppo di controllo di HCC su cirrosi (FASE 2).

2.2.1 – Aspetti di diagnostica per immagini (FASE 1)

È stata effettuata un'analisi del comportamento contrastografico dei noduli di CHC alle 3 metodiche di imaging dinamico (CEUS, TC e RM con mezzo di contrasto), con particolare attenzione alla diagnosi differenziale da noduli di HCC su cirrosi. Sono state quindi esaminate e confrontate le fasi arteriosa, portale e venosa/tardiva (nel caso della RM anche la fase epatospecifica, quando disponibile) nelle diverse metodiche per valutare in quanti noduli di CHC risultasse un aspetto tipico per HCC, quindi in quanti noduli il tumore misto venisse considerato erroneamente un epatocarcinoma, e quali fossero i pattern contrastografici più comuni del CHC. È stato considerato pattern tipico di HCC alle tecniche di imaging, secondo linee guida [74-76], la presenza di *contrast enhancement* (CE) arterioso globale o eterogeneo (escludendo il pattern di rim-like), che interessasse l'intero nodulo o la sua larga maggioranza (oltre 70%), indipendentemente dalla sua intensità, associata a successivo wash-out in fase porto tardiva, indipendentemente dalla sua intensità. Il pattern di "rim-like", ovvero di iper-enhancement periferico o "a cercine", è stato considerato come pattern atipico per HCC, indipendentemente dalla successiva presenza di wash out, poiché descritto come pattern altamente suggestivo per forme colangiocellulari. [80, 81]

Non disponendo il CHC di un pattern contrastografico riconosciuto come patognomonico, ed essendo l'HCC l'unico tumore epatico per il quale sia accettata la possibilità di una diagnosi non invasiva basata sulle sole tecniche di imaging, le tre metodiche sono state valutate in termini di capacità nel riconoscere i noduli come **(a)** non tipici per HCC e **(b)** maligni. Particolare attenzione è stata rivolta all'aspetto CEUS e all'utilità di tale metodica nello studio di queste neoplasie del fegato, sia da sola, sia come complementare alla TC/RM.

- angioecografia perfusionale (CEUS): è stato dapprima valutato l'aspetto del nodulo in ecografia basale (b-mode) poi è stato analizzato il comportamento contrastografico dopo iniezione di

m.d.c. dedicato endovenoso (Sonovue©, Bracco, Milano) nelle 3 fasi (arteriosa: 10-30 secondi dopo l'iniezione; portale: 30-120 sec.; tardiva: oltre 120 sec.).

- TC con m.d.c.: è stato valutato il comportamento vascolare dei noduli dopo somministrazione di m.d.c. iodato, con analisi distinta per le 3 fasi (arteriosa, portale, tardiva).
- RM con m.d.c.: sono state valutate le sequenze pesate T1 e T2 (quando disponibili) e, dopo iniezione di m.d.c. (Gadolinio ± Primovist), le fasi vascolari arteriosa e tardiva. Nel caso di utilizzo di mezzo di contrasto Primovist è stata valutata anche la fase epatospecifica.

Le CEUS, TC, RM sono state valutate nella maggior parte dei casi nei 2 centri a cui fa riferimento questo studio; le immagini (TC, RM) e le registrazioni (CEUS) sono state riviste, ove possibile, da un radiologo e da un ecografista esperti in imaging del fegato. Qualora ciò non fosse stato possibile per mancanza di tali dati (TC o RM eseguite in altre sedi, mancanza di registrazioni digitali) è stata valutata la descrizione fatta nel referto.

Il comportamento contrastografico nelle fasi vascolari è stato definito in base al grado di enhancement del nodulo rispetto al restante parenchima epatico, come segue:

- iper-enhancement omogeneo: l'intero tumore (oltre il 70% dell'area di sezione) mostra una captazione globale ed omogenea di m.d.c.
- iper-enhancement eterogeneo: la lesione presenta aree irregolari con diversi gradi di enhancement;
- enhancement ad anello (rim-like): enhancement solo periferico, non eccedente il 25% dell'area di sezione lesione;

- isoenhancement: il nodulo ed il restante parenchima mostrano un simile grado di enhancement;
- ipoenhancement: il nodulo mostra un minore livello di enhancement rispetto al parenchima.

Il “wash-out” è stato definito come un ipoenhancement della lesione in fase portale/tardiva, preceduto da iper- o isoenhancement in fase arteriosa.

2.2.2 – Caratteristiche cliniche e analisi della sopravvivenza (FASE 2)

È stato condotto uno studio retrospettivo con match 1:2. Il gruppo di studio era composto dai pazienti con CHC su cirrosi, già oggetto di analisi nella FASE 1. I dati clinico-demografici sono stati raccolti dalle cartelle cliniche informatizzate disponibili presso i due centri Bologna e Milano. I dati mancanti relativi al follow-up e/o sopravvivenza sono stati raccolti, quando possibile, tramite contatti con le anagrafi comunali e/o i medici curanti.

Il gruppo di controllo era composto da pazienti con HCC su cirrosi diagnosticati istopatologicamente o tramite metodiche non invasive (criteri radiologici), secondo linee guida [78]. Il match è stato effettuato utilizzando dati di epatocarcinomi provenienti dal database ITA.LI.CA, che raccoglie i dati di oltre 5130 HCC trattati in 18 Centri di riferimento italiani e che viene costantemente aggiornato dai rispettivi centri. Criteri di inclusione erano la presenza di HCC su cirrosi o epatopatia con fibrosi significativa e la disponibilità di dati riguardanti trattamento e sopravvivenza. Il match tra pazienti del gruppo di studio e gruppo di controllo è stato eseguito per eziologia di cirrosi ove possibile, numero di noduli (monofocale vs bifocale vs multinodulare), dimensioni del nodulo maggiore (<2 cm, 2-3 cm, 3-5 cm, > 5 cm), sesso, range di età (per decenni) e stadio clinico BCLC alla diagnosi (0, A, B, C) [17].

I dati raccolti in questa fase si riferiscono al momento del primo riscontro del nodulo e gli esami di laboratorio presi in esame erano i più vicini e precedenti alla diagnosi invasiva. E' stato valutato il tipo di trattamento in

particolare con attenzione all'intento (tecnica considerata curativa vs non curativa) del primo provvedimento terapeutico intrapreso per ogni paziente sia nel gruppo HCC che CHC. Sono state considerate terapie radicali, secondo l'ultimo algoritmo terapeutico per epatocarcinoma (HCC) del gruppo BCLC di Barcellona [17], la resezione chirurgica, il trapianto ortotopico di fegato (OLT), la termoablazione mediante radiofrequenza (RFA) e l'alcolizzazione percutanea (PEI); terapie non curative sono state considerate la chirurgia con finalità palliative, la chemioembolizzazione transarteriosa (TACE), la radioterapia palliativa, la chemioterapia sistemica e la terapia di supporto.

Analisi Statistica.

I dati sono stati espressi secondo mediana e range quando veniva identificata una distribuzione non parametrica dei dati. I gruppi studio vs controllo sono stati confrontati per caratteristiche demografiche e cliniche.

I tassi di sopravvivenza sono stati calcolati secondo il metodo Kaplan-Meier ed è stata ricercata una correlazione statistica tra tutti i fattori di cui sopra, presi in considerazione singolarmente all'analisi univariata e successivamente multivariata.

Il follow-up dei pazienti del gruppo di studio CHC è stato condotto fino a 31-12-2013. Il termine del follow-up del gruppo di controllo di HCC è stato considerato al 31-12-2012, data dell'ultimo aggiornamento ufficiale del database ITA.LI.CA disponibile on-line.

2.3 - RISULTATI

Le analisi sull'imaging del CHC sono state eseguite su 35 pazienti nei quali era disponibili il materiale radiologico.

Nella FASE 1 il campione analizzato era così costituito: 19 pazienti per un totale di 20 noduli (includenti due recidive) provenienti dal centro di Bologna, e 16 pazienti dal centro di Milano. Il database congiunto così ottenuto contava 35 pazienti e 37 noduli in totale.

20 pazienti avevano un singolo nodulo epatico, 15 pazienti avevano tumori multifocali (≥ 2), di cui 6 bifocali, e 9 con \geq tre noduli. E' stato valutato un

singolo nodulo per paziente, anche nei casi di multifocalità, poichè veniva valutato il comportamento all'imaging del nodulo poi soggetto a campionamento istologico (biopsia o resezione). La diagnosi anatomicopatologica di CHC è stata raggiunta in un 54% (20/37) dei casi tramite biopsia ecoguidata e nell'altro 46% (17/37) tramite analisi sul pezzo chirurgico durante resezione o trapianto epatico.

Tra i 15 pazienti con tumori multifocali, 7 sono stati trattati con chirurgia resettiva e in tre di loro si è avuto il riscontro di presenza sincrona di noduli di HCC e CHC nello stesso fegato. Sei pazienti hanno avuto una recidiva nel corso del follow-up dopo il primo CHC trattato (4 casi con radiofrequenza e 2 con resezione). In due di loro la biopsia ripetuta confermava una ulteriore diagnosi di CHC e sono pertanto stati inclusi nello studio (come 2 recidive). In quattro di loro la diagnosi si è basata sull'imaging, dimostrante un pattern tipico per HCC in due casi, ed atipico per HCC nei due restanti. Queste quattro recidive non sono pertanto state incluse nello studio.

Nella FASE 2, le analisi sulla sopravvivenza sono state condotte su 36 pazienti totali con nodulo di CHC, escludendo le due recidive, ed includendo un paziente con CHC non considerato nella FASE 1 per mancanza di affidabili dati imaging precedenti. Il gruppo di controllo, HCC, era composto da 72 pazienti, secondo il match 1:2.

2.3.1 – Aspetti di diagnostica per immagini (FASE 1)

Le casistiche dei centri di Bologna e Milano sono state analizzate congiunte. La casistica globale considerata nell'analisi imaging consisteva in 35 pazienti e 37 noduli. La mediana globale delle dimensioni era pari a 25 mm (range: 10-100), mentre la media era 34,58 mm ($\sigma= 24,00$). Per le caratteristiche clinico-demografiche vedi **Tavola 2.1**.

Table 2.1 – Characteristics and clinical data of patients with CHC nodules

Patients, No.	35		
Age, yr.*	62 (40-77)		
Male, No. (%)	28 (80)		
Etiology, No. (%)			
HCV	14 (40.0%)		
Alcohol	7 (20.0%)		
HBV	5 (14.2%)		
NASH/Cryptogenic	4 (11.4%)		
HCV+Alcohol	2 (5.7%)		
HCV+HBV	3 (8.6%)		
Laboratory* (normal values)	Available in No.		No. Values out of normal range (%)
CA 19-9 U/mL (<37)	14	41.5 (1-4920)	8/14 (57%)
AFP ng/mL (<7)	34	10.35 (2-250)	21/34 (62%)
CEA ng/mL (<6)	10	2.75 (0.6-7.9)	2/10 (20%)
PLT 10 ³ /microL (normal <140000)	37	134 (33-318)	22/37 (59%)
AST U/L (<38)	37	47.5 (11-268)	23/37 (62%)
ALT U/L (<31)	37	37 (7-217)	16/37 (43%)
gGT U/L (<61)	35	80 (12-408)	23/35 (66%)
Phosphatase Alc. U/L (<280)	36	166.5 (51-754)	6/36 (17%)
Creatinine mg/dL (<1.2)	37	0.85 (0.5-8.9)	1/37 (3%)
INR (1-1.15)	37	1.1 (0.97-1.61)	15/37 (40%)
Total Bilirubin mg/dL (<1.10)	37	0.7 (0.4-27.7)	10/37 (27%)
Albumine g/dL (3.5-4.5)	37	4.1 (2.2-4.9)	7/37 (19%)
MELD score*	8 (7-23)		
Nodule size, mm*	25 (10-100)		
Within Milan Criteria, Pts No.(%)	21 (60%)		
Macrovascular/extrahepatic spread	7 (20%)		

*Median (range)

Per ogni nodulo era disponibile almeno una tecnica di immagini con mdc. CEUS, TC e RM sono state eseguite in 27, 34 e 17 noduli rispettivamente.

TABELLA 2.2 - METODICHE IMAGING DISPONIBILI PER NODULO

Pazienti			Esami disponibili		
Casistica	N^ Paziente	N^ Nodulo	CEUS	TC	RM
Bologna	1	1	0	solo FA	0
	2	2	0	x	0
	2 (recidiva)	3	x	x(NV)	0
	3	4	x	solo FA e FT	0
	4	5	x	x	x
	5	6	x	x	0
	6	7	0	x	0
	7	8	x	solo FA	0
	8	9	x	x	0
	9	10	x	x	0
	10	11	x	x	0
	11	12	x	x	0
	12	13	x	solo FA	solo FA
	13	14	x	solo FA	0
	14	15	x	x	x
	15	16	x	solo FA e FT	x
	15 (recidiva)	17	x	x	0
	16	18	solo FA	x(NV)	0
	17	19	x	0	solo FA
18	20	x	solo FA e FT	0	
19	21	x	x	0	
Milano	19	21	0	x	x
	20	22	x	x	x
	21	23	x	x	0
	22	24	x	x	x
	23	25	x	x	x
	24	26	x	x	x
	25	27	x	x	x
	26	28	0	x	0
	27	29	0	x	0
	28	30	x	x	x
	29	31	0	x	0
	30	32	x	x	x

	31	33	x	x	x
	32	34	0	x	x
	33	35	x(NV)	x	x
	34	36	0	x	x
Totale BO	19	21	18	18	5
Totale MI	16	16	9	16	12
Totale	35	37	27	34	17

Le tecniche disponibili per ciascun paziente, ai fini di questo studio, sono riassunte nella **Tabella 2.2**.

Le casistiche dei due centri erano diverse in termini di dimensione dei noduli: appurato che la distribuzione delle misure delle dimensioni era normale al test di Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,07$) si è proceduto a confrontare le due medie per mezzo del test t di Student per campioni indipendenti, con il riscontro di una differenza statisticamente rilevante ($p = 0,003$). Alla luce di ciò, essendo noto come il comportamento radiologico dei tumori epatici dipenda in parte dalle dimensioni degli stessi, si è deciso di proseguire l'analisi dell'aspetto imagig, stratificando i dati in base al diametro e non per casistica. Le linee guida AASLD sull'imaging dell'HCC individuano come "small" una lesione al di sotto di 20 mm, comunque il range 10-30mm è utilizzato molto comunemente dagli studi disponibili in letteratura che si sono concentrati sui piccoli noduli del fegato. Tale valore è molto usato anche indicatore prognostico di *recurrence* e *survival outcome*, ad esempio dopo terapie ablative locali di HCC. La casistica così aggregata per dimensioni comprendeva 22/37 noduli (64%) "piccoli", ovvero pari o inferiori a 3 cm di diametro e 13/37 (36%) erano pari o inferiore a 2 cm.

La **Tabella 2.3** riporta i pattern vascolari di ciascun nodulo per ciascuna fase vascolare, raggruppati per dimensioni crescenti.

Table 2.3 – Aspetto a ciascuna fase contrastografica per ciascuna tecnica (CEUS, TC, RM) dei noduli di CHC. Il cut-off di 30 mm è indicato dalla linea orizzontale spessa, il cut-off di 20 e 25 mm (mediana) dalla linea sottile. Le diciture in tabella si riferiscono all'aspetto del nodulo rispetto al parenchima epatico. Globalmente iperocogeno/denso/intenso: Homog-hyper. Contrast-enhancement periferico: Periph-hyper. Contrast-enhancement eterogeneo: Heterog-hyper. Isoecogeno/denso/intenso: Iso. Ipoecogeno/denso/intenso: Hypo. Eventuali elementi aggiuntivi sono indicati tra parentesi. *Reverse target pattern: aspetto RM-contrastografico di ipoenhancement centrale ed iperenhancement periferico arterioso che si inverte in fase tardiva con iperintensità centrale, considerato da recenti studi altamente suggestivo di forma colangiocitaria o mista (vedi testo).

Table 2.3 - Contrast enhanced appearance of CHC nodules at each imaging technique

Nodule Number	Size (mm)	Arterial phase			Portal phase		Venous/Delayed phase			Hepatobiliary phase
		CEUS	CT	MRI	CEUS	CT	CEUS	CT	MRI	MRI
1	10	Homog-hyper	Homog-hyper	na	Hypo	Periph-hyper	Hypo	Iso	na	na
2	10	Iso	Iso	Iso	Iso	Iso	Iso	Hypo	Iso	Homog-hyper
3	11	na	Periph-hyper	Periph-hyper	na	Periph-hyper	na	Periph-hyper	Periph-hyper	Hypo
4	13	na	Periph-hyper	na	na	Periph-hyper	na	Periph-hyper	na	na
5	13	Homog-hyper	Homog-hyper	Homog-hyper	Hypo	Hypo	Iso	Hypo	Hypo	Hypo
6	16	Hypo	Iso	Periph-hyper	Hypo	Hypo	Hypo	Hypo	Iso	Hypo
7	16	Homog-hyper	Homog-hyper	na	Hypo	Hypo	Hypo	Hypo	na	na
8	17	Hypo	Heterog-hyper	Iso	Hypo	Hypo	Hypo	Hypo	Iso	Hypo
9	18	Homog-hyper	Homog-hyper	na	Hypo	Periph-hyper	Hypo	Periph-hyper	na	na
10	19	na	Periph-hyper	Homog-hyper	na	Periph-hyper	na	Periph-hyper	Hypo	Iso
11	19	Hypo	Homog-hyper	na	Hypo	Iso	Hypo	Iso	na	na
12	20	Homog-hyper	na	na	Hypo	na	Hypo	na	na	na
13	20	Homog-hyper	Periph-hyper	Homog-hyper	Hypo	Periph-hyper	Hypo	Iso	Hypo	Hypo
14	20	Homog-hyper	Homog-hyper	Homog-hyper	Hypo	Iso	Hypo	Hypo	Homog-hyper	Homog-hyper
15	20	na	Homog-hyper	Homog-hyper	na	Iso	na	Iso	Iso	Hypo
16	23	Periph-hyper	Periph-hyper	na	Periph-hyper	na	Hypo	Iso	na	na
17	23	Periph-hyper	Iso	Periph-hyper	Hypo	Periph-hyper	Hypo	Periph-hyper	Homog-hyper	Hypo
18	24	Homog-hyper	na	na	na	na	iso	na	na	na
19	25	Hypo	Periph-hyper	na	Hypo	Periph-hyper	Hypo	Iso	na	na
20	25	na	Periph-hyper	na	na	Hypo	na	Hypo	na	na
21	27	Periph-hyper	Homog-hyper	Homog-hyper	Homog-hyper	Iso	Hypo	Iso	Iso	Hypo
22	29	Homog-hyper	Iso	Iso	Hypo	Heterog-hyper	Hypo	Iso	Hypo	Hypo
23	30	Homog-hyper	Periph-hyper	na	Hypo	Homog-hyper	Hypo	Homog-hyper	na	na
24	30	Homog-hyper	Heterog-hyper	Homog-hyper	Hypo	Heterog-hyper	Hypo	Heterog-hyper	Iso	Hypo
25	32	na	Periph-hyper	na	na	Periph-hyper	na	Iso	na	na
26	35	Homog-hyper	Heterog-hyper	na	Hypo	na	Hypo	Hypo	na	na
27	35	na	Heterog-hyper	Homog-hyper	na	Heterog-hyper	na	Heterog-hyper	Homog-hyper	Hypo
28	45	Periph-hyper	Periph-hyper	na	Hypo	Periph-hyper	Hypo	Iso	na	na
29	45	Homog-hyper	Heterog-hyper	Heterog-hyper	Hypo	na	Hypo	Heterog-hyper	na	na
30	50	na	Periph-hyper	na	na	na	na	iso	na	na
31	60	na	Periph-hyper	na	na	Periph-hyper	na	Periph-hyper	na	na
32	66	Homog-hyper	Periph-hyper	Periph-hyper	Hypo	na	Hypo	Iso	Reverse target*	Hypo
33	70	Periph-hyper	Periph-hyper	na	Hypo	na	Hypo	Periph-hyper	na	na
34	70	Periph-hyper	Periph-hyper	na	Hypo	Homog-hyper	Hypo	Iso	na	na
35	85	Homog-hyper	Periph-hyper	na	Iso	na	Hypo	Iso	na	na
36	90	Periph-hyper	na	Periph-hyper	Hypo	na	Hypo	na	Periph-hyper	na
37	100	na	Periph-hyper	na	na	Periph-hyper	na	Periph-hyper	na	na

1) US b-mode e CEUS

Aspetto in ecografia convenzionale (b-mode)

Tale dato era disponibile su 28 noduli, di cui 20 presentavano aspetto ipoecogeno, 7 eterogeneo, 1 iperecogeno.

CEUS

L'analisi è stata compiuta sulle 27 CEUS totali.

Fase arteriosa

La maggior parte dei noduli (22/27, ovvero l'81%) mostrava un enhancement in fase arteriosa; di questi, i due terzi captavano il m.d.c. uniformemente in tutto il nodulo e un terzo mostrava un aspetto "ad anello" (rim-like), con ipercaptazione periferica ed assenza di captazione al centro; nessuno mostrava un aspetto eterogeneamente iperecogeno.

In totale la CEUS mostrava un enhancement omogeneo (Fig. 2.1) o ad anello nel 55% e 26% dei noduli di CHC, rispettivamente. Dei restanti 5 noduli (19%), 4 apparivano ipoecogeni rispetto al restante parenchima, mentre 1 era isoecogeno.

Nessun nodulo inferiore o uguale a 2 cm di diametro mostrava enhancement ad anello periferico, mentre 7 su 16 (44%) noduli superiori ai 2 cm mostravano un pattern arterioso ad anello (Fig. 2.2).

Fasi venosa e portale/tardiva

In tale fase la maggior parte dei noduli CHC ha assunto un aspetto ipoecogeno (89%, 24/27). Un wash-out (inteso come iper- o isoecogenicità arteriose, indipendentemente dal tipo di enhancement arterioso, seguite da ipoecogenicità tardiva) si registrava in 21/27 casi (78%).

3 noduli su 27 mostravano un'isoecogenicità rispetto al parenchima in fase portale-tardiva (Tavola 2.4).

Ponendo come criteri per definire alla CEUS un nodulo come “maligno”, un’iperecogenicità (con qualunque carattere) arteriosa seguita da wash-out portale o tardivo (con qualunque carattere) [121, 122], si ottiene una prevalenza globale di 21 su 27 casi, pari al 78% del totale. Questa prevalenza, analizzata in base alle dimensioni del nodulo, era pari a 7 su 11 casi (64%) nei noduli piccoli (≤ 2 cm), e a 14/16 (88%) nei noduli superiori ai 2 cm. Risultava una differenza statisticamente significativa nel suggerire una natura di malignità del nodulo il cut-off di diametro pari a 2.5 cm. Infatti alla CEUS tutti i noduli superiori ai 2.5 cm (12/12, 100%) presentavano un pattern suggestivo di malignità, rispetto al 9/15 (60%) dei noduli ≤ 2.5 cm ($p=0.017$).

Ponendo invece l’attenzione verso i noduli con aspetto CEUS “tipico” per HCC, definito come enhancement arterioso globale (wash-in), seguito da wash-out (escludendo perciò i pattern di enhancement ad anello e di isoecogenicità in fase arteriosa), tale pattern si osserva in circa la metà dei casi, indipendentemente dalle dimensioni dei noduli (48%, 13/27, Tavola 2.5).

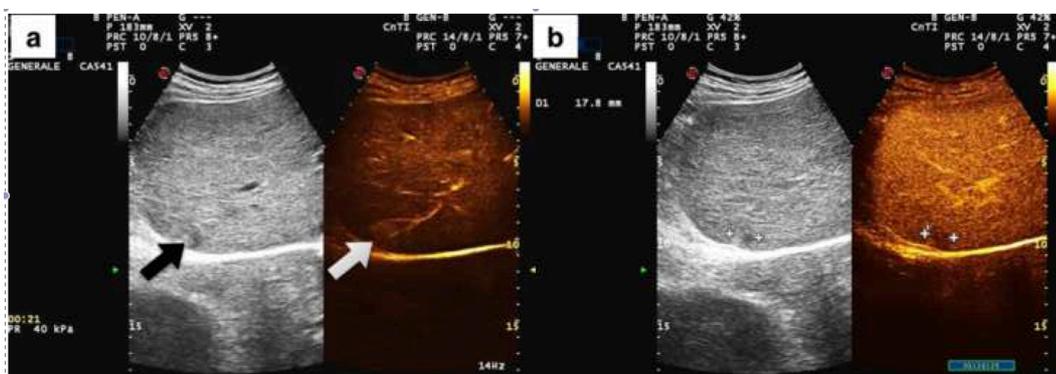


Figura 2.1 (CEUS) – Nodulo di 20 mm di diametro del lobo dx. Pannello A: immagine duale real time, a sinistra immagine basale b-mode e a destra CEUS. Nodulo subcapsulare tenuemente ipoecogeno all’ecografia b-mode (freccia nera), che mostra un omogeneo enhancement arterioso globale (a, freccia bianca), seguito da un wash-out portale di debole intensità (b, parte destra). Questo comportamento è considerato tipico per HCC.

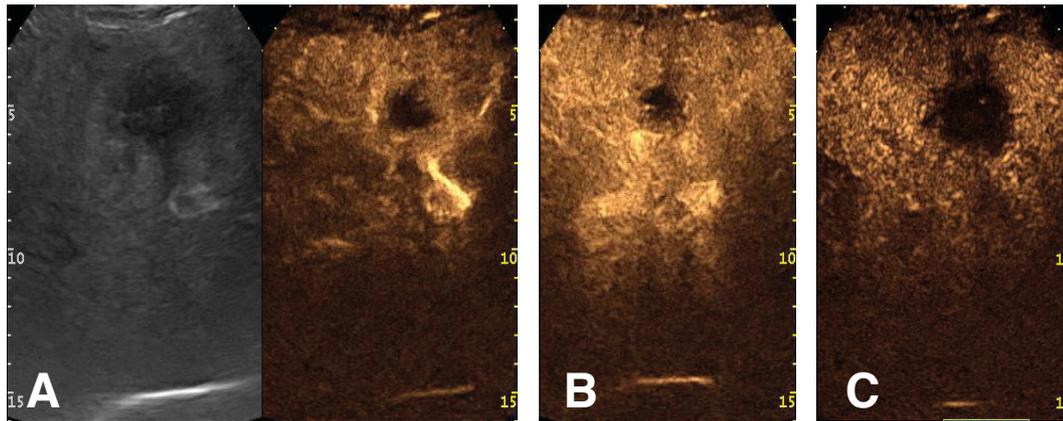


Figura 2.2 (CEUS) - Nodulo di 45 mm di diametro, ipoecogeno all'ecografia b-mode (A, parte sinistra), che mostra un enhancement arterioso ad anello (rim-like), che va incontro a un aspetto iso periferico in fase portale (B, 42'' dall'iniezione di m.d.c.) e appare francamente ipoecogeno in fase tardiva, con netto wash out del mdc (C). Questo comportamento potrebbe suggerire una neoplasia maligna di natura meno verosimilmente epatocitaria: vista l'insorgenza su cirrosi, più probabilmente colangiocitaria e meno probabilmente metastatica.

Tavola 2.4 – Analisi del pattern contrastografico alle tre tecniche

	Arterial phase			Venous/Delayed phase			Hepatobili phase
	CEUS	TC	RM	CEUS	TC	RM	RM
Homogeneously hyperenhanced, No. (%)	15 (55)	8 (23)	8 (47)	0	1 (3)	3 (18)	2 (13)
Peripherally rim-like hyperenhanced, No. (%)	7 (26)	17 (50)	5 (29)	0	8 (23)	2 (12)	0
Heterogeneously hyperenhanced, No. (%)	0	5 (15)	1 (6)	0	3 (9)	1 (5)	0
Isoenhanced, No. (%)	1 (4)	4 (12)	3 (18)	3 (11)	14 (41)	6 (35)	1 (7)
Hypoenhanced, No. (%)	4 (15)	0	0	24 (89)	8 (24)	5 (30)**	12 (80)
Total, No.	27	34	17	27	34	17	15*

*Hepatobiliary phase description lacking for two nodules on MRI imaging

** reverse target pattern (hypoenhancement in the center and hyperenhancement in the periphery) was included among hypoenhanced pattern in venous/delayed phase at MRI

Hepatobiliary phase appearance at MRI is reported in the table but not analyzed in the text as not part of western guidelines for the non invasive diagnosis of HCC in cirrhosis.

Tavola 2.5 Percentuali di noduli CHC identificati come maligni e falsamente suggestivi per HCC

	CEUS n. (%)	CT n. (%)	MRI n. (%)	p values
CHC nodules characterized as malignant	21/27 (78%)	7/34 (24%)	5/17 (29%)	*p < 0.001, **p=ns, ***p<0.001
CHC nodules at risk for misdiagnosis for HCC	13/27 (48%)	5/34 (15%)	3/17 (18%)	*p= 0.004, **p=0.002 , ***p=ns

* CEUS vs CT
 ** CEUS vs MRI
 *** CT versus MRI.

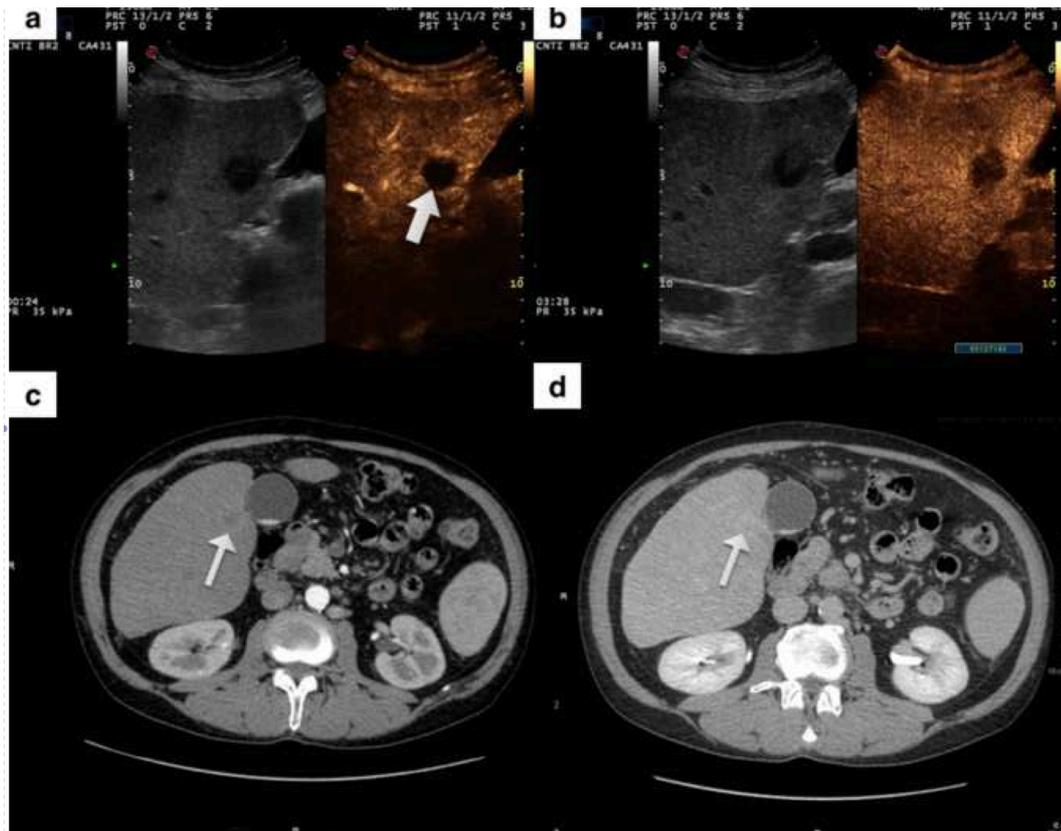


Figura 2.3 (CEUS/TC) - Nodulo ipoecogeno all'ecografia b-mode paracolecistico (a, parte sinistra), che mostra un enhancement arterioso ad anello (rim-like), che va incontro a un aspetto iso periferico in fase portale-tardiva (b). L'aspetto TC corrispondente è sovrapponibile a CEUS in fase arteriosa (c) (enhancement debole, ad anello), ma in fase tardiva mostra una progressiva omogeneizzazione con isodensità al parenchima circostante (d) suggestiva per forma colangiocitaria.

2) TC con m.d.c.

Fase arteriosa

La maggior parte dei noduli (30/34, ovvero l'88%) mostrava un enhancement in fase arteriosa; di questi, 17 (50% del totale) mostravano un aspetto "ad anello" (rim-like), 8 (23% del totale) captavano il m.d.c. in modo omogeneo uniformemente in tutto il nodulo e 5 (15% circa) mostravano un uptake eterogeneo. I restanti 4 noduli (12% del totale), apparivano isodensi rispetto al parenchima circostante, mentre nessuno appariva ipodenso in fase arteriosa.

Procedendo con l'analisi del pattern contrastografico per dimensioni, si osserva che solo il 29% (4/14) dei noduli CHC \leq 2 cm mostra un enhancement ad anello periferico, mentre un pattern contrastografico ad anello o eterogeneo risultava più frequente nei noduli di maggiori dimensioni (17/20, 85% nei noduli $>$ 2 cm). Nessun tumore mostrava aspetto ipovascolare arterioso alla TC cmdc.

Fase portale-tardiva

La fase post-arteriosa in TC dei noduli si è dimostrata differente dall'aspetto presentato in CEUS.

Alla TC la maggioranza dei noduli di CHC mostrava un aspetto generalmente iso o perdenso in fase porto-tardiva (Fig. 2.3, Tavola 2.4). In particolare 12/34 noduli mostravano una iperdensità in fase tardiva, rispettivamente con pattern di tipo omogeneo, periferico ed omogeneo nel 3% (1/34), 23% (8/34) e 9% (3/34) dei casi. In soli 8/34 (27%) casi (di cui uno solo tra i noduli $>$ 3 cm), la TC ha mostrato un aspetto di ipodensità in fase portale o tardiva.

La TC identificava un pattern suggestivo per malignità (inteso come qualsiasi iperenhancement o isoenhancement arterioso seguito da wash out tardivo del mdc) solo il 24% di noduli (7/34), percentuale nettamente inferiore a quella CEUS ($p < 0.0001$, Tavola 2.5). La sensibilità della TC cmdc per un pattern suggestivo di malignità si è dimostrata significativamente maggiore per noduli di piccole dimensioni ed utilizzando lo stesso cut-off significativo anche in CEUS (2.5 cm), tale pattern è

identificato in 7/18 (39%) e in 1/16 (6%) dei noduli rispettivamente inferiori/uguali a 2.5 cm o superiori a 2.5 cm ($p=0.030$).

La ricerca di un pattern vascolare tipico per HCC alla TC (tutti i casi di wash-out porto/tardivo in cui il pattern arterioso non fosse ad anello) identifica solo 5 casi su 34 (15%) in cui la TC da sola avrebbe potuto portare ad una falsa diagnosi di HCC. Questo si verificava più frequentemente nei noduli piccoli: se si esclude una lesione di 35 mm, i restanti casi comprendevano solo noduli di diametro pari o inferiore a 20 mm, anche se non raggiungeva significatività statistica.

Il rischio di diagnosi errata di HCC tipico è quindi risultato significativamente maggiore alla CEUS (48%) che alla TC (15%), quando queste erano prese in considerazione singolarmente ($p=0.005$).

Nei 24 noduli in cui erano disponibili entrambe le tecniche TC e CEUS, esse sono state valutate in parallelo in termini di concordanza del pattern contrastografico. Una concordanza positiva per presenza di wash out del mdc era presente in 4 casi, così come una concordanza negativa per wash out era presente in 2 casi. La CEUS si conferma più sensibile nel suggerire una malignità della lesioni, intesa come presenza di wash out (79%, 19/24) rispetto a TC cmc (29%, 7/24) ($p=0.001$).

La TC cmc si conferma meno soggetta a rischio di falsa diagnosi di HCC, con 5 casi su 24 (21%) rispetto alla CEUS (13/24, 54%), ($p=0.018$).

3) RM con m.d.c.

L'analisi è stata compiuta su 17 RM.

La maggior parte dei noduli (14/17, 82%) mostrava enhancement in fase arteriosa; di questi, 8 su 17 (47%) erano omogenei, 5 (29%) ad anello e 1 eterogeneo. Solo in 2 casi su 9 noduli inferiori o uguali ai 2 cm si osservava l'aspetto a cerchio periferico. I restanti 3 noduli (18%, tutti inferiori a 3 cm) erano isointensi. Alla RM nessun nodulo appare ipointenso in questa fase.

Si segnala che nei noduli investigati con tutte e tre le tecniche (12 casi) si è osservato uno stesso pattern di enhancement omogeneo in soli 2 casi.

In fase venosa/tardiva 5 noduli (29%) rimanevano iperintensi; di essi 3 erano omogenei e 2 con un aspetto ad anello.

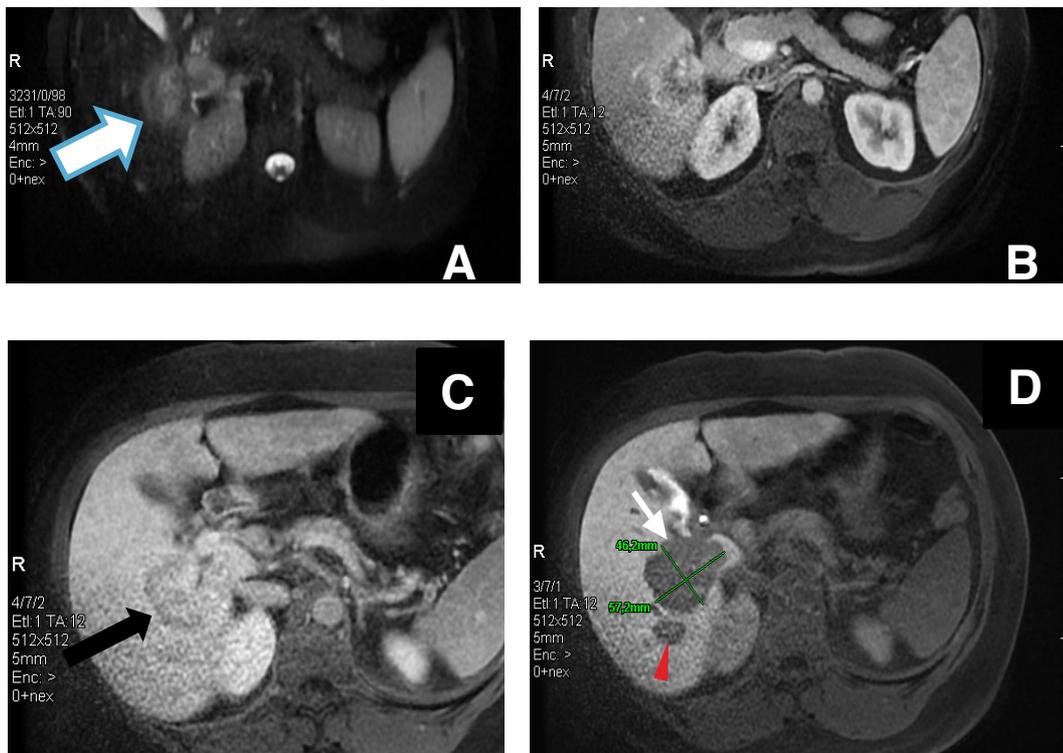
Su segnala una lesione, inserita in tabella come “iperdensa ad anello” in fase arteriosa e “ipodensa ad anello” in fase tardiva, la quale esibiva un segno che in letteratura è chiamato “reverse target appearance” [38, 64, 86]: l’iperenhancement periferico in fase arteriosa con centro ipocaptante s’inverte in fase tardiva, con aspetto ipo-captante in periferia, come da parziale wash-out, e ipercaptante al centro (rispetto a come appariva in fase arteriosa). Questo comportamento è stato descritto in alcuni precedenti studi sul CHC [38, 64, 86]. Fowler et al. [38] ne riportano una prevalenza intorno al 40% nel loro campione di CHC, benché notino anche come questo sia più frequente nei loro CC di riferimento (69-70% dei casi).

La **Figura 2.4** mostra le immagini RM di questa lesione nelle scansioni basali e con mezzo di contrasto.

In fase epato-biliare 12 noduli su 15 (80%) apparivano ipointensi rispetto al restante parenchima nelle sequenze T1-pesate; questo aspetto indica generalmente una malignità del nodulo. Dei restanti 3 noduli (20%), due ritenevano ancora il mezzo di contrasto e uno era isointenso.

Un comportamento contrastografico tipico per HCC alla RM (individuato mediante gli stessi criteri adottati per la TC (wash-in non ad anello o isointensità seguiti da wash-out) si osservava in 3 su 17 casi (18%), significativamente inferiore al dato CEUS ($p=0.080$). Un wash-out globale si rilevava in 5 casi su 17 (29%), pattern suggestivo per malignità, significativamente inferiore alla CEUS ($p=0.002$).

Figura 2.4 (RM con m.d.c.) – Nodulo di 66 mm di diametro. La lesione CHC principale è indicata dalla freccia bianca (A) in scansione basale T2 FAT-SAT. Il nodulo principale mostra un CE ad anello con centro ipodenso in fase arteriosa (B) e un wash-out del cerchione con CE centrale eterogeneo durante la progressione verso la fase tardiva (C), con inversione dell'aspetto. Questo comportamento, denominato da alcuni in letteratura come “reverse target”, è atipico per HCC ed è stato segnalato come piuttosto frequente nei CHC e nei CC. Il radiologo chiamato a valutare le nostre immagini ha in prima istanza individuato questa lesione come “sospetta per CHC”. In fase epatospecifica (D) il nodulo appare nettamente ipointenso rispetto al restante parenchima ed è ben evidente anche una lesione minore satellite (freccia rossa). Questo dato conferma il sospetto di malignità della neoplasia.



2.3.2 - Dati clinici e laboratoristici dei pazienti nel gruppo di studio e controllo (FASE 2)

La **Tabella 2.1** riassume le caratteristiche dei pazienti. Gli esami di laboratorio, età, dimensioni del nodulo sono riportati come mediana, con relativo range tra parentesi a fianco.

L'età mediana dei pazienti era 62 anni e il sesso più colpito si è confermato essere quello maschile con una prevalenza pari all'80% in entrambi i gruppi.

La cirrosi riconosceva un'eziologia virale nella maggior parte dei casi (61% nel gruppo CHC, 67% nel gruppo HCC). Nel gruppo CHC l'infezione cronica da virus dell'epatite C era la causa di cirrosi più frequente 19/36 (53% dei casi), seguita da alcol 8/36 (22%) ed epatite B 5/36 (14%). Le cirrosi criptogenetiche o verosimili NASH comprendevano il restante 11% dei casi (4/36).

Dal punto di vista della funzione epatica e stadio di malattia alla diagnosi, il gruppo di controllo HCC presentava funzione epatica tendenzialmente peggiore rispetto al gruppo di studio (vedi Child-Pugh, albumina, in Tabella 2.1), oltre che più elevati valori di enzimi di citonecrosi/colestasi. L'86% dei pazienti con CHC presentava classe CTP A (24/36, 73% in classe A5).

Nel gruppo CHC, nel 62% (21/34) dei casi l' α -fetoproteina era alterata (rispetto ai valori massimi indicati dai nostri laboratori di > 7 ng/mL), il CA 19.9 era elevato (> 37 U/mL) in 8/14 casi (57%), ma il dato relativo al CA 19.9 era disponibile solo in 14/36 pazienti. In solo 1 caso su 14 entrambi i marcatori erano sopra la norma. Nel gruppo HCC, in cui il dato relativo ad alfa-FP era disponibile in 56/72 pazienti, essa risultava alterata nel 70% (39/56) dei casi. Non vi erano dati disponibili relativi al valore di CA 19.9 nel gruppo HCC. La dimensione mediana dei noduli era 25 mm, con un ampio range di variabilità (10-100); 15 noduli erano pari o inferiore a 2 cm, 9 tra 2 e 3 cm, 13 noduli erano maggiori di 3 cm. Il dato della steatoepatite non alcolica, che risulta essere causa dell'epatopatia con maggiore

prevalenza nel gruppo CHC vs HCC, è legato a difficoltà a mantenere il match rispettando tutti i criteri di appaiamento sopradescritti.

Tabella 2.1- Baseline characteristic

	CHC (N=36)	HCC (N=72)	p
age	62 (40-77)	62.5 (38-79)	NS
gender (M/F)	29/7	58/14	NS
MELD	8.5 (7-23)	8 (0-24)	NS
INR	1.09 (0.97-1.61)	1.12 (0-1.90)	NS
Bil T mg/dl	0.73 (0.45-27.74)	1.1 (0.40-12.00)	0.14
ALB mg/dl	40.5 (22.00-49.00)	36.5 (22.00-48.00)	0.006
GOT U/l	48.5 (11-268)	62 (0-369)	0.015
GPT U/l	38 (7-217)	57 (8-418)	0.003
GGT U/l	90 (0-1020)	90 (12-408)	0.228
Phosf Alc U/l	155.5 (51-754)	280 (0-5040)	0.0001
Creat mg/dl	1 (0-9)	1 (0-2)	NS
AFP ng/ml	11.5 (2-250)	13 (2-150000)	NS
tumor size mm	25 (10-100)	28 (14-80)	NS
CPT class (A/B/C)	31/5/0	53/16/3	0.044
BCLC (0/A/B/C/D)	6/16/7/7/0	3/33/21/12/3	0.057
under surveillance (Y/N)	26/10	35/33	0.04
single/multiple nodules	22/14	44/28	1
TVP/meta (Y/N)	7/29	12/60	0.72
Etiology			

viral	22	48	NS
alcohol related	10	23	NS
NASH	4	1	0.023

Interessante il dato della fosfatasi alcalina, che presenta valori significativamente più elevati nel gruppo HCC e che all'analisi multivariata pare essere il predittore più significativo di CHC (Tavola 2.2)

Tavola 2.2 - Analisi Multivariata nella predizione di CHC.

		Variables in the Equation							
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 ^a	FosfAlc	-.005	.002	7.663	1	.006	.995	.991	.998
	Constant	1.720	.561	9.401	1	.002	5.587		

a. Variable(s) entered on step 1: FosfAlc.

2.3.3 - Analisi della sopravvivenza

Confronto tra gruppo CHC e HCC: Nel gruppo CHC si è osservato un follow-up mediano di 1.58 anni (0.16-11.08) mentre nel gruppo HCC il follow up mediano osservato è stato di 3.58 anni (0.1-16.68), ($p=0.026$ - Mann-Whitney U test).

La sopravvivenza globale a 1, 3 e 5 anni è risultata 82.85%, 58.57% e 40% per il gruppo HCC e dell'80.64%, 39.28% e 20.83% per il gruppo CHC, rispettivamente. In sostanza non si sono osservate differenze statisticamente significative nel calcolo della sopravvivenza tra gruppo di studio CHC e gruppo di controllo HCC, sebbene nella sopravvivenza a 3 e a 5 anni, si osservi un trend verso una migliore sopravvivenza nel gruppo HCC ($p=0.08$ e $p=0.14$).

Al 31 dicembre 2013, del gruppo CHC, 22 su 36 pazienti risultavano deceduti (61%). La **Tavola 2.1** riporta i risultati dell'analisi sulla sopravvivenza globale, che riporta una sopravvivenza mediana di 2.36 anni (95% C.I. 0.94-3.78) per il gruppo con CHC e di 4.09 anni (95% C.I. 2.83-5.34) per il gruppo con HCC, seppure il confronto non raggiunga significatività statistica.

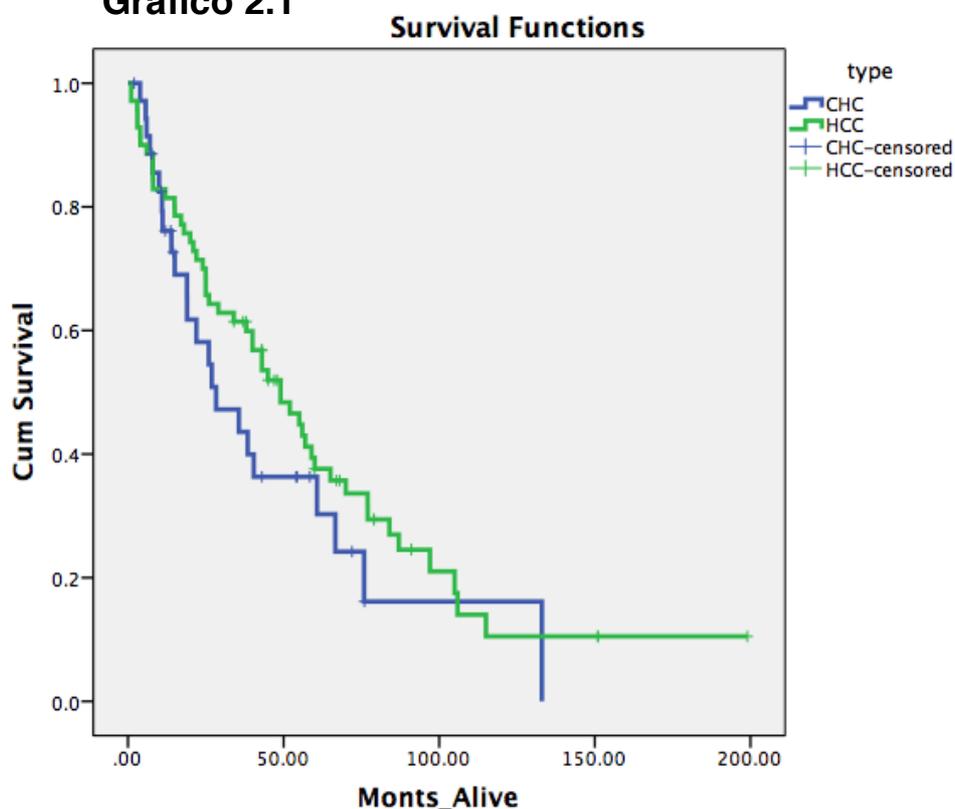
Tavola 2.1

Means and Medians for Survival Time

type	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
CHC	3.960	.750	2.491	5.429	2.360	.727	.936	3.784
HCC	5.261	.660	3.968	6.554	4.085	.641	2.829	5.340
Overall	4.904	.535	3.855	5.953	3.587	.453	2.699	4.474

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

Grafico 2.1



Footnote

Il **Grafico 2.1** riporta le curve di sopravvivenza per HCC e CHC.

Sono stati poi valutati eventuali fattori diversamente influenzanti la sopravvivenza tra i due gruppi, in particolare lo stadio alla diagnosi e il tipo di strategia terapeutica.

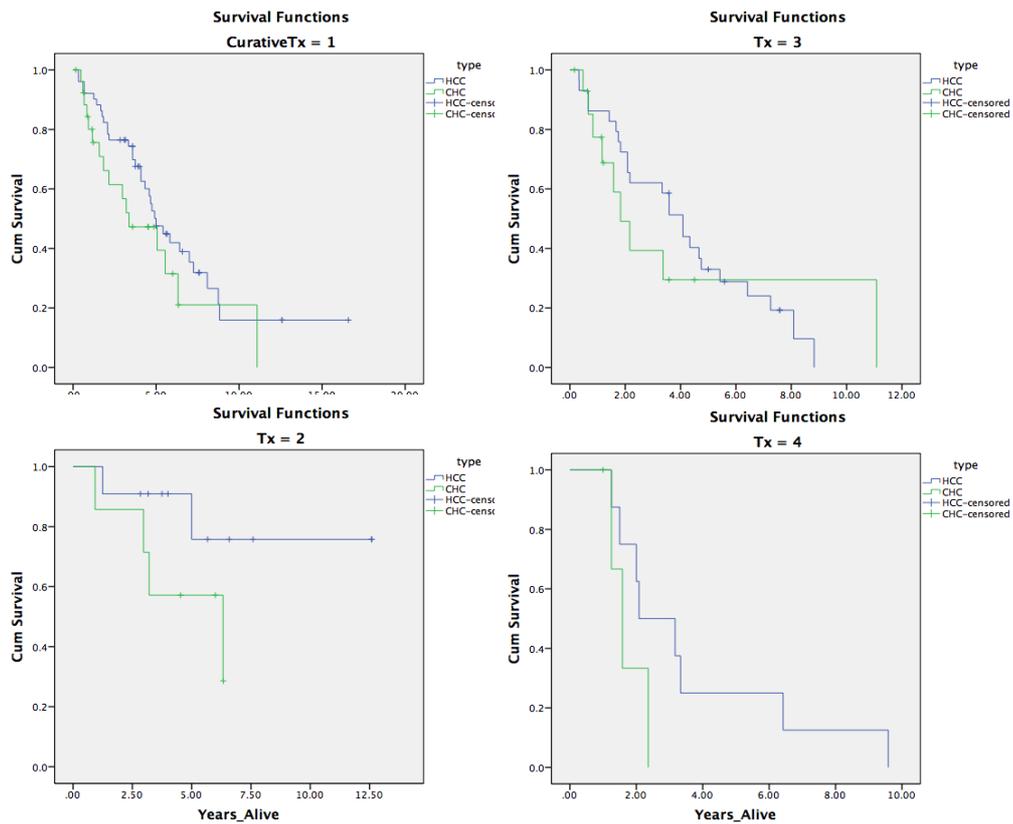
Non sono emerse differenze statisticamente significative nelle sopravvivenze dei pazienti con stadio precoce di malattia (“early”, ≤ 2 cm, unifocale) tra gruppo di studio e gruppo di controllo, né quando stratificati per stadio BCLC.

Globalmente i pazienti affetti da CHC trattati con terapia considerate curative per l’HCC (trapianto, resezione, terapie percutanee ablativie a radiofrequenza o alcolizzazione) non mostravano significative differenze di sopravvivenza quando confrontati con il gruppo di pazienti HCC similmente trattati.

Tavola 2.2 - Sintesi dei casi per singola tipologia di trattamento (1=PEI, 2=RF, 3= resezione, 4=TACE, 5=OLT, 6=sorafenib, 7=palliativa)

Case Processing Summary					
Tx	type	Total N	N of Events	Censored	
				N	Percent
1	HCC	2	2	0	0.0%
	Overall	2	2	0	0.0%
	HCC	9	5	4	44.4%
2	CHC	4	3	1	25.0%
	Overall	13	8	5	38.5%
	HCC	11	2	9	81.8%
3	CHC	7	4	3	42.9%
	Overall	18	6	12	66.7%
	HCC	29	24	5	17.2%
4	CHC	15	9	6	40.0%
	Overall	44	33	11	25.0%
	HCC	8	8	0	0.0%
5	CHC	4	3	1	25.0%
	Overall	12	11	1	8.3%
	HCC	2	1	1	50.0%
6	CHC	1	0	1	100.0%
	Overall	3	1	2	66.7%
	HCC	3	3	0	0.0%
7	Overall	3	3	0	0.0%
	HCC	6	6	0	0.0%
	CHC	5	4	1	20.0%
Overall	11	10	1	9.1%	
Overall	Overall	106	74	32	30.2%

Grafico 2.2 - Curve di sopravvivenza per singolo trattamento con intento “curativo” (1= PEI, 2= RF, 3= resezione, 4= TACE). Confronto tra gruppo di studio (CHC) e controllo (HCC)



Analizzando invece i dati separatamente per tipo di terapia curativa, risulta che i pazienti con CHC trattati con terapie percutanee (RF e PEI) dimostravano una sopravvivenza tendenzialmente inferiore rispetto ai pazienti con HCC analogamente trattati con terapie percutanee (5.5 vs 8.75 anni) ($p=0.06$) (**Tavola 2.4**).

Tavola 2.3 – Analisi statistica di confronto tra sopravvivenze in base a tipo di terapia

Overall Comparisons			
Tx	Chi-Square	df	Sig.
	Log Rank (Mantel-Cox)	0	.
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	0	.
	Tarone-Ware	0	.
1	Log Rank (Mantel-Cox)	.818	1 .366
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	.551	1 .458
	Tarone-Ware	.629	1 .428
2	Log Rank (Mantel-Cox)	2.354	1 .125
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.011	1 .156
	Tarone-Ware	2.193	1 .139
3	Log Rank (Mantel-Cox)	.225	1 .635
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.391	1 .238
	Tarone-Ware	1.004	1 .316
4	Log Rank (Mantel-Cox)	1.905	1 .168
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.437	1 .231
	Tarone-Ware	1.659	1 .198
5	Log Rank (Mantel-Cox)	.	1 .
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	.	1 .
	Tarone-Ware	.	1 .
6	Log Rank (Mantel-Cox)	.	0 .
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	.	0 .
	Tarone-Ware	.	0 .
7	Log Rank (Mantel-Cox)	.069	1 .792
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	.708	1 .400
	Tarone-Ware	.355	1 .551

The vector of trend weights is -1, 1. This is the default.

Tavola 2.4 – Analisi statistica di confronto tra sopravvivenze nel gruppo CHC e HCC trattati con terapie percutanee.

Overall Comparisons			
percutan	Chi-Square	df	Sig.
.00	Log Rank (Mantel-Cox)	1.110	1 .292
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.093	1 .296
	Tarone-Ware	1.334	1 .248
1.00	Log Rank (Mantel-Cox)	3.487	1 .062
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	3.402	1 .065
	Tarone-Ware	3.432	1 .064
Pooled ^a	Log Rank (Mantel-Cox)	3.264	1 .071
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.104	1 .147
	Tarone-Ware	2.969	1 .085

The vector of trend weights is -1, 1. This is the default.

a. Adjusted for percutan.

Grafico 2.3 – Curva di sopravvivenza in pazienti sottoposti a terapie percutanee, confronto tra gruppo di studio (CHC) e controllo (HCC).

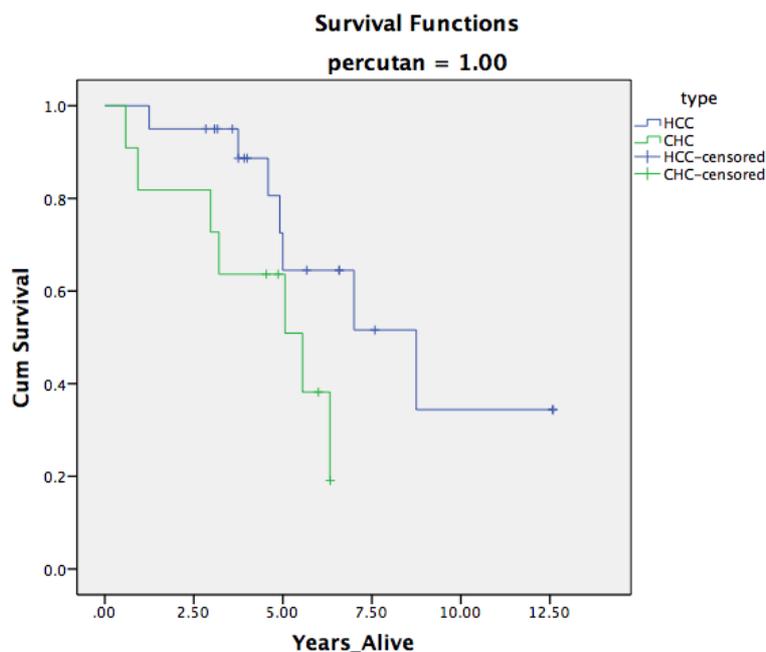


Tavola 2.5 – Stima della sopravvivenza mediana/media nei pazienti sottoposti a terapie percutanee e non.

		Means and Medians for Survival Time							
percutan	type	Mean ^a				Median			
		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
.00	HCC	3.948	.576	2.818	5.078	2.834	.722	1.418	4.250
	CHC	3.290	.944	1.440	5.140	1.582	.240	1.112	2.053
	Overall	3.690	.481	2.747	4.633	2.168	.372	1.438	2.898
1.00	HCC	8.203	1.100	6.047	10.360	8.747	2.176	4.482	13.013
	CHC	4.466	.635	3.220	5.711	5.552	1.515	2.583	8.522
	Overall	7.170	.892	5.421	8.919	6.322	1.021	4.320	8.323
Overall	Overall	4.989	.542	3.926	6.052	3.587	.543	2.522	4.651

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

Sottoanalisi di sopravvivenza nel gruppo CHC e HCC separatamente:

Nel gruppo CHC l'analisi comparativa univariata per la ricerca di fattori influenzanti la sopravvivenza a 3 anni ha mostrato una significatività elevata per numerosi indicatori (**Tavola 2.6**).

Tavola 2.6 - Variables not in the Equation

	Score	df	Sig.
age	.010	1	.919
gender	2.551	1	.110

BCLC	13.836	3	.003
BCLC(1)	11.926	1	.001
BCLC(2)	.065	1	.799
BCLC(3)	.009	1	.926
BCLC(4)	4.427	1	.035
INR	.388	1	.533
Bil.Tot	.782	1	.377
ALB	.200	1	.655
GOT	.251	1	.616
GPT	.072	1	.789
gGT	2.393	1	.122
FosfAlc	1.463	1	.226
Surveillance	7.296	1	.007
earlyTU	8.881	1	.003
TU_diam	3.864	1	.049
CurativeTx	5.596	1	.018
etioNASH	.508	1	.476
percutan	3.059	1	.080
TU_metaTVP	4.427	1	.035

La dimensione del nodulo e lo stadio iniziale BCLC risultavano significativamente correlati a sopravvivenza all'univariata, sia considerati da soli ($p=0.049$ e $p=0.003$ rispettivamente), ma maggiormente quando la dimensione si associava allo stadio precoce con monofocalità (early_TU sta per tumore ≤ 2 cm ed unifocale) ($p=0.003$). Altri fattori significativamente correlati a sopravvivenza risultavano la presenza di metastasi extraepatiche e/o di trombosi vascolare ($p=0.035$), l'essere in un programma di sorveglianza per la diagnosi precoce di noduli epatici ($p=0.007$), e l'essere stati sottoposti a una terapia considerata curativa ($p=0.018$). Si segnala che 27 pazienti su 36 sono stati trattati con terapia considerata "curativa" (PEI in 4 pazienti, RF in 6 pazienti, resezione in 16 pazienti e trapianto in un paziente) e che la sopravvivenza dei pazienti trattati con terapia curativa era significativamente superiore a quella dei restanti pazienti (mediana 24 vs 8 mesi).

Confrontando i gruppi di CHC diagnosticati durante la sorveglianza rispetto ai pazienti con CHC non in sorveglianza, emerge come i primi siano caratterizzati da minore diametro del nodulo alla diagnosi (mediana 24 vs 63 mm) e da una maggiore sopravvivenza globale (26 vs 9 mesi, mediana), verosimilmente correlata alla maggiore prevalenza di trattamenti curativi nei pazienti in sorveglianza (22/26, 85% vs 5/10, 50%). Possibile bias da considerare il fatto che la sopravvivenza maggiore nei pazienti in sorveglianza può essere legato al più lungo tempo di follow up legato alla scoperta del nodulo in fase più precoce.

Nell'analisi multivariata però solo il tumore in stadio precoce (unifocale e \leq 2 cm) e l'essere in un programma di sorveglianza per la diagnosi precoce di HCC si mantengono come predittori indipendenti di sopravvivenza globale, con $p=0.009$ e $p=0.002$, rispettivamente.

Similarmente nel gruppo di controllo HCC, il diametro, lo stadio BCLC alla diagnosi, l'essere in un programma di sorveglianza, terapia curativa e presenza di malattia extraepatica (con l'aggiunta di sesso e gamma-GT), risultano tutti predittori di sopravvivenza all'analisi univariata. Solo l'assenza di malattia extraepatica e/o trombosi portale neoplastica si mantiene come fattore indipendentemente correlato alla sopravvivenza ($p=0.028$), nell'analisi multivariata.

2.4 - DISCUSSIONE

Il carcinoma combinato epatocolangiocellulare insorto su cirrosi rappresenta un soggetto ancora poco conosciuto; sebbene i tumori combinati possano rappresentare una minoranza dei tumori su cirrosi rispetto all'HCC, trattamenti e prognosi di queste due entità possono essere molto differenti, rendendo importante una diagnosi preoperatoria accurata. La nostra casistica sui tumori misti CHC su cirrosi, si colloca fra le più numerose in letteratura ed il dato originale è dato dalla selezione di soli casi insorti su cirrosi, dalla descrizione dell'aspetto di questo tumore alla CEUS, valutando di quest'ultima il potenziale contributo al dibattito

argomento della diagnosi non invasiva dei noduli insorti su cirrosi e dal confronto in termini di “outcome” con una casistica di HCC su cirrosi a confronto.

2.4.1 – Discussione dei dati radiologici

Il problema della diagnosi non invasiva dei noduli epatici insorti “*de-novo*” è critico nella gestione dei pazienti affetti da cirrosi. La probabilità pre-test che questi noduli si rivelino maligni è alta, in particolare in presenza di lesioni grandi. Secondo precedenti studi il 66% dei noduli fra 1 e 2 cm e l’80% di quelli fra 2 e 3 cm sono HCC [124-126], mentre in presenza di un diametro superiore ai 3 cm la probabilità di HCC sale al 92-95% [121]. Alla luce di tali dati e allo scopo di ridurre la necessità di ricorrere alla biopsia, sono stati validati criteri radiologici per la diagnosi non invasiva di HCC, basati sull’identificazione di caratteri cosiddetti “tipici” per HCC che, anche in virtù dell’altissima prevalenza di epatocarcinoma fra i tumori maligni insorti su cirrosi, raggiungono una specificità vicina al 100%. Le tre tecniche che rientravano nelle linee guida internazionali fino a pochi anni orsono erano TC e RM con m.d.c. e CEUS. Negli ultimi anni sono emersi i problemi dei casi di imaging “atipico” per HCC (casi quindi secondo le linee guida destinati alla biopsia), della congruenza delle varie metodiche nell’identificare questi caratteri tipici e della possibilità di una diagnosi non invasiva radiologica anche di quella piccola quota di tumori primitivi del fegato che non sono HCC (soprattutto CC). La recente dimostrazione da parte del gruppo di Barcellona [77] che una buona quota di ICC (47,6%) possa mostrare un aspetto tipico per HCC alla CEUS (meno frequentemente in TC e RM) ha portato all’esclusione di questa metodica dalle ultime linee guida americane [17] e, successivamente, anche da quelle europee per la diagnosi di HCC [78]. Lo studio del 2013 di Galassi et al. [127] ha confermato l’effettiva scarsa specificità della CEUS nell’escludere un HCC in un campione composto interamente da ICC, riconoscendo comunque alla CEUS un ruolo nell’iter diagnostico dei noduli su cirrosi.

I risultati del nostro studio confermano l'eterogeneità che caratterizza i tumori misti epatocolangiocellulari, mostrando come il tumore combinato su cirrosi mostri un pattern contrastografico comune a entrambi HCC e ICC, spesso intermedio tra queste due forme.

Sebbene non si sia riscontrato un pattern vascolare patognomonico, il pattern di enhancement arterioso ad anello periferico, suggestivo per forma colangiocitaria, si è riscontrato nel 26%, 50% e 29% dei noduli a CEUS, TC e RM, rispettivamente. Questo pattern è improbabile negli HCC mentre è stato descritto con frequenza variabile negli ICC, e dipendente da tipo di imaging, dimensioni e presenza o meno di epatopatia sottostante, con presenza fino al 51% degli ICC alla CEUS al 59-65% alla TC cmc, su fegato sano,[38] e con percentuali inferiori nei pazienti cirrotici, tra 8-52% a CEUS e 50% a TC [77, 81, 127, 132].

L'eterogeneità del pattern di enhancement descritto in letteratura dipende anche dalle dimensioni del nodulo. Le dimensioni della maggior parte dei noduli nella nostra casistica sono inferiori a quelle riportate in altri studi sullo stesso tumore; nel nostro caso ciò è secondario al fatto che la maggioranza (72%) dei noduli sono stati diagnosticati precocemente nell'ambito di screening del paziente cirrotico per la diagnosi precoce di HCC. Precedenti studi riportano che la maggior parte dei piccoli noduli sia di ICC che di HCC mostrano un pattern più frequentemente omogeneo in fase arteriosa, rispetto ai noduli maggiori, in cui in particolare l'ICC tende più frequentemente a mostrare enhance periferico e/o eterogeneo [81]. Un simile dato emerge anche dal nostro studio, in cui nessun nodulo <2 cm mostra enhancement ad anello periferico a CEUS, presente comunque solo nel 29% a TC e nel 22% a RM. I noduli maggiori di 20 mm hanno mostrato in CEUS un enhancement globale (più tipico per HCC) in oltre il 50% dei casi, mentre l'enhancement ad anello risultava nel 44% a CEUS e 85% a TC. I noduli fino a 30 mm hanno mostrato una maggiore prevalenza di enhancement omogeneo, e i più piccoli hanno talvolta mostrato un comportamento ipovascolare (15%) in tutte le fasi.

Alla TC il quadro in particolare appare eterogeneo: le combinazioni di diversi pattern erano più numerose ed è più complesso riassumerne il trend globale. In generale il pattern più frequente era quello ad anello, specialmente nei noduli più grandi. Come per la CEUS, i noduli superiori ai 3 cm hanno aspetto maggiormente omogeneo in fase arteriosa, mostrando in tutti i casi un enhancement, nell'85% dei casi ad anello; i noduli più piccoli si confermano più eterogenei con una piccola presenza di lesioni isodense (12%) e una meno netta predominanza dell'aspetto rim-like sull'omogeneo (29% e 50% rispettivamente). Questi risultati sono in linea con quanto riportato dalla letteratura sull'imaging di CHC, in particolare in lavori recenti come quello di Fowler et al. [38], i quali segnalano un 100% di casi di enhancement arterioso e una prevalenza (63%) del pattern rim-like rispetto all'omogeneo. Poiché la loro casistica era composta da noduli mediamente più grandi dei nostri (mediana: 75 mm), i loro risultati ben si adattano a quanto da noi riscontrato nei noduli maggiori.

Per quanto riguarda la RM, la metodica si è dimostrata nel nostro studio di poco migliore rispetto a TC in quanto a rischio di diagnosticare un HCC tipico, mostrando essa nel 18% dei casi un wash-out porto/tardivo dopo CE arterioso non rim-like. Discorso a parte merita l'aspetto sull'ipointensità fase epato biliare, considerata, anche da sola, un importante predittore di malignità alla RM in un recente studio di Golfieri et al. [128]. Effettivamente, nel nostro studio, 12 noduli su 15 (80%) mostravano questo aspetto in fase epato-specifica, confermando quindi la buona sensibilità della RM nel rilevare la natura dei noduli epatici, anche nel CHC.

In definitiva la CEUS avrebbe portato ad una errata diagnosi di HCC tipico (inteso come wash-in globale o isoecogenicità seguiti da wash-out) in un numero significativamente maggiore di casi rispetto alla TC e RM (48% vs 15% vs 18%, $p=0.005$ e $p=0.080$), quando queste erano prese in considerazione singolarmente, in linea con quanto riportato a proposito dei

CC da gruppo di Barcellona (Vilana et al.) [77] e, successivamente, da quello di Bologna [127].

Va sottolineato però che l'indicazione della malignità del nodulo, intesa come presenza di wash-out dopo enhancement arterioso, era invece fornita con una maggiore accuratezza da parte della CEUS vs TC e RM (78% vs 24% vs 29% dei casi, con $p < 0.0001$ e $p = 0.002$), specialmente nei noduli grandi. Mancando in letteratura dati sull'aspetto imaging tipico per CHC, le lesioni sono state infatti valutate secondo il numero di casi nei quali le due tecniche riuscivano a porre sospetto della presenza di un nodulo maligno, diverso da HCC.

Dato più interessante è l'alta prevalenza (78%) di wash-out alla CEUS, la quale costituisce un segno di malignità della lesione e che potrebbe costituire uno dei vantaggi di questa metodica in particolare, come suggerito da Galassi et al. [127] nel loro studio sui CC su cirrosi (in tale studio la CEUS mostrava un 76% di casi di wash-out). Peculiare anche come tale comportamento fosse, nella nostra casistica, fortemente correlato alle dimensioni dei noduli. Sopra al cut-off di 25 mm, tutti i noduli si sono infatti dimostrati maligni alla CEUS.

La differenza più importante fra TC e CEUS era la minore tendenza della prima a mostrare un wash-out, mantenendo in molti casi un'isodensità dei noduli rispetto al resto del fegato.

Valutando i casi in cui fossero disponibili almeno CEUS e TC, il fatto che la CEUS fosse positiva per wash-out nel 79% dei casi in cui la TC era negativa è importante in quanto, in assenza di un orientamento diagnostico preciso dopo TC, la CEUS suggeriva una malignità della lesione. In questo senso la CEUS potrebbe migliorare la sensibilità della TC nel rilevare la malignità dei noduli.

Infatti in generale assai poche lesioni CHC sottomesse a entrambe le metodiche TC e CEUS mostravano pattern di enhancement coincidenti, con discrepanze rilevate soprattutto nella fase venosa.

Tale aspetto di discrepanza tra CEUS e imaging TC/RM cmc in fase tardiva, con ipoecogenicità a CEUS (legata ad un wash out del mdc) e iso o iperdensità/intensità a TC e RM cmc è sovrapponibile a quanto già descritto in letteratura per ICC [130, 131] ed è stata correlata alla differenza tra la cinetica dei mdc diversa cinetica dei mezzi di contrasto [129] e della differente composizione dei due tumori. La tendenza da parte del tessuto a ritenere m.d.c. iodato sembra essere correlata alle dimensioni del tumore e dall'entità della reazione desmoplastica interna allo stesso. Quest'ultima è più rilevante nei noduli grandi ed è un reperto comune nei colangiocarcinomi [130, 131].

SonoVue, il mdc usato in CEUS, è un mdc puramente intravascolare che riflette quindi puramente la vascolarizzazione del tumore; i mdc usati in TC e RM (iodio e gadolinio principalmente), hanno una fase in cui tardivamente diffondono nell'interstizio (fase extravascolare) e sono trattenuti per un tempo più lungo nel tessuto in particolare in quelli con reazione fibrotica/desmoplastica, che caratterizza gli ICC rispetto agli HCC.

Questa tendenza all'omogeneizzazione o comunque a trattenere il mdc in fase tardiva e il frequente aspetto rim-like rilevato in fase arteriosa sono le caratteristiche che rendono la TC e RM più accurate nel mostrare nei noduli CHC dello studio caratteristiche atipiche per HCC, richiedenti quindi ulteriore caratterizzazione diagnostica mediante altre metodiche e/o biopsia.

Comunque rimane la ridotta accuratezza nella diagnosi differenziale nel caso di lesioni piccole, sotto i 2 cm, nel 30% delle quali anche TC e RM risultano a significativo rischio di "errata diagnosi" di HCC.

Il pattern iso-iperdenso dei CHC alla TC/RM in fase tardiva è una caratteristica comune anche ai CC sia in fegati cirrotici [81] che non cirrotici [79] e che limita il rischio di errata classificazione del tumore per un HCC. Tuttavia, la mancanza di wash-out in fase tardiva dopo wash-in

arterioso, può falsamente suggerire una natura non maligna delle lesioni, specialmente agli occhi del radiologo meno esperto.

Tali differenze nel pattern di enhancement dei noduli CHC può essere vantaggiosa, in particolare quando la CEUS mostri un washout assente a TC e/o RM. Tale pattern non è infatti mai osservato in HCC [75, 81, 127] e può suggerire comunque una lesione maligna, basata sul comportamento CEUS, suggerendo quindi una natura non HCC, ma più verosimilmente colangiocellulare, rendendo quindi indicata biopsia. Tuttavia una biopsia non è sempre fattibile e questa, in ogni caso, è sempre associata ad un rischio di falsi negativi nel caso in cui il campione raccolto non sia adeguato o sia insufficiente (specialmente nel caso di noduli piccoli). Fino al 40% dei casi richiede una ripetizione dell'esame per scongiurare il rischio di falsi negativi [127]. Ciò supporta l'uso di almeno due tecniche di imaging consecutive, CEUS inclusa, in particolare nei noduli non eleggibili a biopsia, per ridurre il rischio di falsi negativi, che peraltro sono rari alla CEUS (data l'elevata accuratezza del pattern contrastografico wash-in→wash out) nel suggerire malignità.

Tra i limiti dello studio vi è la natura prevalentemente retrospettiva dello studio, segnaliamo comunque che si tratta di casi raccolti consecutivamente, alcuni dei casi afferivano ai centri mentre ancora era in corso la raccolta dati. Data la rarità del tumore combinato si rende impraticabile l'ipotesi di raccogliere una casistica interamente di tipo prospettico.

Un limite inoltre risulta legato all'affidabilità della diagnosi istologica di CHC, effettuata su biopsia nel 54% dei casi nel nostro studio. L'affidabilità della biopsia nella diagnosi istologica è limitata dalle dimensioni del campione, per il quale non siamo in grado di risalire alle dimensioni dell'ago utilizzate nei due centri e dalla comprensibile variabilità di campionamento del tumore misto combinato. In almeno un caso infatti la diagnosi istologica su pezzo operatoria smentiva la diagnosi preoperatoria

su biopsia che risultava in una forma pura HCC; inoltre è noto che HCC e CHC possano coesistere nello stesso fegato in caso di multinodularità e lo studio fa riferimento solo al nodulo oggetto di campionamento istologico. Tuttavia in un contesto di gestione reale del paziente è improbabile pensare di sottoporre a biopsia e in sicurezza tutti i noduli del paziente, considerando che il paziente cirrotico è frequentemente soggetto ad alterazioni coagulative o ad ascite.

2.4.2 – Descrizione dei dati clinici e di sopravvivenza

I dati epidemiologici emersi nello studio, come la maggiore frequenza nel sesso maschile, l'eziologia virale, la sesta decade di insorgenza, sono in linea con quanto riscontrato da precedenti studi sul CHC e in particolare da quelli che rilevavano una tendenza di questa malattia ad assumere caratteri clinico-epidemiologici, sì intermedi fra HCC e CC, ma più simili al primo dei due. Poiché, come si è detto, le differenze clinico-demografiche presentate dagli studi condotti in centri di diversi paesi del mondo erano in gran parte correlate alla diversa incidenza di cirrosi e dei relativi fattori di rischio, il nostro lavoro, comprendente solo pazienti affetti da cirrosi, mostra quindi risultati più simili (per quanto riguarda l'epidemiologia) a quelli di zone ad alta prevalenza di epatiti virali, cirrosi ed HCC.

I risultati relativi ai marker tumorali confermano l'ipotesi che il CHC esprima mediamente livelli maggiori di CA 19.9 rispetto all'HCC e di AFP rispetto all'ICC. La "sensibilità" massima di questi indici, calcolata utilizzando come cut-off il range superiore di normalità dei nostri laboratori (7 ng/mL per l'AFP e 37 U/mL per il CA 19.9), rimane comunque limitata a circa il 60% dei casi. Inoltre la nostra esperienza non avvalorava l'ipotesi riportata da altri studi [49] secondo cui un'elevazione simultanea dei due marcatori di HCC e CC possa far sospettare la presenza di un tumore combinato. In solo 1 caso su 14 abbiamo infatti rilevato una concordanza di elevazione di AFP e CA 19.9, peraltro di modesta entità per entrambi i marker.

Il nostro studio è caratterizzato da una mediana di dimensioni dei noduli piuttosto bassa (25 mm) e da un range di variabilità abbastanza ampio (10-100 mm). Questo è attribuibile al fatto che la casistica era composta da una maggioranza di pazienti in screening ecografico per HCC su cirrosi (soprattutto per quanto riguarda il campione di Milano) e da una certa quota di pazienti fuori screening, a volte afferenti da diversi ospedali o regioni, nei quali la diagnosi è stata posta incidentalmente o in seguito a comparsa di sintomi aspecifici (soprattutto nel campione di Bologna). Come le altre neoplasie epatiche, i CHC sono caratterizzati in generale da una tardiva comparsa di sintomatologia. Per questa ragione nei pazienti in follow-up stretto la diagnosi era stata posta più tempestivamente, i noduli erano in genere piccoli e silenti e lo stadio era per lo più precoce; i tumori rilevati in pazienti fuori da questi programmi apparivano invece piuttosto grandi al primo riscontro e non di rado la malattia era in già estesa a organi diversi dal fegato.

Globalmente parlando, la maggioranza dei nostri pazienti si trovava ad uno stadio precoce al momento della diagnosi: nel 61% dei casi la lesione si presentava come singola. Nel 19% dei casi, tuttavia, la neoplasia si associava a trombosi vascolare macroscopica, invasione linfonodale o metastasi a distanza. Anche in questo caso, il CHC ha mostrato di possedere caratteristiche sia dell'HCC (incline all'invasività vascolare) che del CC (che più frequentemente invade i linfonodi), mostrando nel complesso un'aggressività intermedia fra i due. L'invasività diretta del tumore si esprimeva negli stadi più avanzati come coinvolgimento multiplo di entrambi i lobi epatici e carcinosi peritoneale, mentre le metastasi extraepatiche, rilevate in 3 casi, coinvolgevano le ossa e/o i polmoni.

I nostri pazienti hanno mostrato una sopravvivenza da 1 a 5 anni tra le più favorevoli riportati in letteratura nei CHC. Una possibile spiegazione può essere legata allo stadio relativamente precoce di malattia che caratterizzava la nostra casistica CHC (BCLC 0/A nel 61% dei casi) l'incidenza di unifocali (61%) e dalla bassa mediana di dimensioni dei

noduli (25 mm), oltre che da una funzione epatica sottostante relativamente ben conservata (CPT A nell'86% dei casi).

Come mostrato da altri studi sul CHC (in cirrosi e non), le dimensioni, la monofocalità, l'assenza di diffusione extraepatica e/o vascolare, lo stadio BCLC, una terapia "curativa", si sono dimostrati essere fortemente associati alla prognosi dei pazienti con CHC. Non appare superfluo ribadire, anche nel caso di questa neoplasia, come una diagnosi precoce sia cruciale per migliorare la sopravvivenza dei pazienti affetti da CHC: l'essere all'interno di un programma di screening e lo stadio molto precoce alla diagnosi (unifocale e ≤ 2 cm) sono infatti i due maggiori predittori prognostici indipendenti nello studio, con diretto effetto positivo sulla prognosi e così anche, di conseguenza, sulla possibilità di essere sottoposti a terapie radicali. Da sottolineare il dato della diagnosi precoce all'interno di un programma di screening. Dai dati raccolti si evince che il programma di sorveglianza nei pazienti cirrotici aiuta a identificare i noduli di CHC quando sono ancora di "piccole" dimensioni con un incremento di sopravvivenza di 17 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.

Il tumore combinato è stato considerato sino ad ora una forma ad elevata aggressività, con prognosi peggiore dell'HCC e simile a quella del colangiocarcinoma, pertanto anche le strategie terapeutiche applicate sono risultate tendenzialmente più radicali quando possibile, o non indicate, come nel caso del trapianto. Pochi dati però risultavano disponibili nei tumori insorti su cirrosi. Recentemente la casistica prodotta

da Sapisochin et al. [85] relativa a prognosi post trapianto di tumori epatici primitivi su cirrosi ha mostrato come pazienti trapiantati per HCC e CHC abbiano sopravvivenze simili e migliori di pazienti trapiantati per CC. In particolare risulta come il tumore in stadio precoce *early* (monofocale ed inferiore o uguale a 2 cm) sia caratterizzato da simili dati di sopravvivenza fino a 5 anni, sia che si trattasse di HCC, CC o CHC.

Con lo scopo di valutare la prognosi del tumore combinato abbiamo confrontato la nostra casistica con un gruppo di controllo di HCC su cirrosi, effettuando il "match" per numero, dimensioni, stadio alla diagnosi, età e genere, ed eziologia di cirrosi.

Nel presente studio non si sono osservate differenze statisticamente significative nella sopravvivenza globale e a un anno tra gruppo di studio CHC e gruppo di controllo di HCC su cirrosi (61% vs 71% e 80.6% vs 82.9% rispettivamente), sebbene si osservi un trend verso una migliore sopravvivenza nell'HCC a 3 e 5 anni (39% vs 59% e 21% vs 40%). In particolare le sopravvivenze si mantengono simili tra i due gruppi CHC e HCC anche quando stratificati i pazienti per stadio BCLC, dimensioni alla diagnosi e tipo di terapia.

Dato interessante è il fatto che, nell'ambito delle terapie curative, le terapie percutanee esitavano in una sopravvivenza inferiore nel gruppo CHC vs gruppo HCC (5.5 vs 8.7 years), così come anche nel caso della TACE, i pazienti con CHC presentavano un trend di sopravvivenza inferiore, sebbene non statisticamente significativo, rispetto ai pazienti con HCC analogamente trattati. La mancanza di significatività statistica potrebbe essere ascritta anche al ridotto numero totale di pazienti trattati con tali terapie.

Sebbene non vi fosse una significativa differenza tra lo stadio BCLC alla diagnosi tra HCC e CHC, né in termini di dimensioni o numerosità, il fatto che tra gli HCC il 49% fosse stato riscontrato durante il programma di sorveglianza vs il 72% dei CHC, può fare presupporre che comunque i noduli di CHC possano essere stati scoperti in uno stadio lievemente più precoce, o in pazienti comunque maggiormente controllati dal punto di

vista clinico. Questo, unitamente al dato di migliore funzione epatica nel gruppo di studio rispetto al gruppo di controllo, dimostrato dal Child Pugh (nel gruppo di studio l'86% aveva CPT stadio A, tra gli HCC il 74% era in CPT A) e dagli indici laboratoristici presi singolarmente, indica che nei pazienti nel gruppo di controllo HCC la sopravvivenza possa essere stata influenzata negativamente dalla peggiore funzione epatica sottostante quanto dall'aggressività del tumore. Si sottolinea che tuttavia risulta difficile pensare di poter effettuare un match completo anche per funzione epatica e dati di laboratorio, poiché si renderebbe necessaria la disponibilità di un numero molto alto di casi.

Tra i limiti dello studio si sottolinea anche il diverso tempo di follow-up dei pazienti, che risulta significativamente inferiore nei pazienti con CHC vs pazienti con HCC (1.58 vs 3.58 years $p=0.26$), dato che rende maggiormente discutibili i risultati relativi alla sopravvivenza a 3 e 5 anni.

Tali dati suggeriscono da un lato che il tumore combinato CHC insorto su cirrosi, a differenza della maggior parte dei dati disponibili sino ad ora in letteratura, possa avere una storia naturale simile a quella dell'HCC su cirrosi. Inoltre i dati suggeriscono che in presenza di noduli combinati CHC insorti su cirrosi, la strategia terapeutica debba essere per quanto possibile curativa o radicale, preferendo una strategia chirurgica alla percutanea, in relazione alla maggiore aggressività locale di queste neoplasie verosimilmente secondaria alla componente colangiocitaria.

2.5 - CONCLUSIONI

Il tumore combinato epato-colangiocellulare è stato descritto in letteratura come una neoplasia eterogenea, per quanto riguarda le sue peculiari caratteristiche anatomico-patologiche, clinico-epidemiologiche, prognostiche e radiologiche.

Poiché anche i marker tumorali epatici più comunemente utilizzati non sembrano essere indicatori affidabili, la diagnosi di questa malattia si deve necessariamente basare su criteri radiologici e anatomico-patologici. Peculiare in questo senso è la condizione del paziente cirrotico, ad elevato

rischio di sviluppare neoplasie primitive del fegato, per il quale sono stati formulati dei precisi criteri di sorveglianza e diagnostici basati su tecniche radiologiche con mezzo di contrasto. Tali criteri si fondano sul riconoscimento di particolari caratteri contrastografici che sfruttano l'anomala neo-vascolarizzazione tumorale dell'HCC e che, essendo considerati peculiari per questa neoplasia (che per di più ricopre da sola la grande maggioranza dei noduli maligni su cirrosi) ne permettono un affidabile riconoscimento.

Il nostro studio conferma come la possibilità da parte delle metodiche di imaging di identificare correttamente in prima istanza i rari tumori combinati rimanga piuttosto scarsa, non mostrando questi alcun pattern patognomonico né alla CEUS, né alla TC, né alla RM. In caso di tumore misto su cirrosi, TC e RM suggeriscono meno frequentemente di CEUS una falsa diagnosi di HCC, secondo gli usuali criteri vascolari. In considerazione del fatto che comunque sia TC che RM non si sono dimostrate esenti da errore (falsi positivi per HCC) e che la loro capacità di indicare la natura maligna della lesione con m.d.c., in assenza di wash-out rimane limitata, un approccio combinato mediante più metodiche potrebbe essere il più accurato. La CEUS, benché non possa essere riconosciuta come prima ed unica tecnica per fare diagnosi di forma mista, potrebbe inserirsi in questo contesto in virtù della sua accuratezza nell'identificare la malignità delle lesioni, in un approccio radiologico di tipo sequenziale. Una tale informazione potrebbe in particolare tornare utile in quei casi in cui un'indagine di imaging "pesante" (TC o RM) o una biopsia, rimangono inconcludenti nel porre diagnosi, non siano fattibili per indisponibilità o siano controindicate (essendo per di più quest'ultima evenienza piuttosto frequente nei pazienti con cirrosi). Il ruolo della CEUS rimane 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.

Dal punto di vista delle caratteristiche epidemiologico-prognostiche, la nostra casistica di CHC insorti su cirrosi era caratterizzata da un'alta prevalenza di epatiti virali croniche (soprattutto C) ed esotossiche, in una quota che riflette la distribuzione di questi fattori nella nostra area geografica. La scelta di includere solo pazienti affetti da cirrosi ha avuto verosimilmente un'influenza sulle caratteristiche demografiche globali registrate nel campione, con particolare riferimento all'alta età mediana d'insorgenza e alla netta predominanza del sesso maschile sul femminile. L'assenza di una sintomatologia specifica e la tardività con cui essa eventualmente si presenta, unite all'alta correlazione che esiste fra prognosi e dimensioni dei noduli (con cut-off piuttosto basso) rendono cruciale, nel CHC come nelle neoplasie primitive "pure" del fegato, una diagnosi precoce. La possibilità di un miglioramento della sopravvivenza rimane correlata, anche per questa neoplasia nella nostra casistica, all'applicabilità di terapie radicali quali chirurgia, terapie percutanee e trapianto, anche se emerge nella nostra casistica come la sopravvivenza dei pazienti trattati con terapie ablative percutanee sia inferiore nel gruppo CHC rispetto al gruppo HCC. Non emergono invece differenze significative di sopravvivenza tra i due gruppi nei pazienti trattati con resezione chirurgica.

Lo studio mostra come l'CHC su cirrosi mostri tassi di sopravvivenza simili a quelli dell'HCC su cirrosi, comportando una ridefinizione prognostico-terapeutica di questo raro tumore. Ulteriori studi sono necessari per stabilire se questa neoplasia necessiti di strategie terapeutiche proprie e peculiari per migliorare la qualità nella gestione e la sopravvivenza dei pazienti affetti.

Bibliografia

1. Altekruse, S.F., K.A. McGlynn, and M.E. Reichman, *Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005*. J Clin Oncol, 2009. **27**(9): p. 1485-91.
2. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
3. Bhagat, V., et al., *Combined hepatocholangiocarcinoma: case-series and review of literature*. Int J Gastrointest Cancer, 2006. **37**(1): p. 27-34.
4. Chantajitr, S., et al., *Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: clinical features and prognostic study in a Thai population*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2006. **13**(6): p. 537-42.
5. Chok, K.S., et al., *An update on long-term outcome of curative hepatic resection for hepatocholangiocarcinoma*. World J Surg, 2009. **33**(9): p. 1916-21.
6. Jarnagin, W.R., et al., *Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: demographic, clinical, and prognostic factors*. Cancer, 2002. **94**(7): p. 2040-6.
7. Liu, C.L., et al., *Hepatic resection for combined hepatocellular and cholangiocarcinoma*. Arch Surg, 2003. **138**(1): p. 86-90.
8. Panjala, C., et al., *The diagnostic conundrum and liver transplantation outcome for combined hepatocellular-cholangiocarcinoma*. Am J Transplant, 2010. **10**(5): p. 1263-7.
9. Park, H., et al., *Clinicopathological characteristics in combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: a single center study in Korea*. Yonsei Med J, 2011. **52**(5): p. 753-60.
10. Yin, X., et al., *Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: clinical features, treatment modalities, and prognosis*. Ann Surg Oncol, 2012. **19**(9): p. 2869-76.

11. Allen, R.A. and J.R. Lisa, *Combined liver cell and bile duct carcinoma*. Am J Pathol, 1949. **25**(4): p. 647-55.
12. Wang, J., F. Wang, and A. Kessinger, *Outcome of combined hepatocellular and cholangiocarcinoma of the liver*. J Oncol, 2010. **2010**.
13. Perz, J.F., et al., *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 529-38.
14. Lee, C.H., et al., *Viral hepatitis-associated intrahepatic cholangiocarcinoma shares common disease processes with hepatocellular carcinoma*. Br J Cancer, 2009. **100**(11): p. 1765-70.
15. Llovet, J.M., A. Burroughs, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2003. **362**(9399): p. 1907-17.
16. Kassahun, W.T. and J. Hauss, *Management of combined hepatocellular and cholangiocarcinoma*. Int J Clin Pract, 2008. **62**(8): p. 1271-8.
17. Bruix, J., M. Sherman, and D. American Association for the Study of Liver, *Management of hepatocellular carcinoma: an update*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 1020-2.
18. Beasley, R.P., et al., *Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan*. Lancet, 1981. **2**(8256): p. 1129-33.
19. de Franchis, R., et al., *The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers*. Ann Intern Med, 1993. **118**(3): p. 191-4.
20. Hsu, Y.S., et al., *Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B*. Hepatology, 2002. **35**(6): p. 1522-7.
21. Beasley, R.P., *Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma: epidemiologic considerations*. Hepatology, 1982. **2**: p. 21S–26S.
22. Tsukuma, H., et al., *Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease*. N Engl J Med, 1993. **328**(25): p. 1797-801.

23. Degos, F., et al., *Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death*. Gut, 2000. **47**(1): p. 131-6.
24. Sun, C.A., et al., *Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan*. Am J Epidemiol, 2003. **157**(8): p. 674-82.
25. Moriyama, M., et al., *Long-term outcome, with monitoring of platelet counts, in patients with chronic hepatitis C and liver cirrhosis after interferon therapy*. Intervirology, 2003. **46**(5): p. 296-307.
26. Masuzaki, R., et al., *Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography*. Hepatology, 2009. **49**(6): p. 1954-61.
27. Coelho-Little, M.E., et al., *Hepatitis C virus in alcoholic patients with and without clinically apparent liver disease*. Alcohol Clin Exp Res, 1995. **19**(5): p. 1173-6.
28. Hassan, M.M., et al., *Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus*. Hepatology, 2002. **36**(5): p. 1206-13.
29. Schoniger-Hekele, M., et al., *Hepatocellular carcinoma in Austria: aetiological and clinical characteristics at presentation*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2000. **12**(8): p. 941-8.
30. Adami, H.O., et al., *Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(20): p. 1472-7.
31. Blechacz, B. and G.J. Gores, *Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 308-21.
32. Donato, F., et al., *Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatitis C and B virus infection, alcohol intake, and hepatolithiasis: a case-control study in Italy*. Cancer Causes Control, 2001. **12**(10): p. 959-64.
33. Shaib, Y.H., et al., *Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study*. Gastroenterology, 2005. **128**(3): p. 620-6.
34. Pitt, H.A., et al., *Malignancies of the biliary tree*. Curr Probl Surg, 1995. **32**(1): p. 1-90.

35. Rosen, C.B., et al., *Cholangiocarcinoma complicating primary sclerosing cholangitis*. *Ann Surg*, 1991. **213**(1): p. 21-5.
36. Haswell-Elkins, M.R., et al., *Cross-sectional study of Opisthorchis viverrini infection and cholangiocarcinoma in communities within a high-risk area in northeast Thailand*. *Int J Cancer*, 1994. **59**(4): p. 505-9.
37. Aljiffry, M., M.J. Walsh, and M. Molinari, *Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(34): p. 4240-62.
38. Fowler, K.J., et al., *Combined Hepatocellular and Cholangiocarcinoma (Biphenotypic) Tumors: Imaging Features and Diagnostic Accuracy of Contrast-Enhanced CT and MRI*. *AJR Am J Roentgenol*, 2013. **201**(2): p. 332-9.
39. Kim, H., et al., *Primary liver carcinoma of intermediate (hepatocyte-cholangiocyte) phenotype*. *J Hepatol*, 2004. **40**(2): p. 298-304.
40. Wang, X.W., J.W. Grisham, and S.S. Thorgeirsson, *Molecular genetics of liver neoplasia*. *Cancer genetics*. 2011, New York: Springer. xiv, 399 p.
41. Seok, J.Y., et al., *A fibrous stromal component in hepatocellular carcinoma reveals a cholangiocarcinoma-like gene expression trait and epithelial-mesenchymal transition*. *Hepatology*, 2012. **55**(6): p. 1776-86.
42. Goodman, Z.D., et al., *Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. A histologic and immunohistochemical study*. *Cancer*, 1985. **55**(1): p. 124-35.
43. Theise, N.D., et al., *Hepatic 'stem cell' malignancies in adults: four cases*. *Histopathology*, 2003. **43**(3): p. 263-71.
44. Wells, H.G., *Primary carcinoma of the liver*. *Am J Sci.*, 1903(126): p. 403-417.
45. Aaltonen, L.A., et al., *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. *World Health Organization classification of tumours*. 2000, Lyon Oxford: IARC Press ; Oxford University Press (distributor. p. 314)
46. Bosman, F.T., World Health Organization., and International Agency for Research on Cancer., *WHO classification of tumours of the digestive*

- system. 4th ed. World Health Organization classification of tumours. 2010, Lyon: International Agency for Research on Cancer. 417 p.
47. Ikeda, H., et al., *Clinicopathologic significance of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma with stem cell subtype components with reference to the expression of putative stem cell markers*. Am J Clin Pathol, 2013. **140**(3): p. 329-40.
 48. Akiba, J., et al., *Clinicopathologic analysis of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma according to the latest WHO classification*. Am J Surg Pathol, 2013. **37**(4): p. 496-505.
 49. Tang, D., et al., *Clinical and pathological features of Allen's type C classification of resected combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: a comparative study with hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma*. J Gastrointest Surg, 2006. **10**(7): p. 987-98.
 50. Yano, H., et al., *A human combined hepatocellular and cholangiocarcinoma cell line (KMCH-2) that shows the features of hepatocellular carcinoma or cholangiocarcinoma under different growth conditions*. J Hepatol, 1996. **24**(4): p. 413-22.
 51. Zhang, F., et al., *Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence*. Histopathology, 2008. **52**(2): p. 224-32.
 52. Libbrecht, L., *Hepatic progenitor cells in human liver tumor development*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(39): p. 6261-5.
 53. Nault, J.C. and J. Zucman-Rossi, *Genetics of hepatobiliary carcinogenesis*. Semin Liver Dis, 2011. **31**(2): p. 173-87.
 54. Sell, S., *The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation*. Wound Repair Regen, 2001. **9**(6): p. 467-82.
 55. Petersen, B.E., *Hepatic "stem" cells: coming full circle*. Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(3): p. 590-600.
 56. Theise, N.D., et al., *Liver from bone marrow in humans*. Hepatology, 2000. **32**(1): p. 11-6.

57. Sell, S., *The role of determined stem-cells in the cellular lineage of hepatocellular carcinoma*. Int J Dev Biol, 1993. **37**(1): p. 189-201.
58. Roskams, T.A., et al., *Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers*. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1739-45.
59. Haruna, Y., et al., *Identification of bipotential progenitor cells in human liver development*. Hepatology, 1996. **23**(3): p. 476-81.
60. Itoyama, M., et al., *Expression of both hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma phenotypes in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma components in combined hepatocellular and cholangiocarcinoma*. Med Mol Morphol, 2012. **45**(1): p. 7-13.
61. Woo, H.G., et al., *Identification of a cholangiocarcinoma-like gene expression trait in hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3034-41.
62. Yu, X.H., et al., *Clinicopathological analysis of 14 patients with combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2011. **10**(6): p. 620-5.
63. Xu, X., et al., *DLK1 as a potential target against cancer stem/progenitor cells of hepatocellular carcinoma*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(3): p. 629-38.
64. Ebied, O., et al., *Hepatocellular-cholangiocarcinoma: helical computed tomography findings in 30 patients*. J Comput Assist Tomogr, 2003. **27**(2): p. 117-24.
65. Yeh, M.M., *Pathology of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma*. J Gastroenterol Hepatol, 2010. **25**(9): p. 1485-92.
66. Maeda, T., et al., *Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: proposed criteria according to cytokeratin expression and analysis of clinicopathologic features*. Hum Pathol, 1995. **26**(9): p. 956-64.
67. Yano, Y., et al., *Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: a clinicopathologic study of 26 resected cases*. Jpn J Clin Oncol, 2003. **33**(6): p. 283-7.
68. Ariizumi, S., et al., *Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma had poor outcomes after hepatectomy regardless of Allen and Lisa class or*

- the predominance of intrahepatic cholangiocarcinoma cells within the tumor. Ann Surg Oncol, 2012. 19(5): p. 1628-36.*
69. Cucchetti, A., et al., *Systematic review of surgical resection vs radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol, 2013. 19(26): p. 4106-18.*
 70. Stroescu, C., et al., *The diagnostic value of cytokeratins and carcinoembryonic antigen immunostaining in differentiating hepatocellular carcinomas from intrahepatic cholangiocarcinomas. J Gastrointestin Liver Dis, 2006. 15(1): p. 9-14.*
 71. Shin, C.I., et al., *Recurrence patterns of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma on enhanced computed tomography. J Comput Assist Tomogr, 2007. 31(1): p. 109-15.*
 72. Sanada, Y., et al., *A clinical study of 11 cases of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma Assessment of enhancement patterns on dynamic computed tomography before resection. Hepatol Res, 2005. 32(3): p. 185-95.*
 73. Choi, B.I., et al., *Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma of the liver: sonography, CT, angiography, and iodized-oil CT with pathologic correlation. Abdom Imaging, 1994. 19(1): p. 43-6.*
 74. Bruix, J., M. Sherman, and A.A.f.t.S.o.L.D. Practice Guidelines Committee, *Management of hepatocellular carcinoma. Hepatology, 2005. 42(5): p. 1208-36.*
 75. Gaiani, S., et al., *Usefulness of contrast-enhanced perfusional sonography in the assessment of hepatocellular carcinoma hypervascular at spiral computed tomography. J Hepatol, 2004. 41(3): p. 421-6.*
 76. Piscaglia, F., et al., *Characterization of focal liver lesions with contrast-enhanced ultrasound. Ultrasound Med Biol, 2010. 36(4): p. 531-50.*
 77. Vilana, R., et al., *Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma in cirrhosis patients may display a vascular pattern similar to hepatocellular carcinoma on contrast-enhanced ultrasound. Hepatology, 2010. 51(6): p. 2020-9.*

78. European Association For The Study Of The, L., R. European Organisation For, and C. Treatment Of, *EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2012. **56**(4): p. 908-43.
79. Loyer, E.M., et al., *Hepatocellular carcinoma and intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: enhancement patterns with quadruple phase helical CT--a comparative study*. Radiology, 1999. **212**(3): p. 866-75.
80. Choi, B.I., J.M. Lee, and J.K. Han, *Imaging of intrahepatic and hilar cholangiocarcinoma*. Abdom Imaging, 2004. **29**(5): p. 548-57.
81. Iavarone, M., et al., *Contrast enhanced CT-scan to diagnose intrahepatic cholangiocarcinoma in patients with cirrhosis*. J Hepatol, 2013. **58**(6): p. 1188-93.
82. Murakami, T., et al., *Contrast-enhanced MR imaging of intrahepatic cholangiocarcinoma: pathologic correlation study*. J Magn Reson Imaging, 1995. **5**(2): p. 165-70.
83. Miura, F., et al., *Hemodynamics of intrahepatic cholangiocarcinoma: evaluation with single-level dynamic CT during hepatic arteriography*. Abdom Imaging, 2004. **29**(4): p. 467-71.
84. Han, J.K., et al., *Cholangiocarcinoma: pictorial essay of CT and cholangiographic findings*. Radiographics, 2002. **22**(1): p. 173-87.
85. Sapisochin, G., et al., *Intrahepatic cholangiocarcinoma or Mixed hepatocellular-cholangiocarcinoma in patients undergoing liver transplantation*. Annals of Surgery, 2014. **259**(5): p. 944-52.
86. Aoki, K., et al., *Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: clinical features and computed tomographic findings*. Hepatology, 1993. **18**(5): p. 1090-5.
87. Nakamura, S., et al., *Surgical treatment of patients with mixed hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma*. Cancer, 1996. **78**(8): p. 1671-6.
88. Quaia, E., et al., *Evidence of diagnostic enhancement pattern in hepatocellular carcinoma nodules ≤ 2 cm according to the AASLD/EASL revised criteria*. Abdom Imaging, 2013.

89. de Campos, R.O., et al., *Combined hepatocellular carcinoma-cholangiocarcinoma: report of MR appearance in eleven patients.* J Magn Reson Imaging, 2012. **36**(5): p. 1139-47.
90. Danet, I.M., et al., *Spectrum of MRI appearances of untreated metastases of the liver.* AJR Am J Roentgenol, 2003. **181**(3): p. 809-17.
91. Nagaoka, S., et al., *Value of fusing PET plus CT images in hepatocellular carcinoma and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma patients with extrahepatic metastases: preliminary findings.* Liver Int, 2006. **26**(7): p. 781-8.
92. Torizuka, T., et al., *In vivo assessment of glucose metabolism in hepatocellular carcinoma with FDG-PET.* J Nucl Med, 1995. **36**(10): p. 1811-7.
93. Sugiyama, M., et al., *18F-FDG PET in the detection of extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma.* J Gastroenterol, 2004. **39**(10): p. 961-8.
94. Khan, M.A., et al., *Positron emission tomography scanning in the evaluation of hepatocellular carcinoma.* J Hepatol, 2000. **32**(5): p. 792-7.
95. Peng, S.Y., et al., *Expression and hypomethylation of alpha-fetoprotein gene in unicentric and multicentric human hepatocellular carcinomas.* Hepatology, 1993. **17**(1): p. 35-41.
96. Dusenbery, D., *Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. Cytologic findings in four cases.* Acta Cytol, 1997. **41**(3): p. 903-9.
97. Greene, F.L., American Joint Committee on Cancer., and American Cancer Society., *AJCC cancer staging handbook : from the AJCC cancer staging manual.* 6th ed. 2002, New York: Springer. xv, 469 p.
98. Edge, S.B., American Joint Committee on Cancer., and American Cancer Society., *AJCC cancer staging handbook : from the AJCC cancer staging manual.* 7th ed. 2010, New York: Springer. xix, 718 p.
99. Okuda, K., *Natural history of hepatocellular carcinoma including fibrolamellar and hepato-cholangiocarcinoma variants.* J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(4): p. 401-5.

100. Sasaki, A., et al., *Clinicopathologic study of mixed hepatocellular and cholangiocellular carcinoma: modes of spreading and choice of surgical treatment by reference to macroscopic type*. J Surg Oncol, 2001. **76**(1): p. 37-46.
101. Zuo, H.Q., et al., *Clinicopathological characteristics of 15 patients with combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007. **6**(2): p. 161-5.
102. Kim, K.H., et al., *Surgical treatments and prognoses of patients with combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(3): p. 623-9.
103. Uenishi, T., et al., *Surgery for mixed hepatocellular and cholangiocellular carcinoma*. Hepatogastroenterology, 2000. **47**(33): p. 832-4.
104. Portolani, N., et al., *Intrahepatic cholangiocarcinoma and combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: a Western experience*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(7): p. 1880-90.
105. Cormier, J.N., et al., *Management of hepatocellular carcinoma*. J Gastrointest Surg, 2006. **10**(5): p. 761-80.
106. Bruix, J., et al., *Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure*. Gastroenterology, 1996. **111**(4): p. 1018-22.
107. Malinchoc, M., et al., *A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts*. Hepatology, 2000. **31**(4): p. 864-71.
108. Teh, S.H., et al., *Risk factors for mortality after surgery in patients with cirrhosis*. Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1261-9.
109. Koh, K.C., et al., *Clinicopathologic features and prognosis of combined hepatocellular cholangiocarcinoma*. Am J Surg, 2005. **189**(1): p. 120-5.
110. Lee, W.S., et al., *Comparison of combined hepatocellular and cholangiocarcinoma with hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma*. Surg Today, 2006. **36**(10): p. 892-7.

111. Maganty, K., et al., *Combined hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: outcome after liver transplantation*. *Dig Dis Sci*, 2010. **55**(12): p. 3597-601.
112. Okada, S., *Local ablation therapy for hepatocellular carcinoma*. *Semin Liver Dis*, 1999. **19**(3): p. 323-8.
113. Lencioni, R.A., et al., *Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection*. *Radiology*, 2003. **228**(1): p. 235-40.
114. Llovet, J.M., et al., *Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2002. **359**(9319): p. 1734-9.
115. Lo, C.M., et al., *Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2002. **35**(5): p. 1164-71.
116. Kim, J.H., et al., *Nonresectable combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: analysis of the response and prognostic factors after transcatheter arterial chemoembolization*. *Radiology*, 2010. **255**(1): p. 270-7.
117. Ibrahim, S.M., et al., *Treatment of unresectable cholangiocarcinoma using yttrium-90 microspheres: results from a pilot study*. *Cancer*, 2008. **113**(8): p. 2119-28.
118. Jakobs, T.F., et al., *Hepatic yttrium-90 radioembolization of chemotherapy-refractory colorectal cancer liver metastases*. *J Vasc Interv Radiol*, 2008. **19**(8): p. 1187-95.
119. Lee, J.H., et al., *Long-term prognosis of combined hepatocellular and cholangiocarcinoma after curative resection comparison with hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma*. *J Clin Gastroenterol*, 2011. **45**(1): p. 69-75.
120. Mazzaferro, V., et al., *Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(11): p. 693-9.

121. Claudon, M., et al., *Guidelines and good clinical practice recommendations for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) in the liver - update 2012: A WFUMB-EFSUMB initiative in cooperation with representatives of AFSUMB, AIUM, ASUM, FLAUS and ICUS*. *Ultrasound Med Biol*, 2013. **39**(2): p. 187-210.
122. Barreiros, A.P., F. Piscaglia, and C.F. Dietrich, *Contrast enhanced ultrasound for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC): comments on AASLD guidelines*. *J Hepatol*, 2012. **57**(4): p. 930-2.
123. Fenoglio, L., et al., *Epidemiology, clinical-treatment patterns and outcome in 256 hepatocellular carcinoma cases*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(21): p. 3207-16.
124. Forner, A., et al., *Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2008. **47**(1): p. 97-104.
125. Iavarone, M., et al., *Diagnosis of hepatocellular carcinoma in cirrhosis by dynamic contrast imaging: the importance of tumor cell differentiation*. *Hepatology*, 2010. **52**(5): p. 1723-30.
126. Bolondi, L., et al., *Characterization of small nodules in cirrhosis by assessment of vascularity: the problem of hypovascular hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2005. **42**(1): p. 27-34.
127. Galassi, M., et al., *Patterns of appearance and risk of misdiagnosis of intrahepatic cholangiocarcinoma in cirrhosis at contrast enhanced ultrasound*. *Liver Int*, 2013. **33**(5): p. 771-9.
128. Golfieri, R., et al., *Which is the best MRI marker of malignancy for atypical cirrhotic nodules: hypointensity in hepatobiliary phase alone or combined with other features? Classification after Gd-EOB-DTPA administration*. *J Magn Reson Imaging*, 2012. **36**(3): p. 648-57.
129. Salvatore, V., A. Borghi, and F. Piscaglia, *Contrast-enhanced ultrasound for liver imaging: recent advances*. *Curr Pharm Des*, 2012. **18**(15): p. 2236-52.
130. Burns, P.N. and S.R. Wilson, *Focal liver masses: enhancement patterns on contrast-enhanced images--concordance of US scans with CT scans and MR images*. *Radiology*, 2007. **242**(1): p. 162-74.

131. D'Onofrio, M., et al., *Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma (IPCC): comparison between perfusion ultrasound and CT imaging.* Radiol Med, 2008. **113**(1): p. 76-86.
132. Chen LD, et al. *Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma: differential diagnosis with contrast-enhanced ultrasound.* Eur Radiol 2010;**20**:743-753.