

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE
GENERALI E DEI SERVIZI**

Ciclo XXX

Curriculum in Ultrasonologia in Medicina Umana e Veterinaria

Settore concorsuale 06/D4

Settore scientifico disciplinare SSD MED/12

**Studio prospettico monocentrico per la
valutazione del ruolo dell'elastometria epato-
splenica come predittore di insorgenza di
epatocarcinoma in pazienti con cirrosi epatica.**

Presentata da

Dott. GIOVANNI MARASCO

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. FABIO PISCAGLIA

Supervisore

Chiar.mo Prof. DAVIDE FESTI

Esame finale anno 2018

INDICE

ABSTRACTS	3
PRIMA PARTE	
Il Carcinoma Epatocellulare:	
• Epidemiologia	5
• Fattori di rischio	9
• Screening e sorveglianza	14
• Diagnosi	18
• Stadiazione	20
• Trattamento	25
L'elastometria epatica e splenica	33
Tabelle e figure	39
SECONDA PARTE	
• Introduzione e razionale dello studio	44
• Obiettivo dello studio	44
• Materiali e metodi	45
• Risultati	50
• Discussione	52
• Conclusioni	59
• Tabelle e figure	60
BIBLIOGRAFIA	67

ABSTRACT

Background

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a further complication of portal hypertension (PH) in the natural history of liver cirrhosis. Recent experimental data correlate the hepatic venous pressure gradient (HVPG) with the risk of HCC, independently from the degree of cirrhosis. HVPG is a method both invasive and risky due to its invasiveness and it is not available in all liver units. Recently, liver stiffness measurement (LSM) and spleen stiffness measurement (SSM), using transient elastography (TE, Fibroscan®, Paris, France) have been proposed as non-invasive tools for the evaluation of PH and of the natural history of patients with liver cirrhosis. However, the correlation reported in literature with clinical significant PH was better for SSM than LSM. To date, only data reporting the prognostic role of LSM for HCC development are available, while there are no data for SSM.

Aim

To evaluate the role of LSM and SSM as predictors of the onset of HCC in patients with liver cirrhosis.

Methods

We consecutively and prospectively enrolled patients with chronic advanced compensated liver disease who referred to our Department without prior diagnosis of HCC between 2012 and 2016. We followed up patients for at least 12 months or until the study ending. We performed a univariate and multivariate analysis in order to evaluate the predictive role of laboratory and instrumental data, including LSM/SSM for the development of HCC.

Results

We prospectively enrolled 140 patients of whom 92 patients were suitable for the study. Among them, 21 patients developed HCC. Our results deriving from multivariate analysis showed that age (HR 1.076, $p = 0.018$, CI 1.026-1.128) and SSM (HR 1.035, $p = 0.037$, CI 1.002-1.068) are independent predictors of development of HCC.

Conclusions

In our population, the age and the spleen stiffness measurement (SSM) of the patient are the only predictors for the development of HCC, the latter correlated to the degree of severity of liver disease and portal hypertension, both involved in carcinogenesis.

ABSTRACT

Introduzione

Nell'ambito della storia naturale della cirrosi epatica, il carcinoma epatocellulare (CE) è un'ulteriore complicazione dell'ipertensione portale (PH). Recenti dati sperimentali correlano valori elevati di misurazione del gradiente pressorio venoso epatico (HVPG) con un aumentato rischio di sviluppare CE, indipendentemente dalla gravità della cirrosi. Sebbene sia accurata, la misurazione del gradiente di pressione è un metodo invasivo, con rischi legati alla sua invasività e non è disponibile in tutte le unità epatologiche. Recentemente, la misurazione della rigidità (stiffness) del fegato (LSM) e della milza (SSM), valutata utilizzando mediante l'utilizzo dell'elastografia transiente (TE, Fibroscan®, Parigi, Francia) sono state proposte come strumento non invasivo per la valutazione dell'ipertensione del portale e della storia naturale dei pazienti con cirrosi epatica. È stato inoltre dimostrato come la correlazione con l'ipertensione portale clinicamente significativa sia maggiore utilizzando l'SSM piuttosto che la LSM. Attualmente vi sono solo dati riguardanti il ruolo prognostico di LSM nei confronti dello sviluppo di CE, mentre non vi sono dati riguardanti il ruolo prognostico della SSM.

Scopo dello studio

Scopo dello studio è la valutazione del ruolo dell'elastometria epato-splenica come predittore di insorgenza di epatocarcinoma in pazienti con cirrosi epatica

Metodi

Abbiamo arruolato consecutivamente e prospettivamente tra il 2012 e il 2016 pazienti con malattia epatica compensata avanzata cronica che afferivano presso il nostro Dipartimento e senza pregressa diagnosi di CE. Abbiamo seguito i pazienti per almeno 12 mesi o fino alla chiusura dello studio. Abbiamo eseguito un'analisi uni- e multivariata al fine di valutare il ruolo predittivo dei dati di laboratorio e strumentali, inclusi LSM/SSM per lo sviluppo di CE.

Risultati

Abbiamo arruolato in modo prospettico 140 pazienti, di cui 92 pazienti sono stati valutati per lo studio; tra questi 21 pazienti hanno sviluppato CE. I nostri risultati derivanti dall'analisi multivariata hanno mostrato che l'età (HR 1.076, $p = 0.018$, CI

1.026-1.128) e la misurazione della rigidità della milza (HR 1.035, $p = 0.037$, CI 1.002-1.068) sono predittori indipendenti di sviluppo di CE.

Conclusioni

Nella nostra popolazione l'età e la misurazione della rigidità della milza (SSM) del paziente sono gli unici predittori dello sviluppo di CE, essendo quest'ultima direttamente correlata al grado di malattia epatica e ipertensione portale, entrambi coinvolti nella carcinogenesi.

PRIMA PARTE

IL CARCINOMA EPATOCELLULARE

EPIDEMIOLOGIA

Il carcinoma epatocellulare (CE) è la sesta neoplasia più frequente al mondo e rappresenta attualmente la terza causa più frequente di morte per cancro nel mondo [1].

Il sesso maschile è coinvolto più frequentemente di quello femminile, con un rapporto maggiore di 2:1[2] e tale differenza risulta più evidente nelle aree a più elevata incidenza [3].

Sebbene non sia del tutto chiara, l'associazione del CE con il sesso sembra essere legata allo stato di portatore di virus epatitico, l'esposizione a tossine, l'effetto trofico degli androgeni [4] e al potenziale effetto protettivo degli estrogeni mediato tramite l'inibizione dell'interleuchina 6 [5]. L'incidenza del CE non è ugualmente distribuita nel mondo: aree ad elevata incidenza sono rappresentate dall'Africa sub-Sahariana e dall'Asia dell'Est e del Sud[6]; la Cina in particolare conta approssimativamente il 50 % di tutti i casi di CE al mondo [7]. Per contro il nord Europa e la zona centro-sud Asiatica hanno una bassa incidenza di CE [8]; aree ad incidenza intermedia sono il Sud e l'Est dell'Europa e il Nord America [9] (Figura 1).

L'incidenza del CE in Europa, così come nelle altre aree geografiche, è strettamente legata ai cambiamenti di prevalenza dell'epatite B e C. In nord Europa, la ridotta prevalenza dell'epatite B e C nei giovani, l'introduzione del programma di vaccinazione per l'epatite B e il ridotto consumo di alcol nelle ultime decadi, spiega la riduzione di incidenza di CE in queste regioni; per contro l'aumentata prevalenza di epatite C e di alcol in nord e centro Europa giustifica l'andamento sfavorevole in queste aree [10][11]. Nelle ultime decadi a questi fattori si è aggiunta la crescente presenza di soggetti con disordini metabolici, definiti come NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), che contribuiscono numericamente allo sviluppo di CE più di ogni altro fattore di rischio (infezione da HCV inclusa) [12].

Negli ultimi venti anni la mortalità per CE si è ridotta nelle aree ad alta incidenza dell'Europa meridionale, mentre è aumentata in aree a bassa mortalità come il nord e il centro Europa; di conseguenza il tasso di mortalità in Europa per CE risulta più uniforme negli ultimi anni. Il trend di mortalità in USA e in Australia è simile a quello osservato in centro e in nord Europa[13].

L'augmentata mortalità per CE in USA è stata attribuita non solo al diffondersi dell'epatite C negli anni 60 per l'uso di droghe endovenose [14] ma soprattutto è legata alla diffusione dell'obesità e della sindrome metabolica [15].

L'incidenza di CE in Cina risulta molto alta a causa dell'alta prevalenza di infezioni da HBV, così come a Taiwan, dove il programma di vaccinazione di massa per l'epatopatia HBV ha condotto a una riduzione del 90% dei casi giovanili di CE e ad una riduzione anche nella popolazione adulta. Il trattamento dell'epatopatia HBV con analoghi ha definitivamente ridotto ma non abolito il rischio di CE nei pazienti trattati, senza tuttavia un evidente impatto sul carico di CE nella popolazione generale[16]. Non sono ancora disponibili dati definitivi su eventuali modifiche di incidenza di CE a seguito di terapia eradicante dell'epatopatia HCV relata con nuovi antivirali DAA (Direct Antiviral Agents)[17–20][21–23].

FATTORI DI RISCHIO

Il CE si sviluppa usualmente in pazienti con epatopatia cronica e la cirrosi epatica è il più importante fattore di rischio per lo sviluppo del CE, indipendentemente dalla sua eziologia, tanto che il CE è riconosciuto in questi pazienti come una delle maggiori cause di morte [24]. Un terzo dei pazienti cirrotici sviluppa CE durante la sua vita [24]. Studi con follow-up a lungo termine in pazienti cirrotici hanno evidenziato un'incidenza di CE annuale dell'1-8% in pazienti HBV positivi e del 3-8% in pazienti HCV positivi [25]. I fattori di rischio dominanti per il CE variano tra aree a bassa ed alta incidenza: in Asia e Africa, l'epatopatia cronica B (ECB) e l'esposizione all'aflatossina B1 rappresentano i principali fattori di rischio mentre l'epatopatia cronica C (ECC), l'eccessivo consumo di alcol e la sindrome metabolica giocano un ruolo importante nelle aree con bassa incidenza di CE. Tra le cause di CE legate ai virus, l'ECB ne è responsabile per un 75-80%, mentre l'ECC per 10-20%[26].

Studi recenti hanno evidenziato un'augmentata incidenza di CE in pazienti con ipertensione portale clinicamente significativa[27–29], valutata mediante l'utilizzo della misurazione del gradiente pressorio venoso epatico (HVPG) e definita tale per valori di HVPG>10 mmHg. Parallelamente è stata evidenziata un'incidenza crescente di CE associata ad aumentati valori di elastometria epatica [30].

Epatite da virus C (HCV)

L'epatopatia cronica HCV-relata è una delle cause principali di cirrosi e rappresenta l'indicazione più comune al trapianto di fegato nei paesi occidentali (nord e sud America, Europa e Giappone) [31]. L'epatite C è responsabile di almeno un terzo dei casi di CE negli Stati Uniti [32]. In pazienti HCV positivi il tasso di evoluzione a cirrosi varia dal 12% al 35% [33].

Fattori ambientali come l'età maggiore di 40 anni al momento dell'infezione, un introito alcolico superiore a 40-50 gr al giorno, il sesso maschile, l'obesità, livelli aumentati di transaminasi e infezioni con HBV o HIV sembrano avere un impatto maggiore rispetto al genotipo o alla carica virale nella progressione a cirrosi [34].

Dal 1994 l'HCV è stato identificato cancerogeno per l'uomo. L'aumentato rischio di sviluppare CE nei pazienti affetti da HCV deriva dallo sviluppo di fibrosi epatica e quindi di cirrosi, come risultato di un processo di infiammazione cronica che determina una distorsione dell'architettura epatica con successivo danno delle funzioni cellulari e al microcircolo del fegato. Contrariamente ad altri virus epatotropi come quello dell'HBV, l'HCV non è capace di integrarsi nel genoma dell'ospite; tuttavia le proteine del virus, come la proteina del core, evocano delle risposte nell'ospite che sono implicate nell'apoptosi, nei segnali di trasduzione, nella formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), nell'attivazione della trascrizione e nell'immuno-regolazione attraverso la stimolazione dell'interleuchina 1 (IL-1), IL-6 e del fattore di necrosi tumorale α (TNF α) che contribuiscono alla trasformazione maligna delle cellule [35]. Gli epatociti poco differenziati sono più a rischio di proliferare e diventare noduli displastici e CE [36]. A supporto di questa ipotesi carcinogenetica vi sono dati che correlano il livello di infiammazione e necrosi al CE HCV-indotto [37,38]. La maggior gravità dell'infiammazione epatica è stata inoltre correlata ad una prognosi peggiore nei pazienti con CE [39].

I nuovi trattamenti per il virus C sono in grado di eradicare il virus con risposta virologica sostenuta (SVR) e assenza di HCV RNA rilevabile dopo il trattamento. I dati relativi al raggiungimento della SVR e dei suoi benefici, quali la riduzione di morte per tutte le cause [40] incluse quelle legate al CE e alla malattia di fegato [41], sono oggetto di dibattito poiché vi sono risultati contrastanti in letteratura dal momento che alcuni autori hanno riportato un diminuito rischio di CE nei pazienti che raggiungevano l'SVR [42,43] se confrontati con i non-SVR, e che il rischio residuo di sviluppare CE era legato alla presenza di cirrosi pre-terapia [42].

Epatite da virus B (HBV)

L'HBV è un fattore di rischio chiave nello sviluppo del CE [44]. L'associazione tra HBV e CE è stata dimostrata in diversi studi [45–50]. Nelle regioni ad alta incidenza di CE circa il 70% delle infezioni da HBV sono acquisite nel periodo perinatale o nella prima infanzia. L'HBV DNA si integra nel genoma del tessuto epatico di quasi tutti i CE che sono portatori di HBV[51].

Vista la trasmissione perinatale e nella prima infanzia, circa il 20% dei pazienti HBV+ sviluppa CE su un fegato non cirrotico a causa sia della lunga storia di esposizione al virus, che porta ad un'età di insorgenza più bassa, sia per l'effetto oncogeno diretto del virus. Tra i portatori cronici di HBV, il rischio di sviluppare il CE varia sulla base di diversi fattori: i livelli sierici di HBV (la presenza di una carica virale superiore a 10^5 conferisce un rischio variabile da 2.5 a 3 volte superiore di sviluppare un CE in un periodo di follow-up di 8-10 anni, rispetto ai soggetti con una bassa carica virale) [44][52]; la positività per HBeAg, che indica replicazione virale attiva, sembra essere correlata con lo sviluppo di CE [53]; il genotipo C dell'HBV, più diffuso in Asia, rappresenta un fattore che può incidere sull'insorgenza del CE [54], inoltre in studi di controllo sul genotipo, la presenza di una doppia mutazione nel promoter del core basale del genoma dell'HBV rappresenta un fattore di rischio indipendente legato allo sviluppo di CE.

Vi è inoltre una correlazione tra la HBsAg positività e il sesso maschile per aumentato rischio di sviluppo di CE [55,56], così come per l'associazione con altre infezioni da virus epatotropi come HCV[57,58] e HDV [59], l'età avanzata, l'uso abituale di alcol e sigarette. Il rischio di sviluppare un CE nella vita di un portatore di infezione da HBV è variabile dal 10 al 25% [60]. Questi dati comportano importanti implicazioni sulla sorveglianza per CE dei pazienti con HBV, che attualmente è rivolta soprattutto ai pazienti cirrotici: i portatori cronici di HBV (cirrotici e non) presentano un rischio 100 volte maggiore di sviluppare CE rispetto agli HBsAg negativi [49,50,53,55,56]. In aggiunta, è stato evidenziato che i pazienti con guarigione sierologica restano a rischio di sviluppo di CE [61], soprattutto se con età maggiore di 50 anni [62].

La prevenzione dell'infezione cronica HBV mediante la vaccinazione ha ridotto drasticamente il rischio di CE, sebbene il vaccino possa risultare inefficace in un 5% di casi, per fattori legati al vaccino stesso (sito di iniezione, condizioni di stoccaggio) e all'ospite (età, obesità, comorbidità preesistenti)[63]. La diffusione della vaccinazione

neonatale introdotta negli anni 80 nella maggior parte dei paesi dell'Asia dell'est, produrrà un calo di incidenza dei casi di CE legati all'HBV dal 70% all'85%[63].

Le revisioni sistematiche disponibili riguardanti il trattamento con interferone o nucleosidi/nucleotidi suggeriscono che il rischio relativo di CE è ridotto approssimativamente tra il 50 e il 60 per cento nei pazienti trattati [64–67].

Aflatossina

L'aflatossina è una micotossina prodotta dalle muffe della specie *Aspergillus* ed è un contaminante del granoturco, degli arachidi, dei legumi e delle noci che si riproduce soprattutto negli ambienti umidi ed è un noto cancerogeno epatico. L'aflatossina B1 (AFB₁), la più potente tra le aflatossine, che deriva dai funghi *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, è stata classificata dall'IARC come cancerogeno umano di gruppo 1[68]. Le regioni al mondo con i più alti livelli di AFB₁ sono l'Africa sub-Sahariana, il sud-est asiatico e la Cina; all'interno di queste aree, i livelli più alti si riscontrano nelle aree rurali rispetto a quelle urbane[69], nei maschi rispetto alle femmine e nelle persone con infezione cronica da HBV[70]. C'è un'associazione sinergica tra l' AFB₁, l'HBV, la mutazione TP53 nell'aumentare il rischio di CE [71]. Rispetto a persone che non hanno fattori di rischio, il rischio per CE è quattro volte maggiore tra le persone che hanno livelli elevati di AFB₁, 7 volte tra i portatori cronici di HBV e 60 volte tra quelli che presentano entrambi questi fattori di rischio [72].

Esiste un ruolo sinergico anche tra AFB₁ e HCV [73]. Tuttavia l'esposizione ad AFB₁ è più comune nelle aree dove è più frequente l'infezione da HBV, pertanto l'eradicazione dell' AFB₁ gioca un ruolo importante nel ridurre l'incidenza di CE e nelle aree in cui i programmi di eradicazione sono stati implementati come la Cina, è stata documentata una notevole riduzione del tasso di CE [74].

Alcol

L'IARC ha suggerito nel 1988 una relazione causale tra il consumo di alcol e lo sviluppo di tumore del fegato, classificandolo pertanto come cancerogeno per l'uomo [75].

L'associazione tra consumo di alcol e sviluppo di CE è dimostrata da numerosi di studi con un odds ratio (OR) compreso tra 2.4 e 7 [76,77]. La relazione tra etanolo e CE potrebbe essere dovuta sia ad un effetto tossico diretto, sia ad effetti indiretti giacché l'alcol rappresenta un importante fattore di rischio per lo sviluppo di cirrosi epatica [46]. Inoltre è stato recentemente dimostrato che in pazienti HCV, un consumo giornaliero di

alcol maggiore a 50 gr è uno dei 3 fattori indipendenti associati ad un aumentato tasso di progressione della fibrosi [78].

L'alcol ha infatti un effetto sinergico in termini di rischio per CE in presenza di una preesistente malattia cronica di fegato causata da HBV, HCV, steatosi epatica, fumo, obesità [76,77]. Sebbene vi sia molta letteratura a riguardo, le dosi-soglia e la durata di utilizzo di alcol che pongono il paziente a rischio di CE restano non chiare. Alcuni autori riportano che un consumo cronico di alcol in dosi maggiori di 80 gr /die per più di 10 anni si associa ad un rischio aumentato di CE pari a 5 [76]. Il rischio è dose-dipendente, infatti, un introito di 60 gr/die per 25 anni aumenta il rischio di CE di circa 6 volte [79]. Una recente metanalisi che ha analizzato 19 studi ha stimato che esiste un rischio aumentato del 16% di sviluppare un CE tra i consumatori di 3 o più drink al giorno e del 22% tra i consumatori di 6 o più drink al giorno[80]. Negli ultimi 50 anni il consumo pro capite di alcol si è ridotto in Europa, Nord America e in Africa; nello stesso periodo i consumi sono aumentati nel Sud-Est asiatico e nei Paesi del Pacifico Occidentale. Dato che l'eccessivo consumo di alcol è stato storicamente un importante fattore di rischio nelle aree a bassa incidenza di CE, il calo dei consumi suggerisce un effetto favorevole sul tasso di incidenza di CE in queste regioni.

Una recente metanalisi ha evidenziato come l'interruzione dell'introduzione di alcol si associa ad una riduzione del rischio di CE dal 6% al 7% all'anno rispetto ai bevitori attivi. Affinché il rischio di CE torni analogo ai quello dei non bevitori è stato inoltre stimato un periodo di 23 anni, indipendentemente dalla presenza di una sottostante cirrosi epatica[81].

Obesità, diabete mellito e sindrome metabolica

L'obesità, il diabete mellito di tipo 2 e la sindrome metabolica con la loro manifestazione epatica nota come non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) e la sua forma più severa di non-alcoholic steatohepatitis (NASH) sono fattori di rischio per CE[82–86]. Studi condotti su ciascuna di queste condizioni hanno evidenziato che essi sono significativamente legati allo sviluppo di CE[87], anche in assenza di cirrosi [86].

Molti studi osservazionali hanno collegato l'eccesso di grasso corporeo con un incrementato rischio di CE[88–94]; viceversa, un gruppo di lavoro della IARC ha evidenziato come l'assenza di eccessivo grasso corporeo è correlata ad un ridotto rischio di CE [92]. L'obesità correla inoltre con una aumentata mortalità nei pazienti con CE. In ampio studio prospettico di 16 anni condotto negli Stati Uniti, è stata evidenziata una

mortalità per CE 5 volte più alta negli uomini con BMI tra 35 e 40 rispetto a quelli con normale BMI [87]. Questi studi sono estremamente importanti se si considera l'aumento epidemico dell'obesità, soprattutto negli Stati Uniti dove di recente è stato registrato un aumento significativo di incidenza del CE.

La NAFLD è la manifestazione epatica della sindrome metabolica che comprende ipertensione, insulino-resistenza, obesità centrale e dislipidemia. Più del 90% degli obesi ha una malattia di fegato cronica legata al fegato grasso e il grado di steato-epatite correla con l'aumento del body mass index (BMI)[95]. La NASH e la NAFLD possono progredire a cirrosi e CE: è stata infatti evidenziata un'associazione tra sindrome metabolica e CE (HR 2.13; 95% intervallo di confidenza, CI 1.96-2.31)[96]. Vi sono pochi dati relativi alla storia naturale e alla prognosi della NASH. Uno studio di coorte giapponese con 137 pazienti con diagnosi istologica di NASH in stadio avanzato di fibrosi, ha riscontrato un'incidenza cumulativa di CE a 5 anni pari al 7.6%[97]. In uno studio su una popolazione più ampia si evidenziava un tasso di incidenza cumulativa annua di CE pari a 2.6% in pazienti con cirrosi NASH-relata[98].

Anche l'incidenza del diabete, specie nei Paesi Industrializzati è in aumento molto più rapidamente rispetto ai Paesi in via di sviluppo[99]: il 6.4% dell'intera popolazione mondiale ha il diabete e la prevalenza è destinata ad aumentare del 69% nei Paesi Industrializzati e del 20% in quelli in via di sviluppo a partire dal 2030[99]. Più del 70% di pazienti con diabete ha una malattia di fegato[95]. Benché esistano molti studi controversi, l'associazione tra diabete mellito e CE è forte. In uno studio longitudinale[7] comprendente 173.643 pazienti con diabete e 650.620 senza, è stato evidenziato che il diabete è associato allo sviluppo di NAFLD con un HR pari a 1.98 (95% CI 1.88-2.09) e allo sviluppo di CE con un HR di 2.16 (95%CI 1.86-2.52). Una recente metanalisi comprendente 25 studi di coorte ha esaminato la relazione tra diabete mellito e CE: gli autori riportano un'aumentata incidenza di CE nei soggetti diabetici (HR 2.01, 95%CI 1.61-2.51) rispetto ai soggetti non diabetici; il diabete risulta inoltre associato alla mortalità per CE (HR1.56, 95% 1.30-1.87). Gli autori concludono pertanto che il diabete si configura come fattore di rischio indipendente per la progressione della malattia cronica di fegato e per lo sviluppo di CE[100].

Un recente studio inglese ha smentito il ruolo protettivo della metformina per lo sviluppo di CE [101]. Al contrario, il trattamento con statine sembra essere protettivo per lo sviluppo di CE, come evidenziato sia da studi osservazionali [102–104], sia da una recente metanalisi [105] che ha incluso dieci studi per un totale di 1.6 milioni di

pazienti confrontati con un gruppo di pazienti che non usava statine, concludendo che i pazienti in trattamento con statine avevano una riduzione del 37% della probabilità di sviluppare CE [105]. Anche riguardo i fattori dietetici non vi sono dati definitivi riguardanti il rischio di sviluppo di CE: il consumo di carne rossa e di alimenti ricchi di grassi saturi sono associati con un aumentato rischio [106,107]; il dato è stato successivamente smentito da una meta-analisi[108]. Altri dati interessanti riguardano i fattori dietetici protettivi e quindi con ridotto rischio di sviluppo di CE come il consumo di carni bianche [106–108], di pesce e omega-3 e di verdure [108–113], così come soggetti con dieta ricca di vitamina E[114].

Patologie ereditarie

È stato dimostrato che pazienti con cirrosi epatica da Emocromatosi sviluppano CE nel 45% dei casi [115]. Il carcinoma epatocellulare è stato inoltre riscontrato come complicazione della cirrosi epatica in pazienti con deficit di alfa1-antitripsina [116], con malattia di Wilson [117] e con Porfiria intermittente acuta (questi ultimi anche senza evidenza di cirrosi epatica) [118].

Fumo

L'associazione tra fumo di sigaretta e CE è inconsistente in quanto esistono pochi studi al riguardo, alcuni dei quali evidenziano un'associazione positiva [119–121] e altri che non trovano alcuna associazione [121–127]. Tra gli studi che riportano un'associazione positiva, molti hanno evidenziato un ruolo del fumo di sigaretta solo nei pazienti che al tempo stesso presentavano un'infezione da HBV o HCV[128].

SCREENING E SORVEGLIANZA

La sorveglianza consiste nella periodica applicazione di test diagnostici in soggetti a rischio per CE al fine di ridurre la mortalità relata alla malattia. I soggetti a rischio di CE sono facilmente identificabili per la presenza di una sottostante epatite virale o altre malattie epatiche [129], tanto che secondi i dati disponibili in letteratura, è possibile affermare che il CE si sviluppa nel 90% dei casi in soggetti con cirrosi epatica [6]. Tuttavia non tutti i pazienti cirrotici presentano lo stesso rischio di sviluppare un tumore al fegato. È pertanto fondamentale stratificare la popolazione in base al rischio nelle diverse eziologie e fattori di rischio. Inoltre, il rischio di sviluppo di un CE è influenzato

anche da altri fattori quali l'età avanzata, il sesso maschile, l'attività necro-infiammatoria del fegato, il grado di avanzamento della malattia di fegato. Nei cirrotici inoltre è evidente una prevalenza di CE nel sesso maschile, indipendentemente da eziologia, etnia e area geografica e questo si giustifica non solo alla luce dell'incidenza più elevata dell'epatiti e delle malattie legate all'alcol nel sesso maschile ma può dipendere anche da fattori ormonali. Inoltre alcuni fattori genetici legati al singolo soggetto possono giocare un ruolo nello sviluppo di CE [130].

L'identificazione di una popolazione ad alto rischio per lo sviluppo di CE è quindi l'obiettivo primario e lo screening è raccomandato in tutti i pazienti con un rischio annuale di sviluppo di CE maggiore di 1.5%-2%. Secondo la definizione corrente, lo screening per il CE è considerato efficace se aumenta l'aspettativa di vita di almeno 3 mesi [131].

Tutte le attuali linee guida, comprese quelle della società europea (European Association for the Study of the Liver, EASL) raccomandano lo screening in tutti i pazienti cirrotici, indipendentemente dall'eziologia della malattia; fanno eccezione le linee guida dell'Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) che limitano lo screening alle forme di cirrosi virus-relate.

Un'alta incidenza di CE è stata osservata in pazienti con epatopatia cronica HBV anche in assenza di cirrosi; di conseguenza lo screening di questo sottogruppo di pazienti dipende dall'incidenza dell'HBV nelle diverse regioni. Le linee guida della società americana (American Association for the study of the Liver Disease, AASLD) raccomandano lo screening in tutti i maschi asiatici con più di 40 anni e nelle donne con più di 50 anni, in tutti i pazienti con una storia familiare di CE e negli Afro-Americani con più di 20 anni. Le linee guida dell'EASL raccomandano lo screening nei pazienti con epatopatia cronica HBV e in soggetti con familiarità per CE. Nonostante l'avvento delle nuove terapie antivirali per HCV, il rischio di CE in questi pazienti rimane legato alla cirrosi epatica, quindi è essenziale in questi pazienti continuare lo screening specialmente nei pazienti anziani, negli obesi e negli stadi avanzati di malattia [132].

Poiché non ci sono dati riguardanti il rischio di sviluppo di CE nei soggetti con sindrome metabolica o NASH, anche questa categoria di pazienti dovrebbe essere sottoposta a sorveglianza [85].

Inoltre, talvolta è possibile escludere pazienti dai programmi di sorveglianza, come nel caso dei pazienti con cirrosi avanzata di grado Child-Pugh C, poiché non sottoponibili a trattamenti curativi [133,134], ad eccezione che per i pazienti in attesa di trapianto

epatico, indipendentemente dallo stato funzionale del fegato, con l'obiettivo di ridefinire la loro necessità di trapianto epatico [2,135]

L'efficacia del programma di sorveglianza per il CE nella pratica clinica dipende dall'aderenza allo screening e dalla sensibilità delle metodiche utilizzate per la diagnosi precoce di CE.

I test utilizzati per la sorveglianza per CE sono di tipo sierologico e di imaging. Il test di imaging di primo livello utilizzato per la sorveglianza è l'ecografia, la quale ha una sensibilità fino all'89% e una specificità del 90% per la diagnosi di CE [136,137]; la sensibilità cala al 63% in caso di CE precoci [138]. Le difficoltà legate alla diagnosi di CE sono dovute soprattutto alla presenza di cirrosi epatica, che con la presenza di setti fibrosi e noduli rigenerativi rende difficile l'interpretazione delle immagini per l'identificazione di tumori piccoli. La sensibilità dell'ecografia è strettamente operatore-dipendente e pertanto si raccomanda di eseguirla in centri di riferimento [139].

L'utilizzo della Tomografia assiale computerizzata (TC) con mezzo di contrasto e della risonanza magnetica (RM) con studio dinamico per la sorveglianza non è supportata da dati in letteratura, a cui si aggiunge inoltre la presenza di falsi positivi, i rischi legati alle radiazioni e gli alti costi [140].

Tra i test sierologici utilizzati per la diagnosi precoce di CE il più utilizzato è l'alfa-fetoproteina (AFP), il quale riesce ad individuare la popolazione a rischio [46]. Sebbene gli studi a supporto di questo marker siano focalizzati sulla diagnosi di CE piuttosto che sulla sorveglianza, tanto che è possibile affermare che in quest'ultimo setting la performance sia sub ottimale [141]. Difatti, le fluttuazioni dell'alfa-fetoproteina possono riscontrarsi sia in caso di sviluppo di CE che in caso di flares virali (HBV e HCV) o peggioramento della malattia epatica [142]; inoltre, solo il 20% dei CE precoci presenta alterati livelli di alfa-fetoproteina [143]. L'AFP è inoltre un marker di malattia avanzata e si associa ad un alto tasso di invasione portale, tumori di grandi dimensioni e scarsamente differenziati [144]. Un test di sorveglianza che è spesso positivo negli stadi tardivi e aggressivi di malattia non può essere un buon test di screening per diagnosticare la malattia nel suo stadio iniziale quando le terapie sono potenzialmente curative. Infine, quando combinata con l'ecografia, vi è un'aggiunta solamente del 6-8% di CE non identificati in anticipo con l'ecografia [142]. Per tali motivi attualmente l'EASL e l'AASLD non suggeriscono l'utilizzo dell'AFP nella pratica clinica se non in associazione all'ecografia.

Altri marcatori sierici studiati, ed utilizzati soprattutto per la diagnosi piuttosto che la sorveglianza, sono la de-gamma-carbossi-protrombina (DCP) [145] e il rapporto tra la frazione glicosilata dell'AFP (frazione L3) per l'AFP totale [146]. Entrambi i test non offrono vantaggi rispetto all'utilizzo dell'AFP.

Un tema cruciale è quello che riguarda l'efficacia dello screening in termini di riduzione di mortalità legata al CE; le evidenze attuali non forniscono una risposta sebbene una recente revisione sistematica di El-Serag e colleghi [147] ha concluso che lo screening consente di identificare più pazienti con uno stadio iniziale di malattia che sono candidabili a trattamenti potenzialmente curativi sebbene in presenza di evidenze limitate per trarre conclusioni solide.

Dall'altro lato, in un recente studio cinese la mortalità era ridotta del 37% nel gruppo dei soggetti sottoposti a sorveglianza con ecografia e dosaggio dell'alfafetoproteina ogni 6 mesi [148]. L'intervallo ideale di sorveglianza dipende dall'incidenza di CE nella popolazione a rischio e dalla crescita tumorale: i dati attualmente presenti in letteratura sono concordi su un intervallo di 6 mesi tra i controlli a cui i pazienti a rischio devono sottoporsi [149–151], sia da un punto di vista della progressione tumorale [152], che della sopravvivenza [153], che del rapporto costo-efficacia e della qualità di vita del paziente [154]. Al fine di ottenere un'ottimale sorveglianza, è importante inoltre definire degli algoritmi di rivalutazione dei pazienti qualora un test utilizzato per la sorveglianza risulti alterato: giacché l'obiettivo dello screening è individuare noduli di CE in stadio precoce (<2 cm), e poiché la maggior parte dei noduli apprezzabili in un fegato cirrotico con dimensione inferiore al centimetro non sono CE [155], sono raccomandati ulteriori valutazioni (con criteri non invasivi o con la biopsia) in pazienti con noduli di dimensioni comprese tra 1 e 2 cm [156]. In caso di noduli con dimensioni maggiori di 2 cm è possibile fare diagnosi di CE esclusivamente con metodiche di imaging qualora in presenza di pattern caratteristici di CE [140]; dall'altro lato i noduli con dimensioni inferiori al centimetro dovrebbero essere rivalutati con ecografia di controllo ogni 4 mesi per il primo anno, e successivamente con regolari controlli ogni 6 mesi [140].

Negli ultimi decenni la ricerca si sta focalizzando sull'elaborazione di modelli di predizione del rischio di CE utilizzando i noti fattori di rischio, soprattutto per i pazienti asiatici con infezione da HBV. Per stratificare il rischio di CE legato all'HVB sono stati studiati fattori quali il sesso maschile, l'età, lo stadio avanzato di fibrosi o la cirrosi e gli alti livelli di HBV-DNA; complessivamente questi score hanno un valore predittivo

negativo maggiore del 95% nell'escludere lo sviluppo di CE dai 3 ai 10 anni. Yang e colleghi, hanno evidenziato come i livelli di HBV DNA possono determinare in maniera accurata il rischio di sviluppo del CE secondo il Risk estimation for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B (REACH-B score) [157]. Tuttavia questo score così come altri, presentano dei punti di debolezza in quanto le attuali terapie antivirali modificano la storia naturale dell'epatopatia cronica. Ulteriori studi hanno dimostrato che la valutazione dell'elasticità tissutale del fegato mediante Fibroscan® può essere usato per predire lo sviluppo di CE [158–161], suggerendo che il rischio di sviluppo di CE dipende dalla fibrosi piuttosto che dai livelli di HBV DNA [162]. Il suddetto modello predittivo, implementato con i dati relativi alla misurazione dell'elasticità tissutale mediante Fibroscan® che ha sostituito i livelli di viremia HBV, si è dimostrato un migliore predittore di CE nei soggetti sottoposti a terapia antivirale [163]. Di seguito vengono elencati la maggior parte dei sistemi di scoring sviluppati per la predittività per CE, sviluppati generalmente per popolazioni definite e in soggetti con epatopatia virale:

- IPM (Individual prediction model): comprende età, sesso, conta piastrinica, consumo alcolico elevato, AFP, albumina, diagnosi di cirrosi[164].
- CU-HCC: comprende età, albumina, bilirubina, diagnosi di cirrosi, HBV-DNA[165].
- LSM-HCC: come CU-HCC con LSM in sostituzione a bilirubina e diagnosi di cirrosi[166].
- GAG-HCC: comprende età, sesso, mutazioni BCP, HBV-DNA[167].
- REACH-B: comprende età, sesso, ALT, HBeAg positività, HBV-DNA[168].
- REACH-B modificato: rispetto al REACH-B viene sostituito HBV-DNA con LSM[169].
- PAGE-B: età, sesso, conta piastrinica[170].

I sistemi di scoring per la valutazione del rischio di CE non risultano raccomandati dalle linee guida poiché sviluppati in popolazioni definite sia per etnia che per eziologia, e quindi non applicabili globalmente a tutta la popolazione cirrotica [171].

DIAGNOSI

La diagnosi del CE si basa sull'imaging o sulla valutazione istologica della biopsia epatica. L'aspetto caratteristico del CE che si riscontra con la tomografia assiale

computerizzata (TAC) o con la risonanza magnetica (RM) nei noduli >10 mm in fegati cirrotici o in fegati di pazienti ad alto rischio per CE è un'intensa captazione in fase arteriosa seguita dalla dismissione del mezzo di contrasto (wash-out) in fase venosa e nelle sequenze tardive [171–176]. Questo comportamento è giustificato dal fatto che il CE è una lesione vascolarizzata, alimentata principalmente dall'arteria epatica mentre il fegato riceve l'80% del sangue dalla vena porta. Tuttavia alcuni noduli di CE sono ipovascolarizzati, soprattutto quelli piccoli o in stadio precoce; in questi noduli il flusso arterioso può non essere completamente sviluppato e si presentano pertanto come ipovascolari all'imaging [177].

L'utilizzo della TC o della RM come metodiche di prima linea per la diagnosi del CE [132,172,178] è approvata dalle principali linee guida. L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) è stata invece eliminata dall'algoritmo diagnostico per la non disponibilità del mezzo di contrasto per la CEUS in tutti i paesi del mondo (in particolare in USA) e per la descrizione di alcuni casi di colangiocarcinoma risultati come falsi positivi alla CEUS. L'ecografia con mezzo di contrasto resta comunque uno strumento diagnostico utile nella gestione di pazienti con CE poiché consente di visualizzare in tempo reale tutta la fase arteriosa e il mezzo di contrasto può essere somministrato senza problemi ai pazienti con insufficienza renale. La CEUS inoltre è di grande aiuto nel valutare la risposta ad un trattamento ablativo percutaneo di un piccolo nodulo di CE [179]. Tutte le lesioni individuate in corso di sorveglianza devono essere caratterizzate per evitare una sovra diagnosi [180]. Per minimizzare questo rischio è stato sviluppato e validato un algoritmo [172,174,181]. I noduli < 10 mm è improbabile che siano epatocarcinomi e vanno pertanto sottoposti a stretta sorveglianza ogni 3 mesi, per 2 anni. I noduli >10 mm e <20 mm è probabile che siano epatocarcinomi e se le metodiche di imaging (TC o RM) evidenziano caratteristiche tipiche, non sono necessarie ulteriori valutazioni; se le caratteristiche del nodulo sono atipiche, bisogna utilizzare altre metodiche di imaging o effettuare una biopsia della lesione. Un esame istologico negativo non esclude la presenza di CE perché è difficile distinguere un CE in fase precoce da un nodulo displastico ad alto grado e bisogna inoltre considerare la possibilità di un campione non diagnostico; se il sospetto di CE è forte, è possibile effettuare una seconda biopsia, in caso contrario la lesione va monitorata e in caso di evoluzione bisogna effettuare nuovi accertamenti (Figura 2) a 4 mesi.

La TAC e RM hanno un'accuratezza del 95% nella diagnosi di CE maggiori di 2 cm, per tale motivo è necessaria solamente una delle due metodiche per porre diagnosi di

certezza in caso di presenza di caratteristiche radiologiche tipiche, così come in assenza delle stesse come esame propedeutico ad una successiva valutazione istologica su campione biotico[140]. Per noduli di dimensioni inferiori ai 2 cm la RM con gadolinio ha una maggiore sensibilità e una maggiore accuratezza [182]. La scelta della metodica dipende dalla disponibilità sul territorio, dai tempi di attesa, dall'esperienza dell'operatore.

L'interpretazione e la raccolta di dati relativi ad esami sul fegato effettuati con TC e RM [175] sono stati recentemente standardizzati, in modo da ridurre la variabilità di interpretazione, dall' American College of Radiology con il sistema LI-RADS(The Liver Imaging Reporting and Data System, LI-RADS), già validato ed utilizzato anche in Italia, il quale categorizza i noduli in una scala che va da LR-1 (nodulo benigno) a LR-5 (CE con invasione vascolare).

Come già accennato la biopsia epatica è mandatoria ai fini diagnostici in caso di comportamento non tipico all'imaging. Le recenti linee guida AASLD [2] raccomandano di eseguire la biopsia di noduli epatici qualora questi fossero indeterminati all'imaging (livello di raccomandazione 3B).

Gli svantaggi legati alla biopsia sono correlati al vissuto del paziente come dolore e ansia, al costo, al rischio di sanguinamento, di seeding tumorale e di falsi negativi dovuti ad insufficiente campionamento. Spesso la biopsia viene utilizzata nel caso di noduli di piccole dimensioni (<1 cm) scoperti in corso di sorveglianza, che all'esame istologico potrebbero essere noduli di CE in stadio precoce o noduli displastici ad alto grado. Difatti secondo l'AASLD sono considerati noduli indeterminati e quindi da indagare, non solo quelli senza pattern tipico di CE all'imaging, ma anche noduli di dimensioni inferiori al centimetro. I noduli di CE in stadio precoce si presentano infatti come noduli ipovascolari in quanto l'apporto vascolare arterioso non è completamente sviluppato. L'evoluzione maligna si caratterizza per la presenza di invasione stromale, che la biopsia epatica può non evidenziare. I noduli più avanzati di CE sono meno differenziati e possono presentare una capsula ben definita e invasione microvascolare [183]. La diagnosi patologica di CE si basa su raccomandazioni internazionali [140] che includono la valutazione del glicoproteina 3 (GPC3), della proteina dello shock termico 70, della glutamino sintetasi [184,185] e/o sulla valutazione del profilo di espressione genica della cellula, che include GPC3, LYVE 1 e la survivina [140][186]. La combinazione di almeno due dei suddetti marker patologici ha dimostrato una sensibilità del 72% e una specificità del 100% per la diagnosi di CE, dato confermato da

due successivi studi di validazione [187,188], tanto che questo modello è raccomandato anche dal gruppo di consenso internazionale per il carcinoma epatocellulare [189]. In aggiunta altri marcatori sono utilizzati per meglio definire il tumore, come il CD34 per valutare la neovascolarizzazione e la cheratina 19 ed EpCAM per valutare l'origine del progenitore cellulare della cellula tumorale [155,190,191]; in particolare la cheratina 19 è stata associata ad un outcome peggiore [190–192]. In generale è possibile affermare, anche secondo le più recenti linee guida dell'AASLD, che la diagnosi di CE può essere effettuata con metodiche non invasive e il trattamento viene generalmente effettuato basandosi esclusivamente sulle evidenze portate dalle metodiche di imaging [2].

STADIAZIONE

I sistemi di staging per il CE dovrebbero essere in grado di predire l'outcome del paziente e assegnare il tipo di trattamento ad ogni stadio di malattia. Le principali variabili prognostiche dei pazienti con CE sono quindi lo stadio tumorale, la funzionalità epatica e il performance status del paziente [140]. Attualmente, le linee guida dell'EASL indicano il Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) come il sistema di stadiazione per il CE più utilizzato, nonché ampiamente validato da diversi studi [193–195] (Figura 3) e raccomandato dalla stessa associazione [140].

Tuttavia non c'è un consenso generale per quale sistema di stadiazione sia il migliore nel predire la sopravvivenza del paziente con CE [196–198], tanto che è la più recente consensus conference dell'associazione Americana Epato-Pancreato-Biliare raccomanda l'uso del sistema TNM per predire l'outcome a seguito di resezione o trapianto epatico e il sistema BCLC per pazienti con CE avanzato non candidati a trattamenti chirurgici [199]. Infatti, oltre al BCLC esistono altri sistemi di stadiazione per CE [200–206] che generalmente incorporano quattro importanti determinanti della sopravvivenza: la gravità della malattia epatica sottostante, la dimensione del tumore, l'estensione del tumore nelle strutture adiacenti e la presenza di metastasi [200,201,207]. I quattro sistemi prognostici più comunemente utilizzati sono quindi: il TNM (estensione del tumore primitivo, coinvolgimento linfonodale, metastasi) lo score di Okuda, il CLIP score (Programma Italiano per il Cancro del Fegato), e il BCLC. Un nuovo score, l'ALBI (albumina-bilirubina) consente una valutazione più obiettiva della gravità della disfunzione epatica in pazienti con CE.

- TNM: il sistema è stato elaborato dall'American Joint Committee (AJCC) / International Cancer Joint Committee on Cancer (UICC) nel 2010[208]. Comprende i più importanti predittori di prognosi: il numero di tumori e la presenza e l'estensione dell'invasione vascolare all'interno del tumore [209,210]. La sopravvivenza a 5 anni dopo resezione per CE, secondo il sistema TNM aggiornato al 2010 è del 55% allo stadio I, 37% allo stadio II e 16% allo stadio III. Secondo l'aggiornamento del 2017 il sistema TNM prevede i seguenti stadi come segue in tabella 1, validati inoltre in pazienti da sottoporre a resezione epatica [211]. Nella nuova classificazione TNM 2017 il potenziale discriminante prognostico basato sulla dimensione microvascolare e l'invasione è stato convalidato in pazienti resecati[211]. Sebbene la presenza di cirrosi e il grado istologico non siano stati utilizzati per assegnare lo stadio finale del tumore, il punteggio di fibrosi epatica sottostante è incluso come fattore prognostico clinicamente significativo [210,212,213], così come l'alfa (AFP) , la presenza o l'assenza di cirrosi e il modello per il punteggio finale di malattia del fegato (MELD). Il sistema di stadiazione TNM è l'unico che è validato in pazienti trattati con resezione epatica [210,211] o trapianto [214] per CE.
- Okuda: in contrasto con la classificazione TNM, il sistema di punteggio prognostico proposto da Okuda include la dimensione del tumore e tre misurazioni della gravità della cirrosi (la quantità di ascite e livelli di albumina e bilirubina sierica) [200]. Il sistema Okuda non stratifica i pazienti per invasione vascolare o presenza di metastasi linfonodali (tabella 2).
- CLIP: diversi studi hanno suggerito che il CLIP score (tabella 3) ha ottenuto risultati migliori nel predire la sopravvivenza rispetto alle versioni precedenti dei sistemi TNM, Okuda o Child-Pugh [201,202,215–217], in particolare tra i pazienti sottoposti a terapia non chirurgica (ad es. chemioembolizzazione transarteriosa [TACE]) [218]. È stata anche proposta una versione modificata dello score (che incorpora il punteggio MELD) [219]. Alcuni gruppi stanno studiando se la prognosi con il punteggio CLIP può essere migliorata con l'aggiunta di fattori sierici come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e il fattore di crescita insulino-simile-I (IGF-1).
- BCLC: questo sistema determina lo stadio del tumore e la prognosi del paziente in base alle dimensioni del tumore, alla severità della malattia di base valutata mediante il Child-Pugh ed al performance status del paziente (PS). Lo stadio

precocissimo e precoce di CE (BCLC 0 e BCLC A) includono rispettivamente pazienti con un singolo nodulo di CE o fino a 3 noduli ≤ 3 cm, in assenza di segni di invasione microvascolare o di diffusione extra-epatica di malattia con funzionalità epatica conservata. Questi pazienti possono beneficiare di trattamenti curativi come la resezione, l'ablazione o il trapianto. Pazienti con un singolo nodulo di grandi dimensioni (>5 cm) senza invasione vascolare sono assegnati allo stadio BCLC A [195,220] e possono beneficiare di una resezione [193,194]. La classe Child-Pugh A e B include pazienti con ascite, peritonite batterica spontanea, insufficienza renale, encefalopatie ricorrenti che sono predittive di una prognosi negativa [221,222]. Questi pazienti vanno studiati per il trapianto a meno che le dimensioni dei noduli non li escludano dai criteri e in tal caso vanno considerati pazienti in stadio avanzato. Pazienti in stadio intermedio (BCLC B) non presentano sintomi ma possono avere lesioni di grandi dimensioni o più lesioni in assenza di invasione vascolare o diffusione metastatica di malattia; se la funzionalità epatica è conservata questi pazienti sono candidabili al trattamento di chemioembolizzazione arteriosa (TACE). L'attuale definizione di stadio intermedio di CE comprende un'ampia fascia di pazienti corrispondente circa al 30% di tutti i pazienti con CE [223]; si tratta pertanto di una popolazione estremamente eterogenea con diverse caratteristiche sia in termini di funzionalità epatica che di dimensioni del tumore. Per tale motivo è stata proposta una sottoclassificazione dei pazienti in stadio intermedio, suggerendo un trattamento terapeutico per ciascun sottogruppo in modo da facilitare la decisione terapeutica nella pratica clinica [224]. In accordo a questi suggerimenti, i pazienti in stadio intermedio sono stati suddivisi in quattro gruppi in base alla funzionalità epatica, alle dimensioni del tumore secondo i criteri di Milano e i criteri up to seven e il performance status del paziente [225]. La capacità prognostica di questa sottoclassificazione non è stata mai validata. I pazienti in stadio avanzato (BCLC C) presentano tumori con crescita al di fuori del fegato e/o invasione vascolare e/o sintomi legati alla patologia tumorale. Il Sorafenib, inibitore delle tirosin-kinasi, è l'unico trattamento in grado di prolungare la sopravvivenza [132,172,226]. Pazienti in stadio terminale (BCLC D) hanno una funzionalità epatica compromessa, la loro prognosi è scarsa [227] e possono beneficiare esclusivamente di terapie di supporto.

- ALBI score: è uno strumento prognostico semplice e obiettivo per valutare la funzionalità epatica in pazienti con carcinoma epatocellulare [228]. Il modello è stato sviluppato da dati su pazienti giapponesi con differenti stadi di CE; nell'analisi multivariata, la bilirubina e l'albumina sono emerse come le uniche variabili non correlate al tumore che hanno influenzato la sopravvivenza nell'analisi multivariata. Questi due fattori sono stati combinati in un modello (il modello ALBI) che viene confrontato con il punteggio Child-Pugh. Sono state quindi individuate 3 categorie: ALBI grado I (punteggio $\leq -2,60$), grado II (punteggio $>$ da $-2,60$ a $\leq -1,39$) e grado III ($> -1,39$). Successivamente l'ALBI è stato ulteriormente convalidato in più di 5000 pazienti in diverse coorti, dimostrandosi discriminatorio in tutti i gruppi studiati. L'ALBI score fornisce un metodo semplice, evidence-based, oggettivo e discriminatorio per valutare la funzionalità epatica in pazienti con CE che può ridurre la variazione interosservatore (come accade con la classificazione dell'ascite e dell'encefalopatia nel sistema di punteggio Child-Pugh).
- Punteggi RETREAT e MoRAL - Diversi fattori sono associati alla recidiva del tumore dopo trapianto di fegato per carcinoma epatocellulare, ma non è ancora stato sviluppato uno score prognostico affidabile per determinare il rischio individuale di recidiva. Alcuni ricercatori della California hanno sviluppato il sistema di punteggio RETREAT (Risk estimation of tumor recurrence after transplant) con dati provenienti da 721 pazienti che soddisfacevano i criteri di Milano (singola lesione ≤ 5 cm, fino a tre lesioni separate, nessuna più di 3 cm, nessuna evidenza di invasione vascolare lorda e nessuna metastasi linfonodali o distanti a livello regionale) e trapiantati per CE. Sono quindi emerse tre variabili indipendentemente associate alla recidiva della malattia (invasione microvascolare, livello sierico di AFP al momento del trapianto e somma del più grande diametro del tumore evidenziabile per tutti i tumori evidenziati nell'espanto), e utilizzate per costruire uno score per predire la recidiva di CE a 1 e 5 anni. Un altro strumento è il modello di recidiva dopo trapianto di fegato [MoRAL], basato sui livelli sierici di proteina indotta da assenza di vitamina K-II [PIVKA-II, des-gamma carbossi-protrombina] e AFP) è stato sviluppato per predire la recidiva di CE dopo trapianto di fegato [229]. Sebbene promettenti questi modelli non sono ancora stati validati.

TRATTAMENTO

Le indicazioni terapeutiche per CE sono stabilite in base al sistema BCLC e se un paziente non è candidabile ad una terapia di prima linea per ciascuno stadio, potrà giovare di un trattamento per uno stadio più avanzato di tumore secondo il concetto di “migrazione dello stadio di trattamento” espresso da Reig e colleghi [195]. Il trattamento del CE richiede spesso un approccio di tipo multidisciplinare che coinvolge gastroenterologo, epatologo, radiologo, oncologo e chirurgo al fine di offrire al paziente il trattamento migliore. È possibile distinguere i trattamenti in due principali categorie: quelli potenzialmente curativi e quelli palliativi.

Trattamenti potenzialmente curativi

In questa categoria sono inclusi tre tipi di approcci: il trapianto di fegato, la resezione epatica e l’ablazione che forniscono risultati eccellenti in pazienti con nodulo singolo \leq 2 cm con funzione epatica conservata [195,230,231]; i tassi di sopravvivenza stimati a 5 anni variano da 60% all’80% [232,233]. Ciascuna di queste opzioni ha indicazioni e controindicazioni ed è necessario pertanto discuterle attentamente e individuare quella più adatta per ogni singolo paziente.

Resezione epatica

È il trattamento di prima linea per i pazienti con tumore singolo e funzione epatica preservata, definita con normali livelli di bilirubina e gradiente di pressione epatica <10 mmHg o conta piastrinica $> 100000/\text{mm}^3$ (Child-Pugh A) [132]. La resezione epatica deve essere effettuata da chirurghi esperti e la selezione dei pazienti deve essere estremamente accurata in quanto le complicanze post-operatorie sono più frequenti per la sottostante malattia epatica e tra queste vi è l’insufficienza epatica. La mortalità peri-operatoria in caso di resezione epatica è di circa il 2-3% [132]. La perdita di sangue peri-operatoria è una complicazione frequente in corso di resezione epatica ed è stata riportata in meno del 10% dei casi [234–236]; è inoltre associata anche all’outcome del paziente. Negli ultimi decenni sono state attuate strategie di selezione dei pazienti che hanno ridotto la necessità di eseguire trasfusioni in corso di intervento a meno del 10% [237]. L’EASL raccomanda inoltre l’effettuazione di resezioni anatomiche, secondo la segmentazione di Couinaud, con margini di almeno 2 cm dalla neoplasia per ottenere

una migliore resezione dal punto di vista oncologico e ridurre il tasso di recidiva precoce [238,239]. Il margine di resezione dalla neoplasia dipende anche dalle dimensioni della neoplasia e dalla funzionalità epatica. Diviene quindi fondamentale lo studio morfologico della neoplasia attraverso indagini TC o RM per valutare l'esatta dimensione e il numero dei noduli, i rapporti con le strutture circostanti, l'eventuale invasione della vena porta o della cava inferiore, la possibile presenza di metastasi extraepatiche. È parimenti importante capire quali siano i rapporti tra la neoplasia, i vasi sanguigni e l'albero biliare per studiare al meglio l'intervento più adatto. Affinché la resezione abbia buon esito, oltre ad ottenere una resezione R0, il fegato rimanente deve garantire una attività funzionale sufficiente. Per predire che ciò avvenga, oltre a verificare che il paziente si trovi nella classe A o B secondo Child-Pugh, si esegue il test di clearance del verde indocianina (ICG R15) che stima la funzionalità epatica in modo più preciso [132]. La presenza di ascite refrattaria alla terapia ed elevati livelli di bilirubina controindicano la resezione epatica; nei pazienti senza ascite e livelli di bilirubina sierica normali l'ICG R15 diviene il principale determinante della resecabilità [240,241]. Un altro importante fattore da considerare prima della resezione è lo stato di cirrosi del fegato, infatti l'insufficienza epatica post epatectomia (post-hepatectomy liver failure, PHLF) è una complicanza che deve essere prevista ed evitata. Prima di procedere alla resezione è quindi necessario accertarsi che il fegato una volta resecato garantisca una funzionalità sufficiente. Per questo motivo si eseguono degli accertamenti preliminari volti a misurare la funzionalità epatica: calcolo della classe Child-Pugh, del punteggio di MELD, i valori del test al verde indocianina e la misurazione dell'elastometria epatica e del gradiente pressorio venoso epatico (HVPG). Difatti, un valore di HVPG > 10 mmHg si associa ad un peggior outcome post resezione indicando un rischio aumentato di scompenso epatico post operatorio [242]. Uno studio condotto da Cucchetti e colleghi ha dimostrato la capacità dell'elastometria epatica di predire l'insufficienza epatica post resezione. La metodica ha mostrato una buona accuratezza nel riconoscere coloro che non svilupperanno la PHLF, ovvero chi presenta un valore di rigidità epatica inferiore a 25,6 kPa [243]. Lo stesso gruppo ha anche dimostrato come importanti predittori di buon outcome post resezione siano avere un punteggio di MELD ≤ 9 e i valori di sodio sierici [244]. Si prevede inoltre un miglioramento dell'outcome per la resezione restringendo i candidati alla resezione ai pazienti con un valore di MELD inferiore a 9 [134]. La resezione tuttavia non risolve il problema della cirrosi sottostante e anche resezioni selettive possono causare

scompenso epatico soprattutto in quei pazienti con valori di ipertensione portale >10 mm Hg con varici gastro-esofagee; questo limite è stato recentemente valutato da Cucchetti e colleghi [245] e considerando questo aspetto si escluderebbero circa ¼ dei pazienti che potrebbero beneficiare della resezione. I pazienti in stadio BCLC B potrebbero beneficiare della resezione evitando i pazienti con ascite e o con valori di bilirubina >2 mg/dL. Se alle valutazioni eseguite prima della resezione si evidenzia che questi criteri non verranno soddisfatti si procede con l'embolizzazione pre-operatoria della vena porta (PVE , portal vein embolization) [246,247]. Grazie all'atrofizzazione dei segmenti embolizzati si sviluppa una ipertrofia compensatoria del lobo controlaterale a quello che verrà resecato che potrà così vicariarne la funzione al meglio, riducendo le complicanze post-operatorie [248]. L'utilizzo di questa manovra è associata al 10-20% di complicazioni [249]. Infine, la recidiva tumorale rappresenta la complicazione maggiore della resezione epatica e il tipo di recidiva influenza la successiva terapia e l'outcome del paziente [132]. Il tasso di recidiva a 5 anni è di circa il 50% [250]. Attualmente per migliorare il successo di questa opzione terapeutica sono stati introdotti altri strumenti nella pratica chirurgica, prima fra tutte l'ecografia intraoperatoria che consente di identificare lesioni non viste all'imaging pre-operatorio nonché l'individuazione dei vasi che consentono una procedura più sicura [193]. In pazienti accuratamente selezionati per la resezione epatica in base alla funzionalità epatica, i migliori predittori di sopravvivenza sono la dimensione tumorale, il numero di noduli e la presenza di microsatellitosi o invasione vascolare [251].

Trapianto di fegato

Il trapianto di fegato è spesso considerato l'unica vera terapia potenzialmente curativa che consente il trattamento di entrambe le patologie, il CE e la sottostante cirrosi epatica. Sono candidati al trapianto tutti quei pazienti che presentano un CE in stadio precoce, non resecabile chirurgicamente, con cirrosi compensata o pazienti con non più di tre noduli di CE, in stadio 0 o A secondo il sistema di classificazione BCLC. Secondo diversi studi il 70% dei trapiantati è in vita a 5 anni dal trapianto, specie se rientrava nei criteri di Milano [252], con un tasso di recidiva tumorale inferiore al 15% [253–257]. Tuttavia solo una minoranza di pazienti in lista d'attesa per trapianto ne riesce a beneficiare in quanto il numero di donatori è ampiamente insufficiente e la ristrettezza di organi determina un progressivo allungamento delle liste d'attesa nei vari Paesi; per

tale motivo molti pazienti (circa il 20%) escono dalla lista per peggioramento della malattia o perché muoiono.

I criteri di Milano (singolo nodulo ≤ 5 cm o ≤ 3 noduli ciascuno ≤ 3 cm in assenza di invasione macrovascolare all'imaging) sono stati utilizzati per selezionare i pazienti candidabili al trapianto [258], che presentavano una sopravvivenza maggiore rispetto a quelli con tumori di maggiori dimensioni [252]. Una espansione dei criteri di Milano è stata successivamente proposta dall'Università della California di San Francisco-UCSF (lesione singola ≤ 6.5 cm, o al massimo 3 noduli con il maggiore ≤ 4.5 cm ed il diametro tumorale totale ≤ 8 cm, in assenza di metastasi e di invasione macrovascolare) [259]: questi criteri sono stati parzialmente validati ma presentavano molte sovrapposizioni rispetto a quelli di Milano e nella migliore delle ipotesi, aumentava la proporzione di pazienti candidabili al trapianto approssimativamente del 5% [260].

Molti altri criteri sono stati proposti in alternativa a quelli di Milano e San Francisco con l'intento di aumentare la quota effettiva di pazienti candidabili al trapianto e la maggior parte di essi si basa unicamente su criteri morfologici, per questo motivo è stata iniziata una raccolta multicentrica dei dati riguardanti i pazienti che non soddisfacevano i criteri di Milano con la nascita dei criteri up-to-seven. I dati presentati mostravano come in una popolazione selezionata di pazienti che non venivano inclusi nei criteri di Milano ma che, in assenza di invasione microvascolare, rispettavano i cosiddetti criteri up-to-seven (CE con sette come somma del diametro del tumore più grande + il numero delle lesioni), la sopravvivenza globale a 5 anni risultava pari al 71.2%, risultato sovrapponibile a quello ottenibile con pazienti entro i criteri di Milano [261]. Questa proposta basata su criteri istologici richiede tutt'oggi una validazione prospettica usando i dati radiologici raccolti prima del trapianto [261]. I pazienti con un CE in stadio intermedio (BCLC B) rappresentano un gruppo eterogeneo nel quale la possibilità di un trapianto deve essere discussa in sede multidisciplinare. I pazienti che presentano una funzionalità epatica ridotta o un CE avanzato (BCLC C) non sono candidati al trapianto per l'elevato rischio operatorio e per l'elevata e rapida possibilità di recidiva o metastasi. I pazienti in stadio D non sono candidabili al trapianto, né ad alcun trattamento attivo sul CE. Oltre alla scelta dei pazienti da destinare al trapianto epatico, è importante la modalità di allocazione degli organi.

L'UNOS ha sviluppato un sistema di priorità per gestire la lista d'attesa per trapianto di fegato basato sul Model for End Stage Liver Disease (MELD), un sistema di punteggio che viene calcolato utilizzando i valori di bilirubina totale, di INR e creatinina e che rappresenta un indice prognostico di mortalità a 3 mesi nei pazienti cirrotici [262]. Purtroppo questo sistema non è in grado di predire la percentuale di pazienti con CE che escono dalla lista d'attesa per avanzamento del tumore, motivo per il quale ai pazienti con CE viene assegnato un punteggio aggiuntivo in base alle caratteristiche del tumore. In alcuni studi viene riportata una discreta utilità del dosaggio sequenziale dell'AFP [132]. Alcune strategie indicano il 'trapianto di salvataggio' in pazienti a basso rischio e nei pazienti da sottoporre a resezione epatica, entrambi scenari in cui l'utilità del trapianto andrebbe validata [263]. Infine, vi sono ancora meno dati sulle strategie di uscita dalla lista per trapianto, sebbene vi sia un consenso generale sul de-listing dei pazienti che sviluppano invasione macrovascolare o localizzazioni extra-epatiche [132].

Per evitare la progressione tumorale nell'attesa del trapianto, talvolta vi è indicazioni all'utilizzo di terapie adiuvanti. L'approccio ideale è quello di distruggere il tessuto neoplastico senza danneggiare il resto del fegato, preservando la sua funzione ed evitando soprattutto la diffusione metastatica. Le linee guida EASL indicano come l'ablazione mediante radiofrequenza si configuri come soluzione migliore in caso di singolo nodulo di dimensioni contenute. In alternativa in presenza di più noduli o di attesa stimata in lista trapianto maggiore di 6 mesi, è indicato il trattamento di chemioembolizzazione arteriosa trans-epatica (TACE) che determina la necrosi del nodulo [132]. Queste indicazioni sono supportate da studi [264,265] che hanno evidenziato come il down-staging ai criteri di Milano permette di raggiungere una sopravvivenza a 5 anni simile ai pazienti che rientravano nei criteri di Milano. Il trapianto da vivente utilizzando il lobo destro del donare vivente sano è stato inizialmente considerato come una valida alternativa, sebbene successivamente l'associato rischio di morte (0,3%) e altre gravi complicazioni (in circa il 2%) per i donatori sani, abbiano smorzato l'entusiasmo iniziale [266–268].

Inoltre, in caso di epatopatie virali, vi è recidiva dopo il trapianto, che potrebbe peggiorare nuovamente la condizione epatica. I trattamenti per l'HBV l'interferone, la Lamivudina e altri farmaci [269,270]; il trattamento è efficace ed eradica l'infezione nella maggior parte dei casi; va iniziato prima del trapianto e proseguito per diversi

mesi. In caso di epatopatia HCV, vi è stata recentemente l'introduzione degli antivirali cosiddetti DAAs (Direct Antiviral Agents) come il Sofosbuvir, Ledipasvir, Elbasvir e altri che hanno come target principale le proteine del virus C [271,272] con altissime percentuali di eradicazione virale[273].

Ablazione

L'ablazione epatica con radiofrequenza (RF) o con iniezione percutanea di etanolo (PEI) è indicata in pazienti con BCLC 0-A nei quali la chirurgia non è possibile o si associa a rischi troppi elevati. L'iniezione percutanea di alcol è stata la prima metodica ablativa ad essere utilizzata per lesioni ≤ 3 cm; essa consiste nell'iniezione di alcol nella sede del tumore che causa la necrosi coagulativa delle cellule neoplastiche [274]. L'alcolizzazione è una metodica efficace in noduli di dimensioni fino a 2 cm, ottenendo una completa necrosi nel 90% dei casi, nel 70% dei casi nei noduli di 2-3 cm e nel 50% dei casi in noduli tra 3 e 5 cm [275–277]; è semplice, non costosa, ripetibile sullo stesso nodulo o su altri e può essere effettuata in regime ambulatoriale senza necessità di supporto anestesilogico. La sopravvivenza a 5 anni raggiunge circa il 50% [278,279]. La radiofrequenza è attualmente la metodica di ablazione di prima linea; questa metodica è più complessa e costosa rispetto all'alcolizzazione e consente di trattare noduli anche di dimensioni maggiori (fino a 5 cm) in un'unica seduta [280,281]. Essendo una procedura nel corso della quale il dolore può aumentare, essa viene in genere effettuata in regime di supporto anestesilogico. La RF produce una necrosi coagulativa del tessuto epatico producendo un anello di sicurezza peritumorale, tanto che 5 trial randomizzati controllati hanno mostrato come la RF abbia un maggiore effetto antitumorale se confrontata con la PEI [282–286] e parallelamente vi è un aumento della sopravvivenza in pazienti con noduli entro i 2 cm trattati con RF [287,288]. Dall'altro lato gli effetti collaterali sono più frequenti rispetto all'alcolizzazione ma raramente sono severi [289,290]. La sopravvivenza dei pazienti con noduli di CE ≤ 3 cm trattati con termoablazione è sovrapponibile a quella di pazienti sottoposti a resezione [291], sebbene l'argomento sia ancora oggetto di discussione [292,293]. Nel caso di noduli ≥ 3 cm o di più noduli, l'efficacia dei trattamenti ablativi decade e in questi casi la resezione offre risultati migliori [294]. Ulteriori metodiche di ablazione sono state recentemente proposte come quella con

micro-onde, con laser, la crioablazione, l'HIFU (elettroporazione irreversibile), sebbene attualmente vi siano solo dati preliminari [295–298].

Trattamenti palliativi

La chemioembolizzazione (TACE) è il trattamento più utilizzato nei pazienti con CE non resecabile ed è il trattamento di prima linea in pazienti appartenenti al gruppo BCLC B. Essa consiste nella somministrazione intra-arteriosa di un chemioterapico che generalmente è rappresentato dalla doxorubicina o dal cisplatino in associazione ad un mezzo di contrasto liposolubile (Lipiodol) per aumentare l'esposizione del tumore al farmaco seguito dall'embolizzazione dei vasi che nutrono la lesione con un agente che in genere è lo Spongel [299], con un duplice effetto citotossico ed ischemico. La metodica va distinta dalla TAE (embolizzazione trans-arteriosa) in cui non viene iniettato alcun chemioterapico e dalla chemioterapia intra-arteriosa dove non vi è embolizzazione. Studi randomizzati controllati hanno evidenziato che la TACE aumenta la sopravvivenza [300,301]. Una metanalisi cumulativa mostra che la TACE convenzionale aumenta la quota di pazienti che sopravvivono a 2 anni [302] e conferma il suo ruolo nel trattamento dei pazienti con CE in stadio intermedio [132,172,303], con assenza di sintomi correlati al CE, con singolo nodulo di CE o più noduli, in assenza di invasione vascolare e diffusione metastatica, con funzionalità epatica conservata (Child-Pugh A o B7 senza ascite) [132,172,303]. In questi pazienti il trattamento è ben tollerato e il tasso di risposta è alto. Recentemente è stata introdotta la TACE con microsferi che rilasciano lentamente il chemioterapico dopo l'embolizzazione per aumentare l'esposizione del tumore al farmaco, che dura circa 1 settimana, e per ridurre l'esposizione sistemica allo stesso [304]. La sopravvivenza dopo il trattamento con microsferi è paragonabile alla TACE convenzionale a causa di una riduzione degli eventi avversi [305,306]. La TACE è ripetibile ma al tempo stesso vi sono casi di progressione di malattia in cui occorre fermarsi [307]. La TACE non va ripetuta se non si ottiene una necrosi sostanziale dopo 2 trattamenti, quando vi è una progressione maggiore di malattia con sovertimento del fegato, invasione vascolare o comparsa di metastasi e quando il ritrattamento è non sicuro in relazione alle condizioni di funzionalità epatica [307]. Per tale motivo è infatti raccomandata una chemioembolizzazione superselettiva al fine di minimizzare il danno epatico ischemico.

Negli ultimi anni viene utilizzata la radioembolizzazione (TARE), che consiste nell'infusione nell'arteria epatica di sostanze radioattive come lo Iodio-131 associato a lipiodol [308] o microsfele contenenti Itrio-90 [309–311], quest'ultima è la sostanza più frequentemente utilizzata. A causa dell'ipervascolarizzazione del tumore, le sostanze infuse verranno automaticamente convogliate nell'area da trattare. La metodica viene generalmente attuata in centri specializzati di terzo livello e preceduta da esami preliminari per evitare shunting polmonare e l'irradiazione intestinale [310].

Chemioterapia

Il Sorafenib, un inibitore delle kinasi, ha dimostrato di poter aumentare la sopravvivenza dei pazienti con CE in stadio avanzato [312] e il suo uso è raccomandato nei pazienti con CE in stadio intermedio e in pazienti selezionati con CE in stadio avanzato che non sono suscettibili di trattamenti ablativi o embolizzanti o nei quali il CE ha già metastatizzato [226,313]. Come accennato, è un inibitore dell'attività delle tirosin-kinasi che agisce come anti-angiogenetico che rallenta la crescita del tumore. Il tasso di risposta non è particolarmente alto e la tossicità può essere rilevante. Ad oggi non esistono markers clinici o molecolari per identificare i pazienti che risponderanno al Sorafenib [132]. La dose di assunzione giornaliera è pari a 800 mg/die ma in caso di effetti collaterali è possibile ridurre il dosaggio a 600 o 400 mg/die o sospendere temporaneamente la terapia. Tra gli effetti collaterali sono stati riportati di scompenso epatico, mucositi, reazioni cutanee, astenia, diarrea e ipertensione arteriosa [314,315].

Diversi agenti come il tamoxifene, l'immunoterapia, gli anti-androgeni e altri chemioterapici sistemici sono stati valutati come terapie di prima o seconda linea per il trattamento del CE [316–318]. Tuttavia nessuno di questi ha mostrato benefici maggiori rispetto al Sorafenib o al placebo come trattamento di seconda linea, nonostante i risultati incoraggianti degli studi in fase iniziale [319–321]. Per questo motivo è possibile affermare che in caso di non risposta al Sorafenib il paziente viene orientato verso cure palliative come avviene per i pazienti in stadio BCLC D (terapia del dolore, nutrizione, supporto psicologico) o incluso in trials clinici, qualora disponibili [132]. Diversi autori hanno provato ad aumentare l'efficacia di questi trattamenti palliativi associando il Sorafenib a TACE, TAE, ablazione o chirurgia [322,323], sebbene con scarsi risultati. Sono in corso valutazioni per l'effetto di altri agenti chemioterapici molecolari su CE come la Rapamicina (inibitore di mTOR), gli inibitori di EGFR

(epidermal growth factor release), il Sunitinib (agente anti angiogenetico), ecc. Per molte terapie sistemiche, terapie ormonali e immunoterapie i risultati su CE si sono dimostrati scarsi o inconclusivi [132].

ELASTOGRAFIA EPATO-SPLENICA

PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO

La rigidità epatica (LS Liver Stiffness) dipende da molti fattori , tra cui il principale è la quantità di matrice extracellulare dell'organo che è una struttura deformabile che conduce gli impulsi esterni attraverso l'organo e può essere considerata come la struttura di base del fegato. A questa si aggiungono altri elementi ovvero la pressione esterna applicata all'organo e la sua pressione interna che è costituita dai liquidi che circolano al suo interno: la rigidità infatti rappresenta la resistenza che l'organo offre al flusso di sangue o liquido. Un quarto fattore è la viscosità che influenza la costante sulla quale si testa la stessa stiffness dell'organo. Questo fenomeno è legato alla frequenza poiché un fegato soffice vibra ad una frequenza molto bassa nell'ordine di svariati Hertz, un fegato indurito, fibrotico, si troverà a vibrare ad una frequenza dell' ordine di Kilohertz. Il FibroScan® (Echosens, Parigi, Francia) è stato il primo strumento elastografico a sviluppare una metodica quantitativa e non invasiva per determinare la rigidità di tessuti biologici in vivo. Il fegato è stato il primo organo ad essere studiato in ragione delle sue dimensioni e della omogeneità del suo parenchima. Delle onde meccaniche vengono generate attraverso l'organo e la LS (Liver Stiffness , elastografia epatica) viene dedotta dalla velocità di queste onde. Il FibroScan® usa la tecnica chiamata Transient Elastography (TE) o Vibration- Controlled Transient Elastography (VCTE) che si basa sulla generazione di onde di taglio sviluppate utilizzando una vibrazione controllata di ampiezza d'onda e frequenza conosciute.

La liver stiffness viene calcolata partendo dalla velocità di queste onde, secondo la formula $E = 3 \rho V^2$ dove E è la stiffness o modulo di Young, ρ è la densità e la V è la

velocità dell' onda. La velocità del fronte di onda è misurata dal VCTE ed è di solito compresa intorno a 50 Hz. I valori di rigidità misurabili partono da un minimo di 1,5 kPa fino ad arrivare al limite superiore di 75 kPa.

Il FibroScan® è dotato di una sonda di acquisizione che consta di un ecografo lineare che emette e riceve il segnale ultrasonoro e di una fonte di vibrazione auto-controllata che genera il fronte di onda. La vibrazione consiste in un periodo sinusale con una frequenza centrale di 50 MHz. La ampiezza di onda dipende dal tipo di sonda: 2mm da picco a picco (PP) per la sonda standard (modello M), 1 mm PP per la sonda pediatrica (modello S) e 3 mm PP per la sonda XL dedicata ai pazienti obesi. I valori elastografici da considerarsi normali hanno decretato che un valore inferiore a 5.5 kPa è da considerarsi nella norma [324].

I limiti principali alla misurazione sono rappresentati dall'ascite e dalla severa obesità che interferiscono con la propagazione del segnale. Inoltre in alcuni gruppi di pazienti, come ad esempio quelli con insufficienza cardiaca, la quota di successo della misurazione della LS scende al 50%. Con lo sviluppo delle sonde XL dedicate ai pazienti obesi si stima di riuscire a ridurre la quota di pazienti in cui è impossibile indagare la LS mediante FibroScan® a causa delle interferenze provocate da ascite e tessuto adiposo. In caso di ipertransaminasemia il valore di TE può risultare alterato, è quindi necessario ripetere l' esame quando gli enzimi di citonecrosi epatica rientrano nella norma. Inoltre, in presenza di ascite l'esame non è effettuabile perché i liquidi smorzano le onde di taglio. La porzione di parenchima presa in esame può essere approssimata ad un cilindro largo 1 cm e lungo 4 cm ad una profondità compresa tra 2,5 cm e 6 cm sotto la cute. Questo volume è almeno 1000 volte superiore rispetto a quello esaminato mediante una biopsia epatica ed è perciò più rappresentativo della situazione epatica nel suo complesso.

PROCEDIMENTO

Le misurazioni della LS vengono effettuate sul lobo destro del fegato, in posizione intercostale: ciò previene una eventuale compressione dell'organo da parte della sonda che andrebbe ad alterare i valori di stiffness. Il paziente deve essere a digiuno da almeno 6 ore. L'esaminato pone il proprio braccio destro dietro la nuca in modo da allargare il più possibile gli spazi intercostali. A questo punto l'operatore sceglie il punto in cui

effettuare le misurazioni utilizzando l' ecografo in M- mode o in A-mode ,scegliendo un'area libera da grossi vasi ed evitando di includere la colecisti, infine procede alle misurazioni. La sonda viene posta a livello degli spazi intercostali sulla linea ascellare media o anteriore, si è visto come non cambino i valori mediani di LS tra i diversi spazi intercostali. È comunque importante che la sonda venga posta perpendicolarmente agli spazi intercostali e che non vengano messe in vibrazione le stesse coste perché potrebbero modificare il propagarsi del fronte d'onda. Le misurazioni in cui si rileva una velocità del fronte d'onda non costante vengono considerate non valide dallo stesso macchinario.

Il valore finale di LS rappresenta il risultato del calcolo dalla mediana di 10 misurazioni valide e, perché l' esame risulti valido, è importante che il range interquartile non superi il 30% ($IQR < 0.3$) del valore della mediana e che le misurazioni valide siano almeno il 60% delle misurazioni complessive ($SR > 60\%$). Le misurazioni non valide vengono automaticamente non calcolate dal macchinario e quindi non prendono parte alla misura finale della stiffness[324–327][328]. La misurazione dell'elastometria epatica ha mostrato di avere una ottima riproducibilità sia intra-operatore che inter-operatore con un coefficiente di correlazione intra-classe di 0.98 che però diminuisce quando ci troviamo di fronte a bassi gradi di fibrosi, steatosi o BMI elevato [329,330]. Altro fattore non trascurabile a favore della metodica elastografica è la rapida curva di apprendimento necessaria al raggiungimento dell'abilità a svolgere l'esame correttamente.

APPLICAZIONI IN AMBITO CLINICO

Considerando che la fibrosi epatica è strettamente correlata con la prognosi del paziente affetto da epatopatia cronica, studiare e stadiare la progressione della fibrosi diventa fondamentale per decidere quali siano i trattamenti e le strategie migliori. Anche se la biopsia è stata considerata per lungo tempo il gold standard in questo senso, a causa dell'elevata invasività di questo esame negli ultimi decenni si è affermata come metodo di studio del paziente con epatopatia cronica l'elastografia epatica. Questa metodica è stata proposta per la prima volta nel 2003 e da allora si sono susseguiti svariati studi in cui ne è stata dimostrata l'accuratezza diagnostica nello staging delle epatopatie croniche di origine virale e non. La misurazione della LS consente di seguire il paziente durante la storia naturale di malattia proponendogli un esame non invasivo e veloce

poiché dura mediamente tra i 5 e i 10 minuti. Inoltre, se consideriamo il paziente con uno stadio avanzato di malattia di fegato, già nella condizione di cirrosi (F4) possiamo comunque continuare a seguirne l'evoluzione tra i 12,5 e i 75 kPa. Per quanto riguarda l'epatite cronica da HCV i valori di TE hanno mostrato di avere una correlazione significativa con il grado istologico di fibrosi, motivo per il quale sono stati usati tra i criteri per l'allocatione delle nuove terapie antivirali DAAs in base al grado di gravità di malattia del singolo paziente. Nel caso di infezione cronica da HBV c'è una correlazione inferiore tra il valore di fibrosi espresso dalla biopsia e il valore di stiffness rilevato dall'elastografia, inoltre questi pazienti spesso presentano dei picchi di ipertransaminasemia che possono andare ad inficiare la veridicità del valore della LS, sovrastimandolo. Nei pazienti con epatopatia HBV relata l'informazione fornita dalla TE è comunque globalmente accettata. Anche per quel che riguarda l'epatopatia esotossica dovuta all'eccessivo consumo alcolico si è visto come i valori di LS decrescano consensualmente con il tempo di astinenza dall'alcol [331].

L'elastometria epatica come predittore del rischio di sviluppare epatocarcinoma

L'epatocarcinoma è una delle complicanze più temibili della cirrosi epatica e in questo senso si è dimostrata l'efficacia del FibroScan® nel riconoscere diverse classi di rischio per lo sviluppo di patologia neoplastica [332]. Uno studio prospettico condotto da Masuzaki e colleghi ha evidenziato come pazienti con un valore di elastometria superiore a 10 kPa avevano un rischio aggiunto di sviluppare CE nel periodo di sorveglianza (rischio relativo- RR 16.7) nella classe con LS compresa tra 10.1 e 15 kPa, un rischio relativo di 20.9 quando la LS si trova tra 15.1 e 20 kPa, un RR di 25.6 per una stiffness compresa tra 20.1 e 25 kPa e infine un RR di 45.5 quando il valore elastografico supera i 25 kPa [333]. Uno studio analogo condotto da Jung e colleghi ha dimostrato che il valore di elastometria epatica rappresenta un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di epatocarcinoma anche in una popolazione affetta da epatite cronica B. Alla luce di questi risultati l'elastografia seriata si figura come un ottimo strumento di monitoraggio dinamico del rischio di trasformazione neoplastica del paziente epatopatico [334,335]. La misurazione della rigidità epatica trova applicazione anche come predittore per la recidiva de novo. Due studi condotti da Jung e colleghi hanno preso in esame pazienti sottoposti a resezione curativa per epatocarcinoma determinando come cut-off di LS (con sensibilità 64.7% e specificità

76.1%) il valore di 13.4 kPa come predittore dell'evento di recidiva in generale [336]. Uno studio successivo volto a trovare un modello predittivo per il rischio di recidiva tardiva, oltre al valore dell'elastografia sono risultati affidabili predittori di recidiva tardiva anche il valore di ritenzione del verde indocianina a 15 minuti (ICG R15), il grado di attività infiammatoria e la presenza di noduli multipli [337].

L'elastometria splenica come surrogato del gradiente pressorio venoso epatico

Un'altra importante complicanza della patologia cronica di fegato è l'ipertensione portale, causata principalmente dal progressivo aumento delle resistenze vascolari ad opera della fibrosi. L'aumento del gradiente venoso porto-sistemico può portare allo sviluppo di varici esofagee o gastriche a rischio di sanguinamento, allo sviluppo di ascite con il rischio di incorrere in peritoniti batteriche spontanee e all'insorgenza della sindrome epatorenale o di encefalopatia epatica[338]. Il valore di elastometria rilevato dal FibroScan® riflette non solo la situazione della fibrosi epatica ma è strettamente associato anche con la severità dell'ipertensione portale [339].

La storia naturale del paziente con epatopatia cronica ha una prognosi diversa in caso di ipertensione portale clinicamente manifesta (CSPH), ovvero se presenta un valore di HVPG > 10 mmHg [340]. Diventa quindi necessario conoscere il differenziale pressorio a livello epatico. La metodica gold standard per misurare il gradiente pressorio venoso epatico è il cateterismo delle vene sovraepatiche (HVPG Hepatic Venous Pressure Gradient), che è dato dalla differenza tra la pressione di incuneamento e la pressione libera epatica. Esso rappresenta il gradiente pressorio presente tra la vena porta e la porzione intra-addominale della vena cava inferiore. Il normale valore di HVPG è compreso tra 1 e 5 mmHg mentre valori superiori configurano una situazione di ipertensione portale. Valori di gradiente pressorio ≥ 10 mmHg determinano una condizione di ipertensione portale clinicamente significativa che coincide con il rischio di sviluppare delle complicanze come lo sviluppo di circoli collaterali e varici esofagee o gastriche. Valori superiori a 12 mmHg pongono il paziente ad alto il rischio di sanguinamento [341]. Un gradiente di pressione venosa epatica > 10 mmHg è stato precedentemente identificato come fattore predittivo indipendente per lo sviluppo del carcinoma epatocellulare[27–29]. Tuttavia l'HVPG è una metodica invasiva, disponibile solo in centri specializzati e costosa, quindi nell'ultimo decennio diversi autori [342–347] hanno provato a valutare l'ipertensione portale con metodi non invasivi; in

particolare, è stato studiato il ruolo del fegato[346,348,349] e della rigidità della milza (Spleen Stiffness Measurement- SSM)[346,347] come marker non invasivi dell'ipertensione portale e delle sue complicanze, come la presenza di varici esofagee. L'interesse verso la valutazione della rigidità della milza è spiegato dal fatto che la correlazione tra rigidità epatica e ipertensione portale risulta affidabile solo fino a valori di HVPG inferiori a 10-12 mmHg[349], poiché successivamente le modificazioni emodinamiche tipiche della condizione di ipertensione portale coinvolgono principalmente la milza [340,350]. Già altri autori come Giannini e colleghi, hanno sviluppato un indice che mette in rapporto la conta piastrinica con il diametro bipolare della milza (Plt/Spl) [351].

Nonostante la splenomegalia rappresenti un reperto comune in corso di ipertensione portale, la correlazione tra diametro bipolare splenico e entità dell'ipertensione portale o presenza di varici esofagee è dibattuto. Oltre al valore dimensionale della milza, è interessante prendere in considerazione la stiffness splenica perché la splenomegalia in corso di cirrosi non è solo ascrivibile ad una congestione dovuta al reflusso di sangue portale attraverso la vena splenica ma anche a fenomeni di iperattivazione del tessuto linfoide splenico associata ad un incremento della neoangiogenesi e fibrogenesi. Dai due studi precedentemente condotti da Colecchia et al.[346,352] è emerso che l'elastometria splenica sia caratterizzata da una forte accuratezza diagnostica per la predittività della presenza di varici esofagee e che SSM sia correlata con i valori di HVPG. Dati simili sono emersi da ulteriori studi condotti da Stefanescu et al.[347]. Inoltre, recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha identificato, nel secondo studio suddetto, la misurazione della rigidità della milza come predittore di complicanze cliniche in pazienti con cirrosi compensata[352]. Al momento non esistono studi che abbiano valutato il ruolo dell'elastometria splenica nel predire il CE.

Tabella 1. TNM

Tumore primitivo (T)			
TX	Tumore primitivo non può essere individuato		
T0	Non ci sono evidenze del tumore primitivo		
T1	Tumore solitario ≤ 2 cm, o >2 cm senza invasione vascolare		
T1a	Tumore solitario ≤ 2 cm		
T1b	Tumore solitario >2 cm senza invasione vascolare		
T2	Tumore solitario >2 cm con invasione vascolare o Tumori multipli, nessuno >5 cm		
T3	Tumori multipli, almeno uno di questi >5 cm		
T4	Tumore singolo o multiplo di qualsiasi dimensione con invasione di un ramo principale della vena porta o delle vene epatiche o Tumore singolo o multiplo con invasione diretta di organi adiacenti ad eccezione della colecisti o con perforazione del peritoneo viscerale		
Linfonodi regionali (N)			
NX	Linfonodi regionali non possono essere valutati		
N0	Assenza di interessamento dei linfonodi regionali		
N1	Interessamento dei linfonodi regionali		
Metastasi a distanza (M)			
M0	Assenza di metastasi a distanza		
M1	Presenza di metastasi a distanza		
Stadio secondo il TNM e Gruppo prognostico			
T	N	M	Stadio
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IB
T2	N0	M0	II
T3	N0	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
qualunque T	N1	M0	IVA
qualunque T	qualunque N	M1	IVB

Tabella 2. Okuda score

Parametri	Positivo	Negativo
Dimensione del tumore	>50%	<50%
Ascite	Presente	Assente
Albumina	<3 mg/dL	>3 mg/dL
Bilirubina	>3 mg/dL	<3 mg/dL
Stadio		
I	Assenza di fattori positivi	
II	1 o 2 fattori positivi	
III	3 o 4 fattori positivi	

Tabella 3. CLIP score

Parametri	Score
Child-Pugh stage	
A	0
B	1
C	2
Morfologia massa neoplastica	
Nodulo singolo ed estensione \leq 50%	0
Multinodulare ed estensione \leq 50%	1
Massivo o estensione >50%	2
Livelli sierici alfa-fetoproteina	
<400	0
\geq 400	1
Trombosi della vena porta	
No	0
Si	1

Figura 1. Tassi di incidenza di carcinoma epatocellulare standardizzati per età . I tassi di incidenza indicati (per 100.000 persone) si riferiscono ad entrambi i sessi e tutte le età. El-Serag, NEJM, 2011[353]

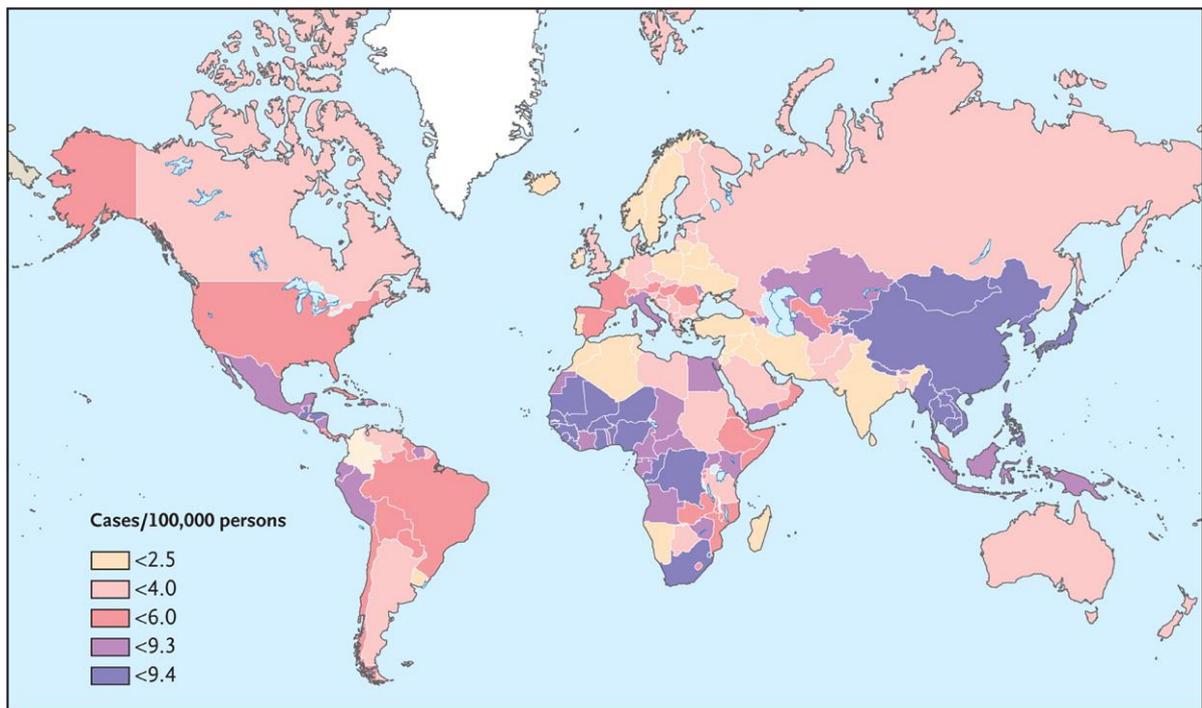


Figura 2. Algoritmo diagnostico per la valutazione dei noduli evidenziati con l'ecografia in pazienti a rischio di sviluppare un epatocarcinoma. EASL CPG[135]

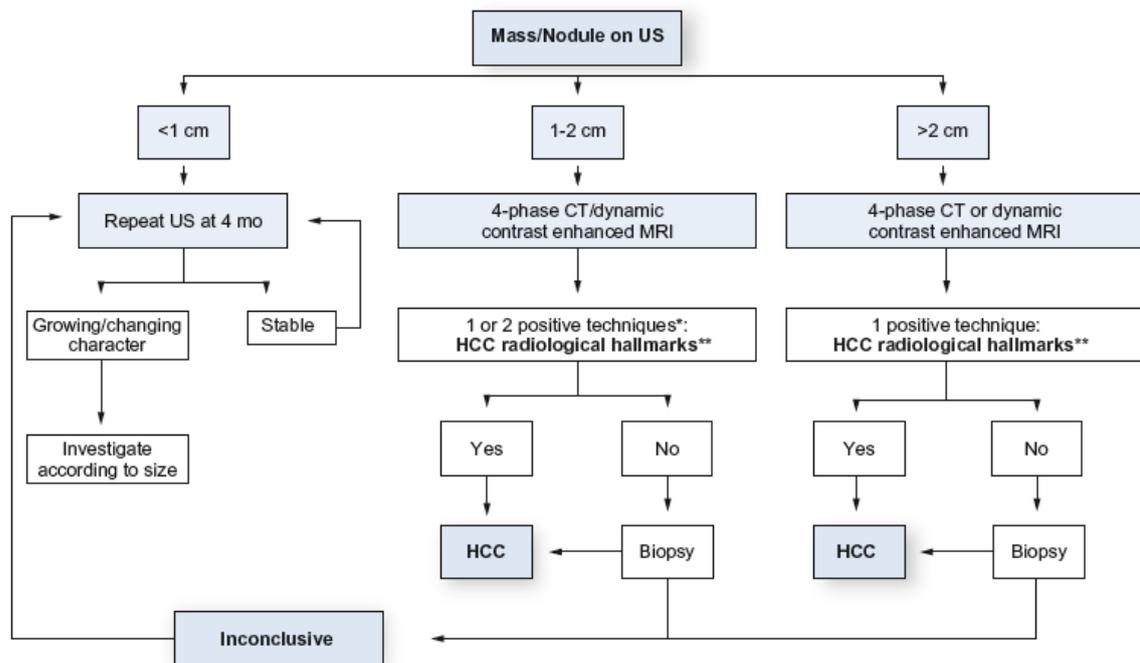
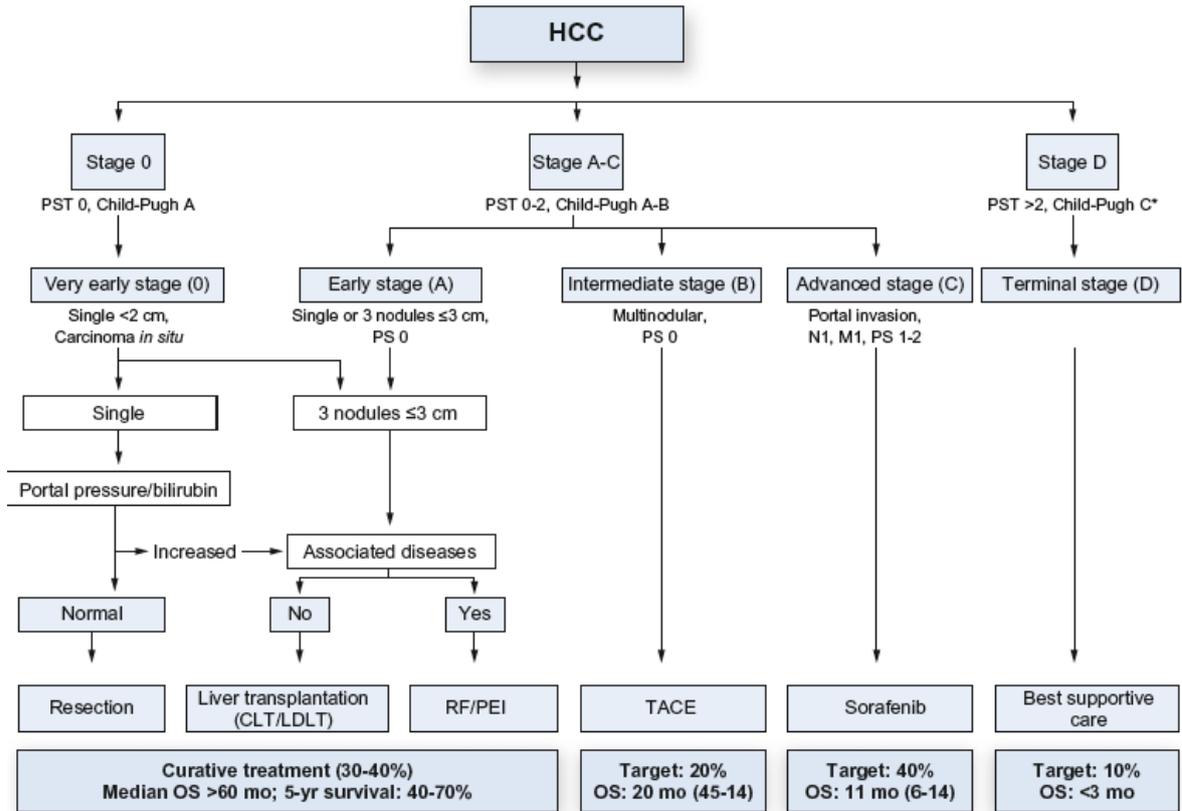


Figura 3. Stadiazione e trattamento dell'epatocarcinoma secondo il Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC). EASL CPG. [135]



SECONDA PARTE

TITOLO DEL PROGETTO

Studio prospettico monocentrico per la valutazione del ruolo dell'elastometria epato-splenica come predittore di insorgenza di epatocarcinoma in pazienti con cirrosi epatica.

INTRODUZIONE E RAZIONALE

L'ipertensione del portale è la complicanza più significativa della cirrosi epatica, che influenza la comparsa di altri eventi correlati alla malattia di fegato (ascite, sanguinamento da varici, encefalopatia porto-sistemica) e quindi l'esito clinico del paziente[354,355]. Il metodo "gold standard" per la valutazione dell'ipertensione portale è la misurazione del gradiente di pressione venosa epatica (HVPG)[356]; in letteratura sono stati definiti valori della pressione portale indicativi sia della sua presenza clinicamente significativa che delle sue complicazioni. Nell'ambito della storia naturale della cirrosi, il carcinoma epatocellulare(CE) è un'ulteriore complicazione dell'ipertensione portale e ci sono dati sperimentali che correlano valori elevati di HVPG con un aumento del rischio di sviluppare CE[27–29], indipendentemente dalla gravità della cirrosi[27]. Sebbene sia accurata, l'HVPG è un metodo invasivo, gravato quindi dai rischi legati alla sua invasività e in aggiunta non è disponibile in tutte le unità epatologiche[356,357]. Recentemente, la misurazione della rigidità (stiffness) del fegato (LSM) e della milza (SSM), valutata utilizzando l'elastografia transiente (TE) controllata da vibrazioni (Fibroscan®, Parigi, Francia) è stata proposta come strumento non invasivo per la valutazione dell'ipertensione del portale[346,347,358]. Infatti è stato recentemente dimostrato che la LSM e la SSM possono essere utilizzati come un metodo non invasivo per monitorare l'ipertensione portale e per valutare la storia naturale della malattia epatica[346–350,358–364].

Tuttavia, attualmente sono disponibili pochi dati relativi al significato prognostico della LSM e in particolare della SSM in relazione al verificarsi di eventi di scompenso correlati alla cirrosi epatica[364] e dello sviluppo di CE [30,364] nei pazienti con cirrosi compensata.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è di verificare il ruolo prognostico nei confronti dell'epatocarcinoma dell'elastometria epato-splenica in pazienti con cirrosi epatica. A tale scopo una coorte di pazienti cirrotici è stata seguita per almeno un anno, registrando

la comparsa dell'epatocarcinoma e di altri eventi di scompenso correlati alla malattia epatica.

MATERIALI E METODI

Pazienti e disegno dello studio

Sono stati prospetticamente arruolati, sulla base dei criteri che seguono, pazienti con cirrosi epatica compensata, presso il Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche del Policlinico Sant'Orsola Malpighi di Bologna. Sono stati raccolti i dati demografici e clinici di tutti i pazienti comprendenti: sesso, età, peso, altezza, BMI (body mass index), eziologia della cirrosi, valutazione clinica della presenza di encefalopatia epatica secondo i criteri West-Haven al fine di poter calcolare il Child-Pugh. All'arruolamento venivano effettuati o raccolti i dati relativi alle indagini di laboratorio, all'ecografia dell'addome, all'esofagogastroduodenoscopia, alla misurazione del gradiente pressorio venoso epatico mediante HVPG (hepatic venous pressure gradient), qualora questi fossero stati effettuati entro 6 mesi dall'arruolamento; veniva inoltre eseguita l'elastometria epato-splenica mediante Fibroscan® (Echosens, Parigi, Francia). I pazienti sono stati seguiti con controlli trimestrali o semestrali registrando la comparsa di epatocarcinoma, la cui diagnosi è stata effettuata secondo le più recenti linee guida europee[30]: il sospetto su base laboratoristica e/o ecografica veniva successivamente confermato da metodiche di secondo livello quali la tomografia assiale computerizzata con studio multifasico o la risonanza magnetica con mezzo di contrasto epatospecifico ed eventualmente, nei casi dubbi, mediante l'utilizzo della biopsia epatica. Il protocollo è stato approvato dal comitato etico dell'ospedale S.Orsola-Malpighi ed è conforme alle linee guida etiche della Dichiarazione di Helsinki del 1975 (sesta revisione, 2008); è stato ottenuto un consenso informato scritto da ogni paziente.

I criteri di inclusione utilizzati per l'arruolamento dei pazienti erano i seguenti:

- Pazienti di entrambi i sessi con età maggiore o uguale a 18 anni
- Pazienti con cirrosi epatica causata da HBV, HCV, alcol o patologie colestatiche
- Firma del consenso informato

I criteri di esclusione erano:

- portatori di Pacemaker o defibrillatori cardiaci
- donne in gravidanza
- $BMI \geq 35$
- presenza di ascite moderata-severa
- transaminasi ≥ 250 UI/L
- trattamento antivirale nei 2 mesi precedenti all'arruolamento o risposta virologica al trattamento da meno di 6 mesi.
- portatori di trapianto di fegato
- pazienti con epatite alcolica acuta e ittero associato
- pazienti con epatocarcinoma
- pazienti con età > 80 anni

Esami di laboratorio

Gli esami di laboratorio richiesti comprendevano: ALT (alanina amino-transferasi), AST (aspartato amino-transferasi); GGT (gamma glutamil-transferasi), fosfatasi alcalina, bilirubina totale e frazionata, INR (international normalized ratio), conta piastrinica, albumina, creatinina e urea; sono stati ritenuti validi esami di laboratorio effettuati entro 6 mesi dalla data di arruolamento. Sono stati inoltre calcolati degli score biochimici, già utilizzati nella valutazione della fibrosi epatica:

- APRI : $ALT (UI/L) * [100 / \text{conta piastrinica } (10^3/mm^3)] [365]$.
- Lokscore: $\text{Log odds} = -5.56 - 0.0089 * \text{conta piastrinica } (10^3/mm^3) + 1.26 [AST (UI/L) / ALT (UI/L)] + 5.27 * INR$; $\text{Lok} = [e (\text{log odds})] / [1 + e (\text{log odds})] [366]$.

Ecografia addominale

L'ecografia addominale considerata valida per lo studio è stata eseguita da un operatore esperto utilizzando una sonda convex da 3.5-5 Mega Hertz. L'esame veniva effettuato con paziente in posizione supina, a digiuno da almeno 6 ore. L'ecografia era considerata valida se eseguita entro tre mesi dalla data dell'arruolamento. Per ogni paziente venivano valutati in particolare i seguenti parametri: presenza di trombosi portale, diametro longitudinale e trasversale della milza, area della milza, presenza di ascite.

Esofagogastroduodenoscopia

La gastroscopia considerata valida per lo studio, veniva effettuata da un endoscopista esperto, in sedazione cosciente; essa doveva riportare:

- la presenza o l'assenza delle varici;
- il grado delle varici esofagee;
- la presenza di segni rossi e in particolare di cherry spots e di red wale marks.

Veniva considerata valida se effettuata entro 6 mesi dalla data dell'arruolamento.

Misurazione del gradiente pressorio venoso epatico (HVPG)

La misurazione della pressione portale considerata per lo studio veniva effettuata c/o la Radiologia di riferimento del centro. In anestesia locale, veniva introdotto un catetere a palloncino nella vena giugulare destra e veniva fatto progredire sino all'atrio destro e quindi alla vena sovraepatica destra; il palloncino veniva quindi gonfiato mediante iniezione di 5 ml di mezzo di contrasto iodato (Iopamiro 370, Bracco, Milano). Il catetere forma in posizione occludente una colonna continua di fluido con il sangue nelle sovraepatiche, nei sinusoidi e nelle vene del distretto portale e si determina quindi, in questa posizione, la cosiddetta pressione occludente, o Wedged Hepatic Venous Pressure (WHVP), la quale coincide con la pressione portale sinusoidale; il palloncino viene quindi sgonfiato e in posizione libera si misura la pressione libera (Free Hepatic Venous Pressure, FHVP), che esprime la pressione della vena cava inferiore. Sottraendo la FHVP dalla WHVP si ottiene infine il gradiente porto-epatico, o HVPG. Tutte le misurazioni sono state effettuate tre volte e il valore finale veniva determinato dalla media delle tre misurazioni. È stata considerata valida una valutazione dell'HVPG effettuata entro 6 mesi dalla data dell'arruolamento.

Elastometria epato-splenica

La misurazione della rigidità del fegato e della milza è stata valutata mediante l'elastografia transiente, utilizzando quindi il FibroScan® (Echosens, Parigi, Francia) dopo un digiuno notturno e dopo l'ecografia addominale. I valori di LSM sono stati ottenuti come precedentemente riportato [346] secondo il gruppo di studio sulla rigidità del fegato "Elastica" dell'Associazione italiana per lo studio del fegato [367] e secondo le raccomandazioni della Federazione europea delle società per gli ultrasuoni in

medicina e biologia (EFSUMB) [368,369]. Per ciascun paziente, i valori di LSM sono stati considerati adeguati se il tasso di successo era $> 60\%$ e l'intervallo interquartile (IQR) era $< 30\%$ del valore mediano. Le misurazioni della stiffness della milza (SSM) sono state eseguite come descritto in precedenza [346,352] utilizzando l'apparecchio FibroScan® con la stessa sonda utilizzata per eseguire LSM. Sono state applicate le stesse linee guida per la misurazione di LS (cioè tasso di successo $> 60\%$, IQR $< 30\%$) [367]. La misurazione dell'elastometria epato-splenica richiede complessivamente circa 15 minuti; entrambe le valutazioni sono state effettuate nello stesso giorno, da un operatore esperto su paziente a digiuno da almeno 6 ore.

Visite di follow-up

Durante ciascuna visita di follow-up eseguita trimestralmente o semestralmente a seconda della gravità dell'epatopatia ed in base alle più recenti linee guida internazionali[30], venivano registrati i seguenti dati: comparsa di carcinoma epatocellulare, dimensioni e localizzazione tumorale, eventuali trattamenti eseguiti per carcinoma epatocellulare, terapia specifica per epatopatia e in caso di epatopatia virale se veniva raggiunta la clearance virale, episodi di scompenso ascitico, numero di episodi di ascite, necessità di paracentesi, episodi e numero episodi di encefalopatia epatica, numero di ospedalizzazioni totale e per malattia epatica, trapianto epatico, posizionamento TIPS (transjugular intrahepatic portocaval shunt).

Analisi Statistica

Ai fini dell'analisi statistica sono stati inclusi pazienti che avevano sviluppato CE durante il follow-up e pazienti che non lo avevano sviluppato con un periodo minimo di follow-up di 12 mesi dall'inclusione nello studio. Le variabili categoriche sono state espresse come numeri (percentuali) mentre le variabili continue come mediane con il range interquartile (25mo e 75mo). Per il confronto tra i due gruppi (cirrotici che non sviluppano CE e cirrotici che sviluppano CE) è stato usato il test del chi quadro per le variabili categoriche e il test di Kruskal-Wallis per le variabili continue. Per l'analisi univariata è stato applicato un modello di regressione secondo Cox per valutare lo sviluppo di carcinoma epatocellulare e le seguenti variabili: età, sesso, BMI, GGT, ALP, AST, ALT, INR, piastrine, urea, creatinina, albumina, bilirubinemia diretta e totale, LSM, SSM, HVP, MELD, Child-Pugh, APRI, Lok index, presenza di varici

esofagee, grado varici esofagee, presenza di trombosi portale, diametro longitudinale milza, area splenica, clearance virale in caso di epatopatia HCV. Dopo la valutazione della multicollinearità delle variabili attraverso l'utilizzo di una correlazione di Spearman, le variabili con un valore $p < 0.10$ all'analisi univariata sono state incluse in diversi modelli di regressione secondo Cox multivariata di tipo stepwise backward. Sono stati quindi riportati gli Hazard ratio (HR) con il loro intervallo di confidenza al 95% e il Likelihood Ratio-Chi². Inoltre, è stato eseguito anche un nomogramma per la stima del rischio individuale di CE a partire dai dati derivanti dal modello di regressione secondo Cox eseguito su tutta la popolazione. Infine, è stato calcolato il miglior cut-off per SSM mediante l'utilizzo del test di Youden. Solo valori p inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando Stata / SE (versione 14.0, Stata Corp, Texas, U.S.A.).

RISULTATI

Caratteristiche di base

A partire da novembre 2012 e fino a novembre 2016 sono stati arruolati prospetticamente 140 pazienti nel Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche del Policlinico Sant'Orsola Malpighi di Bologna. Da questa corte sono stati esclusi 48 pazienti (vedi figura 1): 1 paziente è stato escluso per aver eseguito trapianto di fegato nei primi 12 mesi di follow-up dello studio, 1 paziente escluso per non aver completato le valutazioni basali, 1 paziente escluso per limite di età, 15 pazienti esclusi poiché persi al follow-up, 14 pazienti esclusi dall'analisi preliminare poiché con follow-up minimo (12 mesi) insufficiente al momento dell'analisi statistica e 16 su 140 (11,4%) con SSM con risultati non validi (IQR>30% o success rate<60%) di cui 7 su 140 (5%) con LSM con risultati non validi. In totale sono stati quindi analizzati 92 pazienti, di cui all'ultimo follow-up utile 21 avevano sviluppato carcinoma epatocellulare (CE) e 71 erano liberi da carcinoma. Il follow up mediano registrato è stato di 41 mesi, con follow up massimo di 63 mesi.

Tra i pazienti arruolati sono stati inclusi 65 maschi (70%), di cui 16 hanno sviluppato un CE e 27 donne, di cui 5 hanno sviluppato un CE; l'età mediana era di 59.5 anni, quella dei pazienti che non hanno sviluppato un CE era pari a 57 anni, quella dei pazienti che hanno sviluppato un CE 66 anni, con una differenza statisticamente significativa ($p=0.013$). La causa principale della cirrosi è risultata l'epatopatia HCV relata in entrambi i gruppi di confronto (78.9% nel gruppo che non sviluppa CE e 81% nel gruppo con CE). Non sono state registrate differenze nella frequenza di comparsa di CE nei pazienti quando veniva considerata l'eziologia e l'esecuzione di terapia antivirale virus-relata in caso di epatopatia ad eziologia virale.

Complessivamente 5 pazienti sono deceduti nel periodo di osservazione, di cui 1 per cause epatiche e che aveva sviluppato CE. Tra gli altri eventi di scompenso, si segnalano 22 casi di scompenso ascitico (tra questi 7 soggetti avevano sviluppato inoltre CE) di cui 3 hanno necessitato esecuzione di paracentesi evacuativa. In aggiunta si sono registrati 8 casi di encefalopatia epatica di cui 5 in pazienti che avevano sviluppato epatocarcinoma e 6 casi di sanguinamento da varici esofagee, di cui uno in soggetto del gruppo con CE. Trentasette su 92 (40,2%) pazienti arruolati hanno subito un ricovero ospedaliero per cause correlate al fegato, di cui 19 per CE. Tre pazienti su 92 sono stati

sottoposti durante il loro follow-up a trapianto epatico ma sono stati comunque inclusi nel gruppo di soggetti valutati poiché con follow-up minimo dalla valutazione al trapianto epatico maggiore di 12 mesi. Tra i 21 pazienti con CE in 6 casi il CE era multifocale e nei restanti 15 c'era stato il riscontro di un nodulo singolo; in 3 casi era stato fatto ricorso a resezioni epatiche, 1 caso di CE era stato sottoposto a terapia sistemica con Sorafenib e i restanti casi erano stati sottoposti a metodiche di ablazione percutanea (PEI o RF) e/o a chemioembolizzazione. Nove pazienti di 21 con CE(43%) erano andati incontro ad una recidiva di CE che in tutti i casi risultava precoce, cioè entro 24 mesi dal CE primario.

Le restanti caratteristiche cliniche, demografiche, laboratoristiche e strumentali dei 92 pazienti arruolati, suddivisi nei 2 gruppi di confronto (pazienti che non sviluppano CE vs pazienti che sviluppano CE) sono sintetizzate nella tabella 1.

In particolare, considerando i dati strumentali, il dato dell'HVPG era disponibile in 90 pazienti (97,8% dei soggetti) ed il valore mediano è risultato pari a 12 mm Hg nel gruppo non CE e 16 mm Hg nel gruppo CE, con differenza statisticamente significativa ($p=0,001$); il valore mediano dell'elastometria epatica (LSM) era pari a 22.3 kPa nel gruppo non CE e 34.3 kPa nel gruppo CE, anch'esso con differenza statisticamente significativa ($p=0,011$). Anche l'elastometria splenica (SSM) differiva significativamente tra i due gruppi, infatti il valore mediano nel gruppo di pazienti senza CE era 50,2 kPa e di 65.4 kPa nel gruppo di pazienti con CE ($p=0.014$), vedi Figura 2. Inoltre, il miglior cut-off di SSM per valutare la presenza di CE nella popolazione oggetto dello studio, calcolato secondo il test di Youden, è risultato 61.5 kPa. Per quanto concerne gli indici non invasivi di fibrosi epatica l'APRI test e il Lok-index non sono risultati differenti tra i due gruppi.

Ulteriori differenze tra le due popolazioni a confronto si sono registrate: per la conta piastrinica, con conta sensibilmente più bassa nei pazienti che sviluppavano CE (100 Vs $78 \cdot 10^3/\text{mmc}$, $p=0,016$); per lo sviluppo di varici esofagee durante il follow-up, anch'esse più frequenti nei pazienti che sviluppavano CE ($p=0.033$); per l'occorrere di encefalopatia epatica durante il follow-up, più frequente nei pazienti con CE ($p<0,001$); per episodi di ospedalizzazione più frequenti nei pazienti con CE ($90,5\%$ Vs $25,4\%$, $p<0,001$); per la presenza di trombosi portale riscontrata all'ecografia addominale ($p=0.003$), sebbene questa sia stata riscontrata in soli 2 casi di pazienti con CE.

Fattori associati allo sviluppo di CE

All'analisi uni variata (Tabella 2) l'età (HR 1.073, p=0.003, C.I. 1.025-1.124), il BMI (HR 1.116, p=0,066, C.I. 0.993-1.253), la conta piastrinica (HR 0.990, p=0.090, C.I. 0.979-1.002), l'HVPG (HR 1.155, p=0.010, C.I. 1.035-1.289), la SSM (HR 1.031, p=0.050, C.I. 1.000-1.062), la presenza di varici esofagee (HR 3.471, p=0.047, C.I. 1.015-11.867) e la presenza di trombosi portale (HR 11.485, p=0.003, C.I. 2.303-57.258) erano associati allo sviluppo di CE.

All'analisi multivariata solamente l'età (HR 1.076, p=0.018, C.I. 1.026-1.128) e la SSM (HR 1.031, p=0.037, C.I. 1.002-1.068) si sono dimostrate variabili indipendentemente associate allo sviluppo di CE, con un LR-chi2 del modello di 14.85. La figura 3 mostra la sopravvivenza libera da CE durante il periodo dello studio per i pazienti arruolati.

DISCUSSIONE

L'obiettivo primario dello studio era la valutazione della presenza di fattori predittivi per lo sviluppo di epatocarcinoma in pazienti con cirrosi epatica compensata, in particolar modo del ruolo dell'elastometria epatica e splenica. Il risultato più rilevante è stato che un più alto valore di SSM e un'età avanzata sono stati identificati come gli unici predittori di CE durante il follow-up dei pazienti.

Il carcinoma epatocellulare (CE) è una complicanza frequente in pazienti con malattie croniche del fegato ed è uno dei più comuni tumori maligni in tutto il mondo[251]. Secondo le più recenti linee guida[2,140] l'ecografia addominale è riconosciuta come lo strumento di primario utilizzo per lo screening e la sorveglianza dei pazienti con cirrosi epatica od epatopatia cronica per identificare lo sviluppo di CE; l'identificazione precoce del CE consente sia l'utilizzo di trattamenti con eliminazione radicale del tumore (come la resezione epatica o le tecniche ablative percutanee), sia di preservare la maggior quota possibile di tessuto epatico non tumorale. Quindi, il riconoscimento dei fattori predittivi per lo sviluppo del CE e di altri eventi di scompenso della malattia epatica potrebbe consentire una gestione migliore di questi pazienti, sia in termini di follow-up che di trattamento.

Il CE si sviluppa usualmente in pazienti con epatopatia cronica e la cirrosi epatica è il più importante fattore di rischio per lo sviluppo del CE, indipendentemente dalla sua eziologia, tanto che il CE è riconosciuto in questi pazienti come una delle maggiori

cause di morte[24]. Alla base delle complicazioni dei pazienti cirrotici vi è lo sviluppo di ipertensione portale, la quale è direttamente correlata allo sviluppo di ascite, di varici esofagee e al loro sanguinamento, ed infine del carcinoma epatocellulare[338]. Studi recenti hanno infatti evidenziato un'aumentata incidenza di CE in pazienti con ipertensione portale clinicamente significativa[27–29] definita tale per valori di HVPG >10 mmHg. Di conseguenza, negli ultimi decenni è stata dedicata sempre una maggiore attenzione al riconoscimento degli strumenti diagnostici per la valutazione del grado di ipertensione portale[356,370,371]. Sebbene l'HVPG rappresenti ancora il metodo gold-standard per valutare la gravità dell'ipertensione portale[356], essendo una tecnica invasiva, costosa e non ampiamente diffusa[372], sono stati ricercati strumenti non invasivi per la valutazione del grado di ipertensione portale[332,373,374]. Molti autori si sono quindi orientati sulla valutazione del ruolo della LSM come predittore di CE, evidenziando un'incidenza crescente di CE associata ad aumentati valori di elastometria epatica [30]. Tuttavia, è stato documentato che la correlazione tra HVPG e LSM per la valutazione dell'ipertensione portale veniva persa quando l'HVPG era >10 mmHg[349]. Questa mancanza di correlazione è probabilmente dovuta al fatto che l'LSM potrebbe non essere in grado di considerare la componente iperdinamica dell'ipertensione portale e di altri fattori che contribuiscono ad essa come la vasodilatazione splancnica e la resistenza opposta al flusso sanguigno portale dai collaterali porto-sistemici[338], che non sono tutti direttamente correlati con la rigidità del fegato[349]. Il nostro gruppo di studio è stato il primo ad esplorare la correlazione tra la misurazione della rigidità della milza (SSM) e la gravità e la prognosi della malattia del fegato attraverso la correlazione con lo sviluppo di ipertensione portale, di varici esofagee e la valutazione della storia naturale dei pazienti cirrotici[346,352].

I risultati del presente studio mostrano per la prima volta che un incremento della SSM, che è un accurato surrogato di ipertensione portale, sia un predittore indipendente di epatocarcinoma in pazienti con cirrosi epatica compensata (HR 1.035, C.I. 1.002-1.068, $p=0,037$). I valori di SSM differiscono significativamente nel gruppo senza e con CE ($p=0.014$) e sono ben distinguibili utilizzando un cut-off di 61,5 kPa.

Questi risultati confermano quello dei precedenti studi secondo cui vi era aumentato rischio di CE in pazienti con CSPH (HVPG >10 mmHg)[27–29], nonché la nostra precedente esperienza per la valutazione di fattori predittivi non invasivi di eventi di scompenso epatico, tra cui erano inclusi alcuni pazienti che avevano sviluppato

CE[352]. A sostegno della correlazione tra il surrogato SSM o il gold standard HVPG e lo sviluppo di CE, è stata inoltre condotta una ulteriore analisi multivariata escludendo per collinearità di variabili la SSM ed includendo l'HVPG. Le due variabili, SSM e HVPG, sono infatti estremamente sovrapponibili e collineari (Rho di Spearman 0,637, $p < 0,001$), entrambe inoltre si distribuiscono in maniera simile nei gruppi di pazienti con CE e senza CE (Figura 3), distinguendosi nei due gruppi in maniera statisticamente significativa (rispettivamente per SSM $p = 0,014$, per HVPG $p = 0,001$). Da questa ulteriore suddetta analisi multivariata vi è emerso un modello predittivo che includeva l'età (HR 1.105, C.I. 1.041-1.171, $p = 0,001$), il BMI (HR 1.115, C.I. 0.980-1.268 $p = 0,098$) e l'HVPG (HR 1.216, C.I. 1.070-1.381, $p = 0,003$). Ne emerge quindi che l'utilizzo di SSM può rappresentare un test accurato, economico e non invasivo, potenzialmente sostitutivo dell'HVPG, per la predittività del CE.

La possibile spiegazione [375] di questi risultati e del legame tra ipertensione portale e sviluppo di CE potrebbe provenire dalle cicatrici ('scars') che si formano sul fegato cirrotico e che sono associate alla proliferazione vascolare, la quale a sua volta è causata da un deficit di ossigeno causato da shunt intraepatici, da lesioni trombotiche veno-occlusive, dalla riduzione dell'area sinusoidale, dalla capillarizzazione sinusoidale e dalla maggiore resistenza al flusso sanguigno[376]. Quindi, nei noduli formati in un fegato cirrotico vi è una maggiore espressione di fattori angiogenetici, principalmente mediante la produzione di fattore-1 ipossia-inducibile (HIF-1), e di altre citochine, che inducono sia la fibrogenesi che l'angiogenesi, le quali portano a loro volta all'ipertensione portale e alla carcinogenesi[377].

L'altro fattore indipendentemente associato allo sviluppo di CE all'analisi multivariata è l'età. In particolare, nel gruppo di pazienti studiato, l'età dei pazienti che sviluppavano epatocarcinoma era più alta rispetto ai soggetti che non lo sviluppavano (63 anni contro 56,5) confermando i dati già presenti in letteratura secondo cui il picco di incidenza di epatocarcinoma viene raggiunto in età avanzata a circa 70 anni[378]. L'età avanzata potrebbe essere lo specchio di una malattia epatica di lunga data e quindi più avanzata e maggiormente a rischio di sviluppo di CE, sebbene questo dato emerso dalla nostra specifica popolazione a maggior prevalenza di epatopatie HCV relate, andrebbe rivalutato alla luce delle nuove terapie eradicanti l'HCV.

In linea con i risultati già discussi riguardanti il ruolo dell'ipertensione portale e lo sviluppo di CE e parallelamente ai risultati di altri autori[25,379], le caratteristiche generali caratterizzanti la severità e il decorso della malattia epatica erano differenti tra i due gruppi in studio. In particolare nel gruppo dei soggetti con epatocarcinoma è stata registrata una conta piastrinica più bassa, una maggior presenza di soggetti con varici esofagee all'arruolamento e la presenza di trombosi portale. La conta piastrinica si è dimostrata essere un altro predittore indipendente di epatocarcinoma all'analisi univariata, confermando parzialmente i dati presenti in letteratura: secondo Degos e colleghi[380] la conta piastrinica ridotta era riscontrata tra i vari fattori predittori di epatocarcinoma (OR=0.99). Anche Velàquez e colleghi [381] in uno studio che includeva pazienti cirrotici di diversa eziologia, riscontrano età, conta piastrinica, i livelli di protrombina e la presenza di anticorpi per il virus C come fattori indipendentemente associati allo sviluppo di CE (OR 2.5). In aggiunta, in un ulteriore studio[24] la ridotta conta piastrinica si associava sia a CE che ad aumentata mortalità e ad una prognosi peggiore in pazienti che hanno un epatocarcinoma[382], nonché ad una recidiva post-trattamento del CE[383]. La bassa conta piastrinica riflette infatti un peggioramento della funzionalità epatica e si associa inoltre all'ipertensione portale e alla splenomegalia, entrambe complicazioni della malattia avanzata di fegato. Anche la presenza di varici esofagee, direttamente associata all'ipertensione portale e quindi allo sviluppo di CE, è stata identificata come predittore indipendente di CE all'analisi univariata, confermando precedenti dati presenti in letteratura[384].

Nel corso di circa 5 anni di follow-up totale, con una mediana di circa 3 anni di follow-up, abbiamo registrato 21 casi di epatocarcinoma su 92 pazienti arruolati (22,8%) (Figura 2): questo dato è in linea con quelli riportati in letteratura secondo cui approssimativamente dall'1 all'8% all'anno dei pazienti con cirrosi sviluppa un'epatocarcinoma[25]. Durante il follow-up dei pazienti sono stati riscontrati inoltre 9 casi di recidiva precoce di epatocarcinoma ed è emersa una differenza statisticamente significativa nel numero di ospedalizzazioni per causa epatica e per l'insorgenza di episodi di encefalopatia epatica.

Per quanto concerne altre differenze riscontrate tra i due gruppi (CE Vs non CE), nella nostra popolazione sono stati arruolati più soggetti di sesso maschile ma, contrariamente a quanto riportato in letteratura secondo cui sono più a rischio i soggetti di sesso maschile[140], non vi era una differenza significativa nell'incidenza di epatocarcinoma

tra i due sessi. Inoltre, nella popolazione arruolata sono state riscontrate differenze tra i due gruppi per quanto concerne il BMI, che è stato individuato essere anche un predittore indipendente di CE all'analisi univariata e nel modello multivariato che includeva l'HVPG, in accordo con le crescenti evidenze riportate in letteratura[385] secondo cui vi è un aumentato rischio di CE nei soggetti in sovrappeso o obesi. Non sono state registrate differenze di eziologia della cirrosi epatica tra i pazienti dei due gruppi (CE Vs non CE), sebbene, come suddetto, in entrambi i gruppi più del 70% fosse infetto dal virus dell'HCV, in linea con quanto riportato dai recenti report epidemiologici in letteratura[386] secondo cui nei paesi occidentali vi è una maggiore prevalenza di cirrosi epatica HCV relata che è la causa principale di epatocarcinoma. In aggiunta, l'arruolamento e il follow-up dei pazienti è iniziato in era pre DAA (Direct Antiviral Agents): successivamente molti pazienti sono stati trattati con questi nuovi farmaci secondo le più recenti linee guida internazionali[273] e raggiungendo una risposta virologica completa, ma non si è registrata differenza significativa di sviluppo di epatocarcinoma tra i pazienti trattati e non trattati ($p=0.983$), né tantomeno l'eradicazione virale si è dimostrata predittore di CE. Attualmente vi è un acceso dibattito in letteratura sull'argomento, difatti alcuni autori hanno mostrato inaspettatamente elevati tassi di ricorrenza e comparsa di CE dopo SVR[17–20], mentre i dati ottenuti in questo studio, in accordo a quelli di altri autori, hanno indicato che i pazienti con risposta virologica sostenuta ai DAA hanno un tasso di sviluppo simile di epatocarcinoma rispetto a quello ottenuto con regimi con IFN [21–23].

Non sono state riscontrate differenze significative tra i valori di MELD e la classe Child-Pugh delle valutazioni basali tra i due gruppi, sebbene questi fossero più alti nel gruppo dei pazienti con epatocarcinoma, verosimilmente a causa della selezione della popolazione effettuata con i criteri di arruolamento adottati. Dai nostri dati è inoltre emersa una differenza statisticamente significativa nei valori di LSM tra i due gruppi (con mediane rispettivamente di 34,3 nel gruppo con CE Vs 22,3 nel gruppo non CE, $p=0,011$) e all'analisi univariata effettuata sulla nostra popolazione la LSM raggiungeva valori borderline di significatività (HR 1.020, $p=0.139$, C.I.0.994-1.048). Un recente report dell'EASL[30] riporta diversi studi che mostrano un'associazione significativa tra alti valori di LSM e un aumentato rischio di sviluppo del tumore. In particolare, tra i lavori presenti nel report è interessante citare quello di Kim e colleghi[387], che evidenziano come l'elastometria epatica sia in grado di identificare i pazienti con cirrosi

sub-clinica che hanno un aumentato rischio di sviluppare CE in una popolazione di pazienti con epatopatia HBV relata, utilizzando un cut-off di 13 kPa. Sebbene nell'analisi preliminare da noi effettuata non siano stati individuati dei cut-off, il valore mediano di LSM per i pazienti che sviluppavano CE era sensibilmente più alto poiché il gruppo in studio era rappresentato da pazienti cirrotici, mentre nello studio di Kim si trattava di pazienti con epatopatia cronica HBV relata. Uno studio giapponese [333] e uno coreano [388] dimostrano che valori più alti LSM si associano ad un rischio significativamente più alto di sviluppare CE in pazienti rispettivamente con epatopatia HCV e HBV e che i cambiamenti nei valori di LSM nel tempo venivano correlati con il rischio di sviluppo di epatocarcinoma, configurando anche un'utilità della variazione della LSM[388]. Un ulteriore studio[389] evidenzia che l'elastometria epatica predice il rischio di morte e complicanze legate alla malattia di fegato tra cui il CE. In diversi studi asiatici l'elastometria epatica è stata utilizzata a sostituzione di altri parametri, nell'ambito di scores utilizzati per predire il rischio di epatocarcinoma in pazienti con epatopatia HBV-relata, come ad esempio per le modifiche attuate sullo score CU-HCC[166] sostituendo la definizione clinica di cirrosi epatica e al REACH-B [169] sostituendo i livelli di HBV-DNA. Lo stesso gruppo in un lavoro successivo a quest'ultimo studio ha confrontato quattro modelli predittivi di CE (CU-HCC, GAG-HCC, RAECH-B e LSM-HCC) con il REACH-B modificato; quest'ultimo presentava l'AUROC più alta in termini di predittività di CE a 3 e a 5 anni confrontata con tutti gli altri modelli [390]. Nella popolazione arruolata nel nostro studio non è stato possibile analizzare la performance diagnostica di questi scores poiché vi era una netta prevalenza di soggetti con epatopatia cronica HCV relata piuttosto che HBV-relata.

Nella popolazione oggetto dello studio, tra gli altri score non invasivi valutati e che sono stati sviluppati per la stadiazione e la prognosi della malattia epatica e dell'ipertensione portale, sono stati studiati il Lok-index e l'APRI test. Entrambi i test non si sono dimostrati differenti tra i due gruppi, né predittori indipendenti di CE, sebbene la differenza tra i gruppi CE Vs non CE del Lok-index tendesse alla significatività statistica. I dati presenti attualmente in letteratura sono contrastanti, nonostante la maggior parte degli autori propenda per un'utilità di questi test come predittori di epatocarcinoma. In particolare un recente studio[391] che ha confrontato 20 modelli sierici non invasivi in pazienti HCV trattati con terapie antivirali, ha evidenziato come predittori di CE esclusivamente l'albumina e la GGT. Un'ulteriore recente studio

di Paik e colleghi[392] che ha valutato anche il ruolo dell'APRI test come predittore di CE in un gruppo di pazienti con epatopatia HBV relata, ha evidenziato una buona accuratezza e stratificazione dei pazienti in base al rischio CE relato per l'applicazione di un modello combinato tra APRI test e Fib-4. Altri autori[393] hanno evidenziato una bassa accuratezza predittiva per il Lok-index nei confronti dell'epatocarcinoma se comparato con la performance diagnostica di altri scores.

Altri scores non invasivi utilizzati in epatologia come surrogati di ipertensione portale e quindi delle complicazioni della cirrosi epatica sono il PH risk score[345] e l'LSPS (liver stiffness x spleen diameter/platelet count)[394]; quest'ultimo è stato valutato in uno studio di Shin e colleghi[395] dimostrandosi un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di CE, riuscendo a stratificare i pazienti in 3 gruppi di rischio per lo stesso. Purtroppo, nella popolazione oggetto dello studio abbiamo preferito non applicare questi scores poiché nel 25% dei soggetti arruolati non era disponibile il dato relativo al diametro splenico e tra questi soggetti erano inclusi circa il 40% dei soggetti con CE.

Recentemente è stato proposto dall'Università di Toronto e validato in una coorte esterna di pazienti[396], un sistema di scoring per la predittività a 5 e 10 anni di CE, che include età, sesso, eziologia e piastrine; lo score distingue i pazienti in tre classi di rischio per CE. Parallelamente a queste esperienze di altri autori abbiamo provato ad elaborare un nomogramma a partire dai nostri dati, fornendo quindi uno strumento di rapido utilizzo e facile interpretazione da parte del clinico (Figura 4), che determina il rischio specifico del paziente, e con un focus particolare sulla storia della malattia di fegato del paziente e sulla sua gravità. Questo strumento potrebbe fornire ulteriori dati prognostici relati al paziente, in modo da attuare una ottimale gestione dello stesso.

La forza del nostro studio è che siamo stati in grado di esplorare in un singolo centro di terzo livello l'insorgenza di CE in una coorte di soggetti con cirrosi epatica compensata, quindi qualsiasi variabilità legata all'effettuazione dell'elastometria epato-splenica, delle altre metodiche strumentali e della diagnosi di CE dovrebbe essere stata evitata o almeno minimizzata. Inoltre solo il 10% circa dei pazienti arruolati è stato perso al follow-up. Per quanto riguarda la fattibilità di LSM e SSM, la misurazione della rigidità della milza (SSM) ha prodotto risultati non validi in 16 pazienti su 140 (11.4%) (Figura 1) e la LSM non era valida in 7 di questi 16 pazienti (5% su 140 pazienti). Questi dati sono abbastanza in accordo con quelli riportati nella letteratura

disponibile[346,347,358,364,397], che riportano percentuali di risultati non validi nell'effettuazione della metodica variabili dal 10% a circa il 15%. Tuttavia sia per la numerosità campionaria dello studio che per la possibile presenza di altri fattori non esplorati in questo studio e che potrebbero svolgere un ruolo predittivo nei confronti del CE, l'attuale accuratezza predittiva sembra quanto meno moderata per costruire un modello predittivo accurato. Di conseguenza sono necessari ulteriori studi per convalidare i risultati attuali e per esplorare il possibile ruolo di altri predittori. Infatti, sulla base dei risultati preliminari di questo studio, è stato pianificato dal nostro gruppo di ricerca uno studio multicentrico internazionale finalizzato a valutare la predittività della misurazione dell'elastometria splenica effettuata con una sonda e un software dedicati allo studio della milza, nei confronti dell'epatocarcinoma.

CONCLUSIONI

Dai risultati del nostro studio è possibile evidenziare come l'ipertensione portale giochi un ruolo fondamentale nel processo di cancerogenesi; difatti, elevati valori di elastometria splenica o un aumentato gradiente pressorio venoso epatico, in associazione all'età avanzata del paziente si sono dimostrati come gli unici predittori indipendenti di carcinoma epatocellulare. Questi dati sottolineano inoltre la crescente validità prognostica dei tests non invasivi di ipertensione portale e nello specifico caso, dell'elastometria splenica. È stato inoltre elaborato un nomogramma per la determinazione del rischio specifico di sviluppo di CE del paziente. Sono tuttavia necessari ulteriori studi sia per ampliare la casistica che il follow-up dei pazienti in modo da confermare e validare questi risultati preliminari.

	Popolazione Generale (n=92) Mediana (IQR) o n(%).		No CE (n=71) Mediana (IQR) o n(%).		CE (n=21) Mediana (IQR) o n(%).		p
Età	59.5	49.5-70.5	57	49-69	66	57-74	0.013
Sesso (M)	65	70%	49	53%	16	17%	0.526
BMI	25.7	23.8-28.2	25.1	23.5-27.7	26.9	24.9-29.4	0.0324
Eziologia							0.566
HBV	4	4,3	4	5,6	0	0,0	
HCV	73	79,3	56	78,9	17	81,0	
Alcol	13	14,1	10	14,1	3	14,3	
Alcol+HCV	2	2,2	1	1,4	1	4,8	
HCV+HBV	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Terapia antivirale per HCV	59	64,1	48	67,6	11	52,4	0.297
SVR HCV	48	52,2	41	57,7	7	33,3	0.983
EV all'arruolamento	55	59,8	38	53,5	17	81,0	0.033
HRV all'arruolamento	17	18,5	11	15,5	6	28,6	0.195
Valutazioni di follow-up							
Episodi di ascite	22	23,9	14	19,7	8	38,1	0.083
Episodi Sanguinamento da EV	6	6,5	5	7,0	1	4,8	0.710
Episodi di encefalopatia epatica	8	8,7	2	2,8	6	28,6	<0.001
Ospedalizzazione	37	40,2	18	25,4	19	90,5	<0.001
Trapianto epatico	3	3,3	1	1,4	2	9,5	0.066
TIPSS	0	0,0	0	0,0	0	0,0	Na
Esami di laboratorio							
PLT (*10 ³ /mm ³)	97.5	65.5-136	100	70-143	78	55-101	0.0162
INR	1.19	1.12-1.26	1.18	1.1-1.26	1.25	1.15-1.27	0.202
ALT (UI/L)	63	32.5-109	63	31-114	65	33-81	0.741
AST (UI/L)	71.5	36-106.5	71	38-106	78	36-107	0.940

ALP (UI/L)	103	75.5-1083.5	101.5	75-131	122.5	88-176	0.191
GGT (UI/L)	76	44-105	66	40-103	97.5	47.5-107	0.257
Bilirubina (mg/dl)	0.84	0.7-1.4	0.76	0.64-1.23	1	0.82-1.67	0.0323
Creatinina (mg/dl)	0.76	0.67-0.87	0.74	0.67-0.86	0.79	0.68-0.9	0.567
Albumina (gr/dl)	3.9	3.6-4.1	4	3.6-4.1	3.8	3.5-4.1	0.578
Ecografia addominale							
Diametro longitudinale Milza (cm)	14	12.8-15.7	14	12.7-15.6	15	13-16	0.268
Area Milza (cm ²)	68.1	54-85	67.6	55-82	71	49-97	0.9822
Trombosi portale	2	2.2	0	0	2	9.5	0.003
LSM (kpa)	23.1	16.7-34.3	22.3	14.8-30.7	34.3	20.6-33.3	0.011
SSM (kpa)	52.6	37.4-66.9	50.2	36.3-60.4	65.4	49.7-75	0.014
HVPG (mmHg)	12	9-15	12	9-14	16	13-19	0.001
Meld	9	8-10	9	8-10	9	8-10	0.439
Child pugh	5	5-6	5	5-5	5	5-6	0.177
Apri	1.73	0.85-3.08	1.58	0.76-3.05	2.41	1.42-3.62	0.118
Lok-index	0.76	0.59-0.87	0.75	0.57-0.86	0.81	0.75-0.90	0.063

Tabella 1. Caratteristiche generali dei pazienti, e suddivisione nei due gruppi di confronto: pazienti che non sviluppano CE (n=71) e pazienti che sviluppano CE (n=21); CE= carcinoma epatocellulare.

	Hazard Ratio	P	[95% Conf. Interval]	Hazard Ratio	p	[95% Conf. Interval]
Età (anni)	1.073	0.003	1.025-1.124	1.076	0.018	1.026-1.128
Sesso	1.011	0.983	0.362-2.829			
BMI	1.116	0.066	0.993-1.253			
SVR HCV	1.037	0.973	1.127-8.439			
Varici	3.471	0.047	1.015-11.867			
HRV	1.390	0.505	0.527-3.671			
PLT (10 ³ /mm ³)	0.990	0.090	0.979-1.002			
GGT (mg/dl)	0.998	0.469	0.994-1.003			
Bilirubina totale (mg/dl)	1.16	0.612	0.654-2.060			
Urea (mg/dl)	0.998	0.772	0.984-1.012			
INR	9.450	0.189	0.331-269.741			
AST (UI/L)	1.004	0.469	0.994-1.013			
ALT (UI/L)	0.999	0.780	0.989-1.008			
ALP (UI/L)	1.004	0.389	0.995-1.011			
Creatinina (mg/dl)	2.781	0.285	0.426-18.148			
Albumina (gr/dl)	0.547	0.253	0.194-1.540			
Diametro longitudinale milza (cm)	0.984	0.898	0.773-1.253			
Area splenica (cm ²)	1.001	0.916	0.980-1.024			
Trombosi portale	11.485	0.003	2.303-57.258			
LSM (kpa)	1.020	0.139	0.994-1.048			
SSM (kpa)	1.031	0.050	1.000-1.062	1.035	0.037	1.002-1.068
HVPG (mm Hg)	1.155	0.010	1.035-1.289			
Meld	1.039	0.701	0.854-1.264			
Child pugh	1.300	0.348	0.751-2.251			
Apri-test	1.149	0.117	0.966-1.368			
Lok-index	9.815	0.133	0.498-193.289			

Tabella 2. Fattori di rischio per lo sviluppo di CE: analisi uni e multivariata. CE= carcinoma epatocellulare,

Figura 1. Flow chart dello studio. CE= carcinoma epatocellulare,

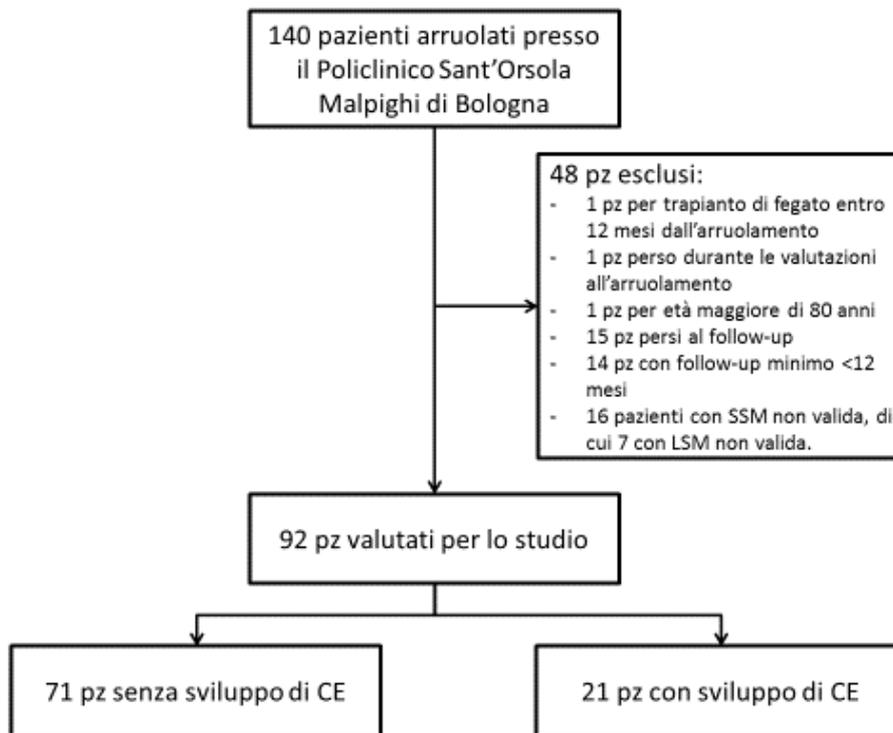


Figura 2. Curva Kaplan Meier di sopravvivenza libera da CE.

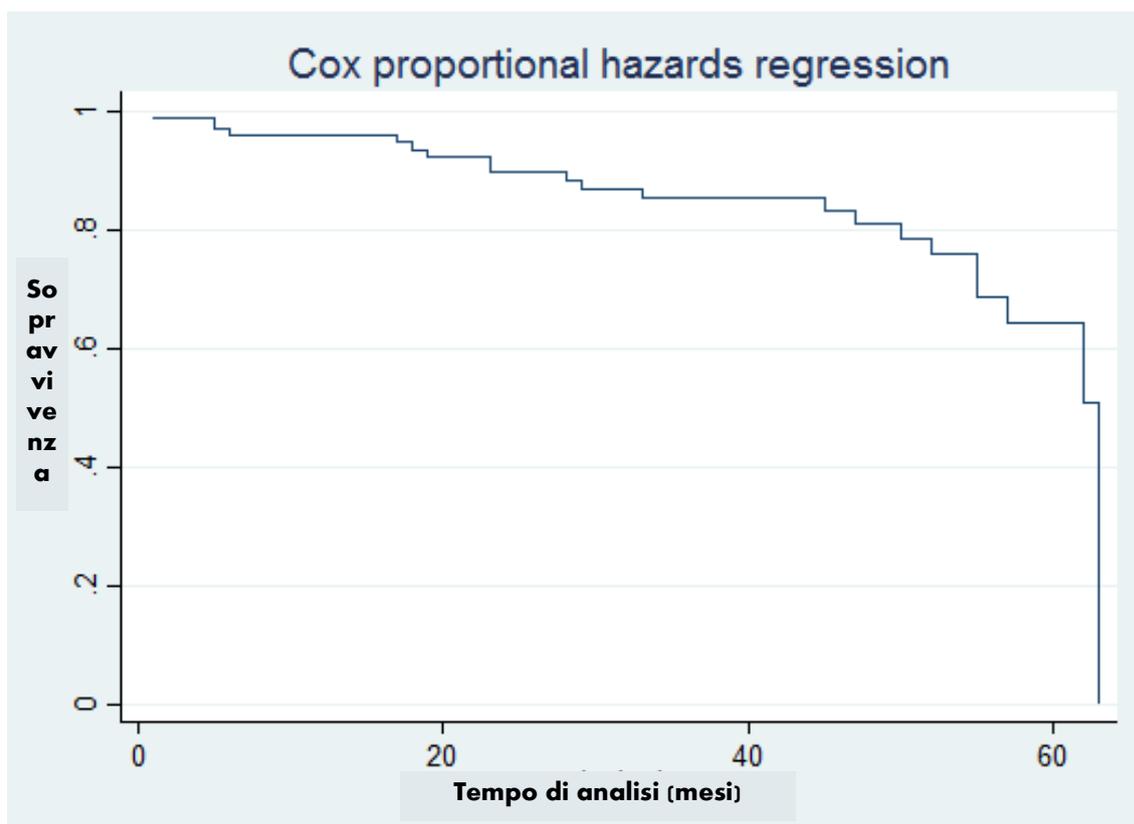


Figura 3. Relazioni tra SSM e CE, HVPG e CE, SSM e CSPH ($p < 0,05$).

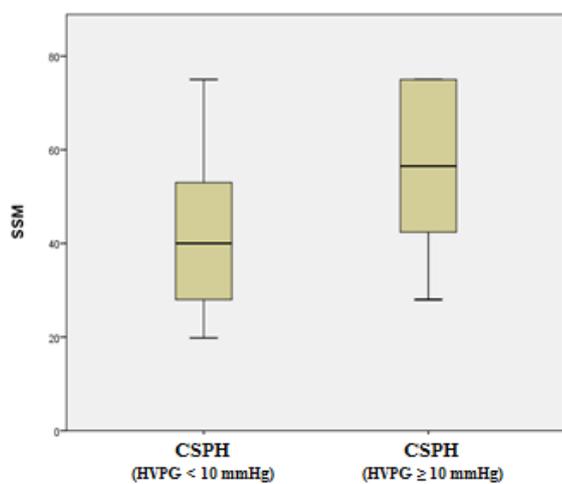
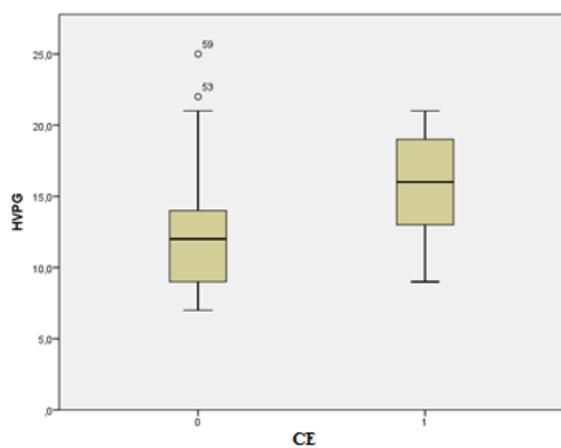
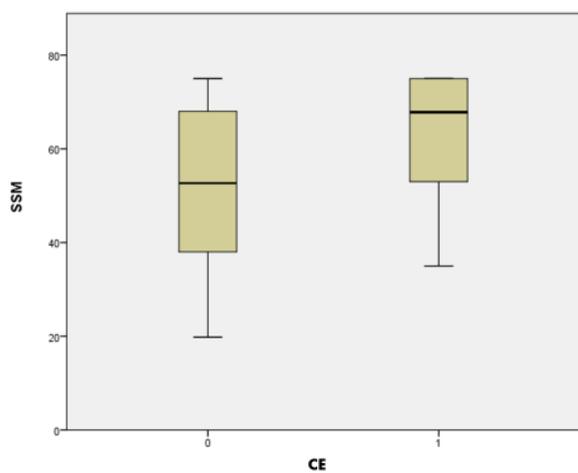
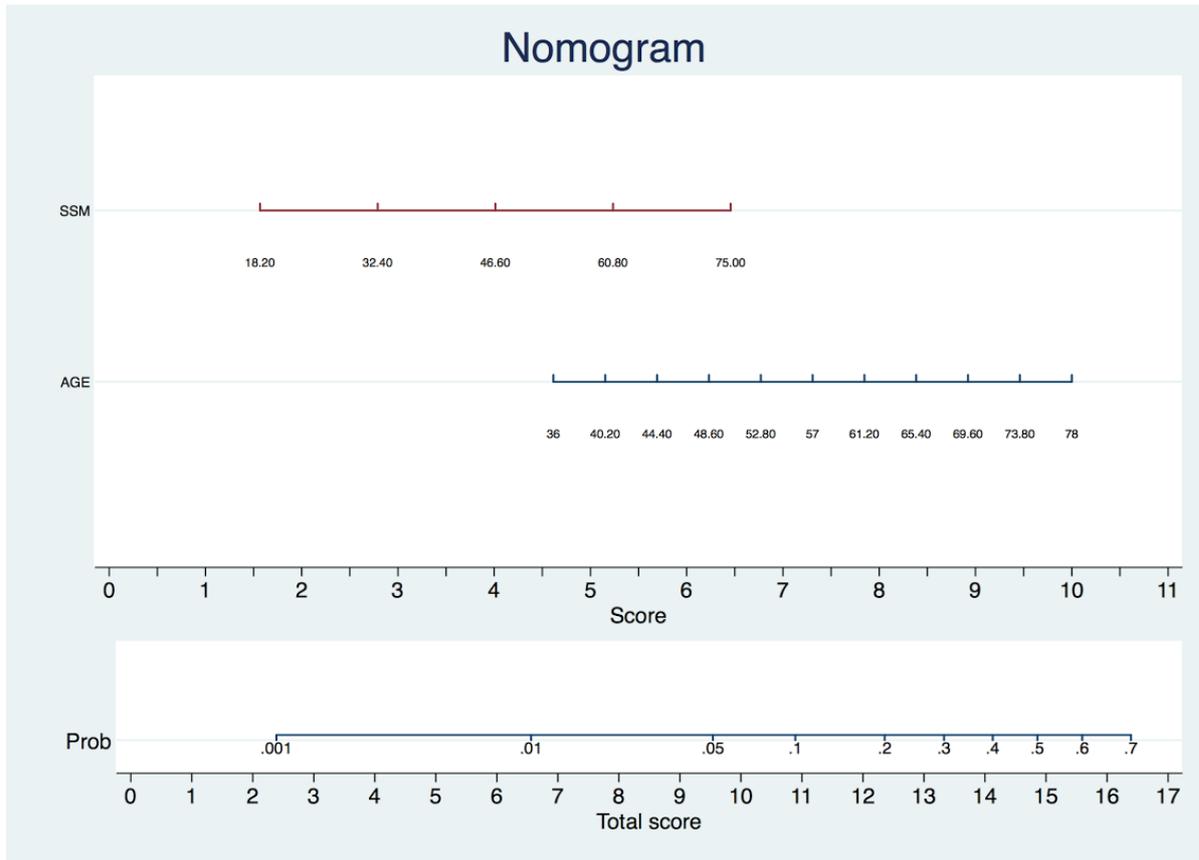


Figura 4. Nomogramma per rischio di sviluppo di CE in pazienti con cirrosi epatica compensata. [In nomogrammi con una variabile, per calcolare la probabilità di CE, traccia una linea verticale dal predittore all'asse del rischio. Per il nomogramma con due variabili (SSM ed AGE (età), traccia una linea verticale da ciascun asse dei predittori alla prima riga punti ("score"). Aggiungere i punti totali e tracciare una linea verticale dall'asse dei "punti totali"("total score") all'asse del rischio per calcolare il rischio individuale di CE].



BIBLIOGRAFIA

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359–86. doi:10.1002/ijc.29210.
- [2] Heimbach J, Kulik LM, Finn R, Sirlin CB, Abecassis M, Roberts LR, et al. Aasld guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2017. doi:10.1002/hep.29086.
- [3] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11–30. doi:10.3322/caac.21166.
- [4] Okuda K. Epidemiology of primary liver cancer. *Prim. Liver Cancer Japan*, Tokyo: Springer Japan; 1992, p. 3–15. doi:10.1007/978-4-431-68177-9_1.
- [5] Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 2007;317:121–4. doi:10.1126/science.1140485.
- [6] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:1118–27. doi:10.1056/NEJMra1001683.
- [7] El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;126:460–8.
- [8] Lafaro KJ, Demirjian AN, Pawlik TM. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2015;24:1–17. doi:10.1016/j.soc.2014.09.001.
- [9] Choo SP, Tan WL, Goh BKP, Tai WM, Zhu AX. Comparison of hepatocellular carcinoma in Eastern versus Western populations. *Cancer* 2016;122:3430–46. doi:10.1002/cncr.30237.
- [10] Dal Maso L, Lise M, Zambon P, Crocetti E, Serraino D, Ricceri F, et al. Incidence of primary liver cancer in Italy between 1988 and 2002: an age-period-cohort analysis. *Eur J Cancer* 2008;44:285–92. doi:10.1016/j.ejca.2007.11.009.
- [11] Franceschi S, Raza SA. Epidemiology and prevention of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2009;286:5–8. doi:10.1016/j.canlet.2008.10.046.
- [12] Makarova-Rusher O V, Altekruse SF, McNeel TS, Ulahannan S, Duffy AG, Graubard BI, et al. Population attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. *Cancer* 2016;122:1757–65. doi:10.1002/cncr.29971.
- [13] Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014;28:753–70. doi:10.1016/j.bpg.2014.08.007.
- [14] El-Serag HB, Davila JA, Petersen NJ, McGlynn KA. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann Intern Med* 2003;139:817–23.
- [15] Njei B, Rotman Y, Ditah I, Lim JK. Emerging trends in hepatocellular carcinoma incidence and mortality. *Hepatology* 2015;61:191–9. doi:10.1002/hep.27388.
- [16] Kao J-H. Hepatitis B vaccination and prevention of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2015;29:907–17. doi:10.1016/j.bpg.2015.09.011.
- [17] Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *J Hepatol* 2016;65:727–33. doi:10.1016/j.jhep.2016.06.015.
- [18] Reig M, Mariño Z, Perelló C, Iñarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J Hepatol* 2016;65:719–26. doi:10.1016/j.jhep.2016.04.008.
- [19] Kozbial K, Moser S, Schwarzer R, Laferl H, Al-Zoairy R, Stauber R, et al. Unexpected high

- incidence of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with sustained virologic response following interferon-free direct-acting antiviral treatment. *J Hepatol* 2016;65:856–8. doi:10.1016/j.jhep.2016.06.009.
- [20] Yang JD, Aqel BA, Pungpapong S, Gores GJ, Roberts LR, Leise MD. Direct acting antiviral therapy and tumor recurrence after liver transplantation for hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016;65:859–60. doi:10.1016/j.jhep.2016.06.023.
- [21] ANRS collaborative study group on hepatocellular carcinoma (ANRS CO22 HEPATHER CC and CC cohorts). Lack of evidence of an effect of direct-acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma: Data from three ANRS cohorts. *J Hepatol* 2016;65:734–40. doi:10.1016/j.jhep.2016.05.045.
- [22] Torres HA, Vauthey J-N, Economides MP, Mahale P, Kaseb A. Hepatocellular carcinoma recurrence after treatment with direct-acting antivirals: First, do no harm by withdrawing treatment. *J Hepatol* 2016;65:862–4. doi:10.1016/j.jhep.2016.05.034.
- [23] Cammà C, Cabibbo G, Craxi A. Direct antiviral agents and risk for HCC early recurrence: Much ado about nothing. *J Hepatol* 2016;65:861–2. doi:10.1016/j.jhep.2016.04.033.
- [24] Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology* 2006;43:1303–10. doi:10.1002/hep.21176.
- [25] Ioannou GN, Splan MF, Weiss NS, McDonald GB, Beretta L, Lee SP. Incidence and Predictors of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:938–945.e4. doi:10.1016/j.cgh.2007.02.039.
- [26] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006;45:529–38. doi:10.1016/j.jhep.2006.05.013.
- [27] Ripoll C, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace N, Burroughs A, et al. Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J Hepatol* 2009;50:923–8. doi:10.1016/j.jhep.2009.01.014.
- [28] Kim MY, Baik SK, Yea CJ, Lee IY, Kim HJ, Park KW, et al. Hepatic venous pressure gradient can predict the development of hepatocellular carcinoma and hyponatremia in decompensated alcoholic cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:1241–6. doi:10.1097/MEG.0b013e32832a21c1.
- [29] Suk KT, Kim EJ, Kim DJ, Kim HS, Bang CS, Park TY, et al. Prognostic Significance of Hemodynamic and Clinical Stages in the Prediction of Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2016;51:1. doi:10.1097/MCG.0000000000000671.
- [30] European Association for Study of Liver, Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hgado. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 2015;63:237–64. doi:10.1016/j.jhep.2015.04.006.
- [31] Zaltron S, Spinetti A, Biasi L, Banguera C, Castelli F. Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. *BMC Infect Dis* 2012;12 Suppl 2:S2. doi:10.1186/1471-2334-12-S2-S2.
- [32] Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. *Gastroenterology* 2004;127:1372–80.
- [33] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557–76. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061.
- [34] Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34:809–16. doi:10.1053/jhep.2001.27831.

- [35] Tsai W-L, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010;29:2309–24. doi:10.1038/onc.2010.36.
- [36] Budhu A, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol* 2006;80:1197–213. doi:10.1189/jlb.0506297.
- [37] Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998;4:1065–7. doi:10.1038/2053.
- [38] Kamegaya Y, Hiasa Y, Zukerberg L, Fowler N, Blackard JT, Lin W, et al. Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2005;41:660–7. doi:10.1002/hep.20621.
- [39] Maki A, Kono H, Gupta M, Asakawa M, Suzuki T, Matsuda M, et al. Predictive power of biomarkers of oxidative stress and inflammation in patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007;14:1182–90. doi:10.1245/s10434-006-9049-1.
- [40] Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, Belperio P, Halloran J, Mole LA. A sustained virologic response reduces risk of all-cause mortality in patients with hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:509–516.e1. doi:10.1016/j.cgh.2011.03.004.
- [41] Singal AG, Volk ML, Jensen D, Di Bisceglie AM, Schoenfeld PS. A sustained viral response is associated with reduced liver-related morbidity and mortality in patients with hepatitis C virus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:280–8, 288.e1. doi:10.1016/j.cgh.2009.11.018.
- [42] George SL, Bacon BR, Brunt EM, Mihindukulasuriya KL, Hoffmann J, Di Bisceglie AM. Clinical, virologic, histologic, and biochemical outcomes after successful HCV therapy: a 5-year follow-up of 150 patients. *Hepatology* 2009;49:729–38. doi:10.1002/hep.22694.
- [43] van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, Wedemeyer H, Dufour J-F, Lammert F, et al. Association Between Sustained Virological Response and All-Cause Mortality Among Patients With Chronic Hepatitis C and Advanced Hepatic Fibrosis. *JAMA* 2012;308:2584. doi:10.1001/jama.2012.144878.
- [44] Lok ASF. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, vol. 127, 2004, p. S303–9. doi:10.1053/j.gastro.2004.09.045.
- [45] Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet (London, England)* 1981;2:1129–33.
- [46] Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993;328:1797–801. doi:10.1056/NEJM199306243282501.
- [47] Yu MW, Chen CJ. Hepatitis B and C viruses in the development of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994;17:71–91.
- [48] Sherman M, Peltekian KM, Lee C. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* 1995;22:432–8.
- [49] Villeneuve JP, Desrochers M, Infante-Rivard C, Willems B, Raymond G, Bourcier M, et al. A long-term follow-up study of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive carriers in Montreal. *Gastroenterology* 1994;106:1000–5.
- [50] Chen J-D, Yang H-I, Iloeje UH, You S-L, Lu S-N, Wang L-Y, et al. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology* 2010;138:1747–54. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.042.
- [51] Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH, Lu P, Harris CC, Wang N, et al. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology*

- 2002;36:1214–20. doi:10.1053/jhep.2002.36366.
- [52] Chen C-J, Yang H-I, Iloeje UH. Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009;49:S72-84. doi:10.1002/hep.22884.
- [53] Yang H-I, Lu S-N, Liaw Y-F, You S-L, Sun C-A, Wang L-Y, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002;347:168–74. doi:10.1056/NEJMoa013215.
- [54] McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2009;49:S45-55. doi:10.1002/hep.22898.
- [55] Tseng T-C, Liu C-J, Yang H-C, Su T-H, Wang C-C, Chen C-L, et al. High levels of hepatitis B surface antigen increase risk of hepatocellular carcinoma in patients with low HBV load. *Gastroenterology* 2012;142:1140-1149-4. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.007.
- [56] Dragosics B, Ferenci P, Hitchman E, Denk H. Long-term follow-up study of asymptomatic HBsAg-positive voluntary blood donors in Austria: a clinical and histologic evaluation of 242 cases. *Hepatology* n.d.;7:302–6.
- [57] Yu MW, You SL, Chang AS, Lu SN, Liaw YF, Chen CJ. Association between hepatitis C virus antibodies and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res* 1991;51:5621–5.
- [58] Benvegnù L, Fattovich G, Noventa F, Tremolada F, Chemello L, Cecchetto A, et al. Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study. *Cancer* 1994;74:2442–8.
- [59] Ji J, Sundquist K, Sundquist J. A population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:790–2. doi:10.1093/jnci/djs168.
- [60] Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003;37:19–26. doi:10.1053/jhep.2003.50036.
- [61] Simonetti J, Bulkow L, McMahon BJ, Homan C, Snowball M, Negus S, et al. Clearance of hepatitis B surface antigen and risk of hepatocellular carcinoma in a cohort chronically infected with hepatitis B virus. *Hepatology* 2010;51:1531–7. doi:10.1002/hep.23464.
- [62] Yuen M-F, Wong DK-H, Fung J, Ip P, But D, Hung I, et al. HBsAg Seroclearance in chronic hepatitis B in Asian patients: replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;135:1192–9. doi:10.1053/j.gastro.2008.07.008.
- [63] Goldstein ST. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol* 2005;34:1329–39. doi:10.1093/ije/dyi206.
- [64] Sung JY, Tsoi KKF, Wong VWS, Li KCT, Chan HLY. Meta-analysis: Treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:1067–77. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03816.x.
- [65] Papatheodoridis G V, Lampertico P, Manolakopoulos S, Lok A. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide therapy: a systematic review. *J Hepatol* 2010;53:348–56. doi:10.1016/j.jhep.2010.02.035.
- [66] Shen Y-C, Hsu C, Cheng C-C, Hu F-C, Cheng A-L. A critical evaluation of the preventive effect of antiviral therapy on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C or B: a novel approach by using meta-regression. *Oncology* 2012;82:275–89. doi:10.1159/000337293.
- [67] Singal AK, Salameh H, Kuo Y-F, Fontana RJ. Meta-analysis: the impact of oral anti-viral agents on the incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:98–106. doi:10.1111/apt.12344.
- [68] Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl* 1987;7:1–440.

- [69] Wild CP, Hall AJ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutat Res* 2000;462:381–93.
- [70] Sun C-A, Wu D-M, Wang L-Y, Chen C-J, You S-L, Santella RM. Determinants of formation of aflatoxin-albumin adducts: a seven-township study in Taiwan. *Br J Cancer* 2002;87:966–70. doi:10.1038/sj.bjc.6600584.
- [71] Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991;350:427–8. doi:10.1038/350427a0.
- [72] Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet (London, England)* 1992;339:943–6.
- [73] Kuang S-Y, Lekawanvijit S, Maneekarn N, Thongsawat S, Brodovicz K, Nelson K, et al. Hepatitis B 1762T/1764A mutations, hepatitis C infection, and codon 249 p53 mutations in hepatocellular carcinomas from Thailand. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:380–4. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0380.
- [74] Chen J-G, Egner PA, Ng D, Jacobson LP, Muñoz A, Zhu Y-R, et al. Reduced aflatoxin exposure presages decline in liver cancer mortality in an endemic region of China. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013;6:1038–45. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0168.
- [75] Alcohol drinking. IARC Working Group, Lyon, 13-20 October 1987. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1988;44:1–378.
- [76] Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002;155:323–31.
- [77] Yuan J-M, Govindarajan S, Arakawa K, Yu MC. Synergism of alcohol, diabetes, and viral hepatitis on the risk of hepatocellular carcinoma in blacks and whites in the U.S. *Cancer* 2004;101:1009–17. doi:10.1002/cncr.20427.
- [78] Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet (London, England)* 1997;349:825–32.
- [79] Marrero JA, Fontana RJ, Fu S, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005;42:218–24. doi:10.1016/j.jhep.2004.10.005.
- [80] Turati F, Galeone C, Rota M, Pelucchi C, Negri E, Bagnardi V, et al. Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol* 2014;25:1526–35. doi:10.1093/annonc/mdu020.
- [81] Heckley GA, Jarl J, Asamoah BO, G-Gerdtham U. How the risk of liver cancer changes after alcohol cessation: a review and meta-analysis of the current literature. *BMC Cancer* 2011;11:446. doi:10.1186/1471-2407-11-446.
- [82] Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002;123:134–40.
- [83] Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M, Taniai M, Torii N, Tokushige K, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2009;44 Suppl 19:89–95. doi:10.1007/s00535-008-2262-x.
- [84] Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA-R, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:1972–8. doi:10.1002/hep.23527.
- [85] Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arai S, Imai Y, et al. Characteristics of patients

- with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:428–33; quiz e50. doi:10.1016/j.cgh.2011.01.023.
- [86] Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:124–31.e1. doi:10.1016/j.cgh.2015.07.019.
- [87] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625–38. doi:10.1056/NEJMoa021423.
- [88] Ohki T, Tateishi R, Sato T, Masuzaki R, Imamura J, Goto T, et al. Obesity is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:459–64. doi:10.1016/j.cgh.2008.02.012.
- [89] Loomba R, Yang H-I, Su J, Brenner D, Barrett-Connor E, Iloeje U, et al. Synergism between obesity and alcohol in increasing the risk of hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 2013;177:333–42. doi:10.1093/aje/kws252.
- [90] Campbell PT, Newton CC, Freedman ND, Koshiol J, Alavanja MC, Beane Freeman LE, et al. Body Mass Index, Waist Circumference, Diabetes, and Risk of Liver Cancer for U.S. Adults. *Cancer Res* 2016;76:6076–83. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0787.
- [91] Welzel TM, Graubard BI, Zeuzem S, El-Serag HB, Davila JA, McGlynn KA. Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database. *Hepatology* 2011;54:463–71. doi:10.1002/hep.24397.
- [92] Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2016;375:794–8. doi:10.1056/NEJMs1606602.
- [93] Seyda Seydel G, Kucukoglu O, Altinbasv A, Demir OO, Yilmaz S, Akkiz H, et al. Economic growth leads to increase of obesity and associated hepatocellular carcinoma in developing countries. *Ann Hepatol* n.d.;15:662–72. doi:10.5604/16652681.1212316.
- [94] Koh JC, Loo WM, Goh KL, Sugano K, Chan WK, Chiu WYP, et al. Asian consensus on the relationship between obesity and gastrointestinal and liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2016;31:1405–13. doi:10.1111/jgh.13385.
- [95] Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202–19. doi:10.1053/jhep.2003.50193.
- [96] Welzel TM, Graubard BI, Zeuzem S, El-Serag HB, Davila JA, McGlynn KA. Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database. *Hepatology* 2011;54:463–71. doi:10.1002/hep.24397.
- [97] Hashimoto E, Yatsuji S, Tobar M, Taniai M, Torii N, Tokushige K, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2009;44 Suppl 1:89–95. doi:10.1007/s00535-008-2262-x.
- [98] Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA-R, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:1972–8. doi:10.1002/hep.23527.
- [99] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:4–14. doi:10.1016/j.diabres.2009.10.007.
- [100] Wang C, Wang X, Gong G, Ben Q, Qiu W, Chen Y, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Int J Cancer* 2012;130:1639–48. doi:10.1002/ijc.26165.
- [101] Hagberg KW, McGlynn KA, Sahasrabuddhe V V, Jick S. Anti-diabetic medications and risk of

- primary liver cancer in persons with type II diabetes. *Br J Cancer* 2014;111:1710–7. doi:10.1038/bjc.2014.447.
- [102] Tsan Y-T, Lee C-H, Wang J-D, Chen P-C. Statins and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. *J Clin Oncol* 2012;30:623–30. doi:10.1200/JCO.2011.36.0917.
- [103] Tsan Y-T, Lee C-H, Ho W-C, Lin M-H, Wang J-D, Chen P-C. Statins and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Clin Oncol* 2013;31:1514–21. doi:10.1200/JCO.2012.44.6831.
- [104] Hsiang JC, Wong GL-H, Tse Y-K, Wong VW-S, Yip TC-F, Chan HL-Y. Statin and the risk of hepatocellular carcinoma and death in a hospital-based hepatitis B-infected population: A propensity score landmark analysis. *J Hepatol* 2015;63:1190–7. doi:10.1016/j.jhep.2015.07.009.
- [105] Singh S, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W. Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2013;144:323–32. doi:10.1053/j.gastro.2012.10.005.
- [106] Freedman ND, Cross AJ, McGlynn KA, Abnet CC, Park Y, Hollenbeck AR, et al. Association of meat and fat intake with liver disease and hepatocellular carcinoma in the NIH-AARP cohort. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:1354–65. doi:10.1093/jnci/djq301.
- [107] Cross AJ, Leitzmann MF, Gail MH, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Sinha R. A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk. *PLoS Med* 2007;4:e325. doi:10.1371/journal.pmed.0040325.
- [108] Luo J, Yang Y, Liu J, Lu K, Tang Z, Liu P, et al. Systematic review with meta-analysis: meat consumption and the risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39:913–22. doi:10.1111/apt.12678.
- [109] Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, et al. Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012;142:1468–75. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.018.
- [110] Fedirko V, Trichopolou A, Bamia C, Duarte-Salles T, Trepo E, Aleksandrova K, et al. Consumption of fish and meats and risk of hepatocellular carcinoma: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2013;24:2166–73. doi:10.1093/annonc/mdt168.
- [111] Yang Y, Zhang D, Feng N, Chen G, Liu J, Chen G, et al. Increased intake of vegetables, but not fruit, reduces risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2014;147:1031–42. doi:10.1053/j.gastro.2014.08.005.
- [112] Huang R-X, Duan Y-Y, Hu J-A. Fish intake and risk of liver cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2015;10:e0096102. doi:10.1371/journal.pone.0096102.
- [113] Bamia C, Lagiou P, Jenab M, Aleksandrova K, Fedirko V, Trichopoulos D, et al. Fruit and vegetable consumption in relation to hepatocellular carcinoma in a multi-centre, European cohort study. *Br J Cancer* 2015;112:1273–82. doi:10.1038/bjc.2014.654.
- [114] Zhang W, Shu X-O, Li H, Yang G, Cai H, Ji B-T, et al. Vitamin intake and liver cancer risk: a report from two cohort studies in China. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:1173–81. doi:10.1093/jnci/djs277.
- [115] Deugnier YM, Guyader D, Crantock L, Lopez JM, Turlin B, Yaouanq J, et al. Primary liver cancer in genetic hemochromatosis: a clinical, pathological, and pathogenetic study of 54 cases. *Gastroenterology* 1993;104:228–34.
- [116] Perlmutter DH. Pathogenesis of chronic liver injury and hepatocellular carcinoma in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Pediatr Res* 2006;60:233–8. doi:10.1203/01.pdr.0000228350.61496.90.

- [117] Polio J, Enriquez RE, Chow A, Wood WM, Atterbury CE. Hepatocellular carcinoma in Wilson's disease. Case report and review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 1989;11:220–4.
- [118] Stewart MF. Review of hepatocellular cancer, hypertension and renal impairment as late complications of acute porphyria and recommendations for patient follow-up. *J Clin Pathol* 2012;65:976–80. doi:10.1136/jclinpath-2012-200791.
- [119] Yu MC, Tong MJ, Govindarajan S, Henderson BE. Nonviral risk factors for hepatocellular carcinoma in a low-risk population, the non-Asians of Los Angeles County, California. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1820–6.
- [120] Kuper H, Tzonou A, Kaklamani E, Hsieh CC, Lagiou P, Adami HO, et al. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2000;85:498–502.
- [121] Trichopoulos D, Bamia C, Lagiou P, Fedirko V, Trepo E, Jenab M, et al. Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1686–95. doi:10.1093/jnci/djr395.
- [122] Mayans M V, Calvet X, Bruix J, Bruguera M, Costa J, Estève J, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Catalonia, Spain. *Int J Cancer* 1990;46:378–81.
- [123] Tanaka K, Hirohata T, Takeshita S, Hirohata I, Koga S, Sugimachi K, et al. Hepatitis B virus, cigarette smoking and alcohol consumption in the development of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Fukuoka, Japan. *Int J Cancer* 1992;51:509–14.
- [124] Mohamed AE, Kew MC, Groeneveld HT. Alcohol consumption as a risk factor for hepatocellular carcinoma in urban southern African blacks. *Int J Cancer* 1992;51:537–41.
- [125] Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002;155:323–31.
- [126] Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 1994;106:1085–105.
- [127] Chiesa R, Donato F, Tagger A, Favret M, Ribero ML, Nardi G, et al. Etiology of hepatocellular carcinoma in Italian patients with and without cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:213–6.
- [128] Chuang S-C, Lee Y-CA, Hashibe M, Dai M, Zheng T, Boffetta P. Interaction between cigarette smoking and hepatitis B and C virus infection on the risk of liver cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1261–8. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-1297.
- [129] Wong VW-S, Janssen HLA. Can we use HCC risk scores to individualize surveillance in chronic hepatitis B infection? *J Hepatol* 2015;63:722–32. doi:10.1016/j.jhep.2015.05.019.
- [130] Nahon P, Zucman-Rossi J. Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol* 2012;57:663–74. doi:10.1016/j.jhep.2012.02.035.
- [131] Simpson HN, McGuire BM. Screening and detection of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2015;19:295–307. doi:10.1016/j.cld.2015.01.004.
- [132] EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012;56:908–43. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.001.
- [133] Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001;35:421–30.
- [134] Trevisani F, Santi V, Gramenzi A, Di Nolfo MA, Poggio P Del, Benvegnù L, et al. Surveillance for Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: Is It Effective in Intermediate/Advanced Cirrhosis? *Am J Gastroenterol* 2007;102:2448–57. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01395.x.

- [135] Dufour JF, Greten TF, Raymond E, Roskams T, De T, Ducreux M, et al. Clinical Practice Guidelines EASL – EORTC Clinical Practice Guidelines : Management of hepatocellular carcinoma European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Hepatol* 2012;56:908–43. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.001.
- [136] Bolondi L. Screening for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol* 2003;39:1076–84.
- [137] Kim CK, Lim JH, Lee WJ. Detection of hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules in cirrhotic liver: accuracy of ultrasonography in transplant patients. *J Ultrasound Med* 2001;20:99–104.
- [138] SINGAL A, VOLK ML, WALJEE A, SALGIA R, HIGGINS P, ROGERS MAM, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:37–47. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.04014.x.
- [139] European Association For The Study Of The Liver, European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012;56:908–43. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.001.
- [140] EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma n.d.
- [141] McMahon B, Bulkow L, Harpster A, Snowball M, Lanier A, Sacco F, et al. Screening for Hepatocellular Carcinoma in Alaska Natives Infected With Chronic Hepatitis B: A 16-Year Population-Based Study. *Hepatology* 2000;32:842–6. doi:10.1053/jhep.2000.17914.
- [142] Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, Everhart JE, Dienstag JL, Bonkovsky HL, et al. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol* 2005;43:434–41.
- [143] Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and -Fetoprotein Expression Defines Novel Prognostic Subtypes of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:1451–61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6013.
- [144] Koike Y, Shiratori Y, Sato S, Obi S, Teratani T, Imamura M, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer* 2001;91:561–9.
- [145] Koike Y, Shiratori Y, Sato S, Obi S, Teratani T, Imamura M, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer* 2001;91:561–9.
- [146] Sterling RK, Jeffers L, Gordon F, Sherman M, Venook AP, Reddy KR, et al. Clinical Utility of AFP-L3% Measurement in North American Patients with HCV-Related Cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2196–205. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01405.x.
- [147] El-Serag HB, Kanwal F, Davila JA, Kramer J, Richardson P. A new laboratory-based algorithm to predict development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C and cirrhosis. *Gastroenterology* 2014;146:1249–55.e1. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.045.
- [148] Zhang B-H, Yang B-H, Tang Z-Y. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:417–22. doi:10.1007/s00432-004-0552-0.
- [149] Barbara L, Benzi G, Gaiani S, Fusconi F, Zironi G, Siringo S, et al. Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology* 1992;16:132–7.
- [150] Ebara M, Ohto M, Shinagawa T, Sugiura N, Kimura K, Matsutani S, et al. Natural history of minute hepatocellular carcinoma smaller than three centimeters complicating cirrhosis. A study in 22 patients. *Gastroenterology* 1986;90:289–98.

- [151] Sheu JC, Sung JL, Chen DS, Yang PM, Lai MY, Lee CS, et al. Growth rate of asymptomatic hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *Gastroenterology* 1985;89:259–66.
- [152] Trevisani F, De Notariis S, Rapaccini G, Farinati F, Benvegno L, Zoli M, et al. Semiannual and annual surveillance of cirrhotic patients for hepatocellular carcinoma: effects on cancer stage and patient survival (Italian experience). *Am J Gastroenterol* 2002;97:734–44. doi:10.1111/j.1572-0241.2002.05557.x.
- [153] Santi V, Trevisani F, Gramenzi A, Grignaschi A, Mirici-Cappa F, Poggio P Del, et al. Semiannual surveillance is superior to annual surveillance for the detection of early hepatocellular carcinoma and patient survival. *J Hepatol* 2010;53:291–7. doi:10.1016/j.jhep.2010.03.010.
- [154] Andersson KL, Salomon JA, Goldie SJ, Chung RT. Cost Effectiveness of Alternative Surveillance Strategies for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1418–24. doi:10.1016/j.cgh.2008.08.005.
- [155] Roskams T. Anatomic Pathology of Hepatocellular Carcinoma: Impact on Prognosis and Response to Therapy. *Clin Liver Dis* 2011;15:245–59. doi:10.1016/j.cld.2011.03.004.
- [156] Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology* 2011;53:1020–2. doi:10.1002/hep.24199.
- [157] Yang H-I, Yuen M-F, Chan HL-Y, Han K-H, Chen P-J, Kim D-Y, et al. Risk estimation for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B (REACH-B): development and validation of a predictive score. *Lancet Oncol* 2011;12:568–74. doi:10.1016/S1470-2045(11)70077-8.
- [158] Wong GL-H, Chan HL-Y, Wong CK-Y, Leung C, Chan CY, Ho PP-L, et al. Liver stiffness-based optimization of hepatocellular carcinoma risk score in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2014;60:339–45. doi:10.1016/j.jhep.2013.09.029.
- [159] Jung KS, Kim SU, Ahn SH, Park YN, Kim DY, Park JY, et al. Risk assessment of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma development using liver stiffness measurement (FibroScan). *Hepatology* 2011;53:885–94. doi:10.1002/hep.24121.
- [160] Kim DY, Song KJ, Kim SU, Yoo EJ, Park JY, Ahn SH, et al. Transient elastography-based risk estimation of hepatitis B virus-related occurrence of hepatocellular carcinoma: development and validation of a predictive model. *Onco Targets Ther* 2013;6:1463–9. doi:10.2147/OTT.S51986.
- [161] Kim BK, Kim H-S, Yoo EJ, Oh EJ, Park JY, Kim DY, et al. Risk assessment of clinical outcomes in Asian patients with chronic hepatitis B using enhanced liver fibrosis test. *Hepatology* 2014;60:1911–9. doi:10.1002/hep.27389.
- [162] Prediction of development of liver-related events by transient elastography in hepatitis B patients with complete virological response on antiviral... - PubMed - NCBI n.d. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee+HW+AND+Am+J+Gastroenterol+2014> (accessed April 23, 2016).
- [163] Jung KS, Kim SU, Song K, Park JY, Kim DY, Ahn SH, et al. Validation of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma prediction models in the era of antiviral therapy. *Hepatology* 2015;62:1757–66. doi:10.1002/hep.28115.
- [164] Han K-H, Ahn SH. How to predict HCC development in patients with chronic B viral liver disease? *Intervirolgy* 2005;48:23–8. doi:10.1159/000082091.
- [165] Wong VW-S, Chan SL, Mo F, Chan T-C, Loong HH-F, Wong GL-H, et al. Clinical scoring system to predict hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B carriers. *J Clin Oncol* 2010;28:1660–5. doi:10.1200/JCO.2009.26.2675.
- [166] Wong GL-H, Chan HL-Y, Wong CK-Y, Leung C, Chan CY, Ho PP-L, et al. Liver stiffness-based optimization of hepatocellular carcinoma risk score in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2014;60:339–45. doi:10.1016/j.jhep.2013.09.029.

- [167] Yuen M-F, Tanaka Y, Fong DY-T, Fung J, Wong DK-H, Yuen JC-H, et al. Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009;50:80–8. doi:10.1016/j.jhep.2008.07.023.
- [168] Yang H-I, Yuen M-F, Chan HL-Y, Han K-H, Chen P-J, Kim D-Y, et al. Risk estimation for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B (REACH-B): development and validation of a predictive score. *Lancet Oncol* 2011;12:568–74. doi:10.1016/S1470-2045(11)70077-8.
- [169] Lee HW, Yoo EJ, Kim BK, Kim SU, Park JY, Kim DY, et al. Prediction of development of liver-related events by transient elastography in hepatitis B patients with complete virological response on antiviral therapy. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1241–9. doi:10.1038/ajg.2014.157.
- [170] Papatheodoridis G, Dalekos G, Sypsa V, Yurdaydin C, Buti M, Goulis J, et al. PAGE-B predicts the risk of developing hepatocellular carcinoma in Caucasians with chronic hepatitis B on 5-year antiviral therapy. *J Hepatol* 2016;64:800–6. doi:10.1016/j.jhep.2015.11.035.
- [171] Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2016;150:835–53. doi:10.1053/j.gastro.2015.12.041.
- [172] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020–2. doi:10.1002/hep.24199.
- [173] Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Solé M, Ayuso JR, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;47:97–104. doi:10.1002/hep.21966.
- [174] Sangiovanni A, Manini MA, Iavarone M, Romeo R, Forzenigo L V, Fraquelli M, et al. The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Gut* 2010;59:638–44. doi:10.1136/gut.2009.187286.
- [175] Mitchell DG, Bruix J, Sherman M, Sirlin CB. LI-RADS (Liver Imaging Reporting and Data System): summary, discussion, and consensus of the LI-RADS Management Working Group and future directions. *Hepatology* 2015;61:1056–65. doi:10.1002/hep.27304.
- [176] Roberts LR, Sirlin CB, Zaiem F, Almasri J, Prokop LJ, Heimbach JK, et al. Imaging for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2018;67:401–21. doi:10.1002/hep.29487.
- [177] Yoon SH, Lee JM, So YH, Hong SH, Kim SJ, Han JK, et al. Multiphasic MDCT enhancement pattern of hepatocellular carcinoma smaller than 3 cm in diameter: tumor size and cellular differentiation. *AJR Am J Roentgenol* 2009;193:W482-9. doi:10.2214/AJR.08.1818.
- [178] Sherman M, Burak K, Maroun J, Metrakos P, Knox JJ, Myers RP, et al. Multidisciplinary Canadian consensus recommendations for the management and treatment of hepatocellular carcinoma. *Curr Oncol* 2011;18:228–40.
- [179] Zheng S-G, Xu H-X, Liu L-N. Management of hepatocellular carcinoma: The role of contrast-enhanced ultrasound. *World J Radiol* 2014;6:7–14. doi:10.4329/wjr.v6.i1.7.
- [180] Welch HG, Black WC. Overdiagnosis in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:605–13. doi:10.1093/jnci/djq099.
- [181] Khalili K, Kim TK, Jang H-J, Haider MA, Khan L, Guindi M, et al. Optimization of imaging diagnosis of 1-2 cm hepatocellular carcinoma: an analysis of diagnostic performance and resource utilization. *J Hepatol* 2011;54:723–8. doi:10.1016/j.jhep.2010.07.025.
- [182] Jhaveri K, Cleary S, Audet P, Balaa F, Bhayana D, Burak K, et al. Consensus statements from a multidisciplinary expert panel on the utilization and application of a liver-specific MRI contrast agent (gadoxetic acid). *AJR Am J Roentgenol* 2015;204:498–509. doi:10.2214/AJR.13.12399.
- [183] Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus

- group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009;49:658–64. doi:10.1002/hep.22709.
- [184] Di Tommaso L, Destro A, Fabbris V, Spagnuolo G, Laura Fracanzani A, Fargion S, et al. Diagnostic accuracy of clathrin heavy chain staining in a marker panel for the diagnosis of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011;53:1549–57. doi:10.1002/hep.24218.
- [185] Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, Balladore E, Terracciano L, Sangiovanni A, et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2009;50:746–54. doi:10.1016/j.jhep.2008.11.014.
- [186] Tremosini S, Forner A, Boix L, Vilana R, Bianchi L, Reig M, et al. Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut* 2012;61:1481–7. doi:10.1136/gutjnl-2011-301862.
- [187] Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, Balladore E, Terracciano L, Sangiovanni A, et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2009;50:746–54. doi:10.1016/j.jhep.2008.11.014.
- [188] Tremosini S, Forner A, Boix L, Vilana R, Bianchi L, Reig M, et al. Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut* 2012;61:1481–7. doi:10.1136/gutjnl-2011-301862.
- [189] International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia The International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009;49:658–64. doi:10.1002/hep.22709.
- [190] Roskams T, Kojiro M. Pathology of Early Hepatocellular Carcinoma: Conventional and Molecular Diagnosis. *Semin Liver Dis* 2010;30:017–25. doi:10.1055/s-0030-1247129.
- [191] Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology* 2006;49:138–51. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02468.x.
- [192] Kim H, Choi GH, Na DC, Ahn EY, Kim G Il, Lee JE, et al. Human hepatocellular carcinomas with “Stemness”-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology* 2011;54:1707–17. doi:10.1002/hep.24559.
- [193] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* (London, England) 2003;362:1907–17. doi:10.1016/S0140-6736(03)14964-1.
- [194] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* (London, England) 2012;379:1245–55. doi:10.1016/S0140-6736(11)61347-0.
- [195] Reig M, Darnell A, Forner A, Rimola J, Ayuso C, Bruix J. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: the issue of treatment stage migration and registration of progression using the BCLC-refined RECIST. *Semin Liver Dis* 2014;34:444–55. doi:10.1055/s-0034-1394143.
- [196] Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology* 2005;41:707–16. doi:10.1002/hep.20636.
- [197] Sherman M. Staging for hepatocellular carcinoma: complex and confusing. *Gastroenterology* 2014;146:1599–602. doi:10.1053/j.gastro.2014.04.026.
- [198] Liu P-H, Hsu C-Y, Hsia C-Y, Lee Y-H, Su C-W, Huang Y-H, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: Assessment of eleven staging systems. *J Hepatol* 2016;64:601–8. doi:10.1016/j.jhep.2015.10.029.
- [199] Vauthey J-N, Dixon E, Abdalla EK, Helton WS, Pawlik TM, Taouli B, et al. Pretreatment

- assessment of hepatocellular carcinoma: expert consensus statement. *HPB (Oxford)* 2010;12:289–99. doi:10.1111/j.1477-2574.2010.00181.x.
- [200] Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985;56:918–28.
- [201] Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. *Hepatology* 2000;31:840–5. doi:10.1053/he.2000.5628.
- [202] Farinati F, Rinaldi M, Gianni S, Naccarato R. How should patients with hepatocellular carcinoma be staged? Validation of a new prognostic system. *Cancer* 2000;89:2266–73.
- [203] Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire. *J Hepatol* 1999;31:133–41.
- [204] Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999;19:329–38. doi:10.1055/s-2007-1007122.
- [205] Yang JD, Kim WR, Park KW, Chaiteerakij R, Kim B, Sanderson SO, et al. Model to estimate survival in ambulatory patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012;56:614–21. doi:10.1002/hep.25680.
- [206] Yau T, Tang VYF, Yao T-J, Fan S-T, Lo C-M, Poon RTP. Development of Hong Kong Liver Cancer staging system with treatment stratification for patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2014;146:1691–700.e3. doi:10.1053/j.gastro.2014.02.032.
- [207] Lai CL, Lam KC, Wong KP, Wu PC, Todd D. Clinical features of hepatocellular carcinoma: review of 211 patients in Hong Kong. *Cancer* 1981;47:2746–55.
- [208] Edge SB, American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual*. Springer; 2010.
- [209] Ikai I, Yamaoka Y, Yamamoto Y, Ozaki N, Sakai Y, Satoh S, et al. Surgical intervention for patients with stage IV-A hepatocellular carcinoma without lymph node metastasis: proposal as a standard therapy. *Ann Surg* 1998;227:433–9.
- [210] Vauthey J-N, Lauwers GY, Esnaola NF, Do K-A, Belghiti J, Mirza N, et al. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20:1527–36. doi:10.1200/JCO.2002.20.6.1527.
- [211] Shindoh J, Andreou A, Aloia TA, Zimmitti G, Lauwers GY, Laurent A, et al. Microvascular invasion does not predict long-term survival in hepatocellular carcinoma up to 2 cm: reappraisal of the staging system for solitary tumors. *Ann Surg Oncol* 2013;20:1223–9. doi:10.1245/s10434-012-2739-y.
- [212] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696–9.
- [213] Bilimoria MM, Lauwers GY, Doherty DA, Nagorney DM, Belghiti J, Do KA, et al. Underlying liver disease, not tumor factors, predicts long-term survival after resection of hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 2001;136:528–35.
- [214] Vauthey J-N, Ribero D, Abdalla EK, Jonas S, Bharat A, Schumacher G, et al. Outcomes of liver transplantation in 490 patients with hepatocellular carcinoma: validation of a uniform staging after surgical treatment. *J Am Coll Surg* 2007;204:1016-27-8. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2006.12.043.
- [215] Levy I, Sherman M, Liver Cancer Study Group of the University of Toronto. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda, and Child-Pugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. *Gut* 2002;50:881–5.
- [216] Ueno S, Tanabe G, Sako K, Hiwaki T, Hokotate H, Fukukura Y, et al. Discrimination value of the

- new western prognostic system (CLIP score) for hepatocellular carcinoma in 662 Japanese patients. *Cancer of the Liver Italian Program. Hepatology* 2001;34:529–34. doi:10.1053/jhep.2001.27219.
- [217] Villa E, Colantoni A, Cammà C, Grottola A, Buttafoco P, Gelmini R, et al. Estrogen receptor classification for hepatocellular carcinoma: comparison with clinical staging systems. *J Clin Oncol* 2003;21:441–6. doi:10.1200/JCO.2003.11.051.
- [218] Cho YK, Chung JW, Kim JK, Ahn YS, Kim MY, Park YO, et al. Comparison of 7 staging systems for patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization. *Cancer* 2008;112:352–61. doi:10.1002/cncr.23185.
- [219] Huo T-I, Huang Y-H, Lin H-C, Wu J-C, Chiang J-H, Lee P-C, et al. Proposal of a modified Cancer of the Liver Italian Program staging system based on the model for end-stage liver disease for patients with hepatocellular carcinoma undergoing loco-regional therapy. *Am J Gastroenterol* 2006;101:975–82. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00462.x.
- [220] Forner A, Gilibert M, Bruix J, Raoul J-L. Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:525–35. doi:10.1038/nrclinonc.2014.122.
- [221] D’Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217–31. doi:10.1016/j.jhep.2005.10.013.
- [222] Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet (London, England)* 2014;383:1749–61. doi:10.1016/S0140-6736(14)60121-5.
- [223] Cillo U, Vitale A, Grigoletto F, Farinati F, Brolese A, Zanusi G, et al. Prospective validation of the Barcelona Clinic Liver Cancer staging system. *J Hepatol* 2006;44:723–31. doi:10.1016/j.jhep.2005.12.015.
- [224] Piscaglia F, Bolondi L. The intermediate hepatocellular carcinoma stage: Should treatment be expanded? *Dig Liver Dis* 2010;42 Suppl 3:S258-63. doi:10.1016/S1590-8658(10)60514-2.
- [225] Bolondi L, Burroughs A, Dufour J-F, Galle PR, Mazzaferro V, Piscaglia F, et al. Heterogeneity of patients with intermediate (BCLC B) Hepatocellular Carcinoma: proposal for a subclassification to facilitate treatment decisions. *Semin Liver Dis* 2012;32:348–59. doi:10.1055/s-0032-1329906.
- [226] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–90. doi:10.1056/NEJMoa0708857.
- [227] Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxì A, Cammà C. A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;51:1274–83. doi:10.1002/hep.23485.
- [228] Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C, Satomura S, Teng M, Reeves HL, et al. Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach-the ALBI grade. *J Clin Oncol* 2015;33:550–8. doi:10.1200/JCO.2014.57.9151.
- [229] Lee J-H, Cho Y, Kim HY, Cho EJ, Lee DH, Yu SJ, et al. Serum Tumor Markers Provide Refined Prognostication in Selecting Liver Transplantation Candidate for Hepatocellular Carcinoma Patients Beyond the Milan Criteria. *Ann Surg* 2016;263:842–50. doi:10.1097/SLA.0000000000001578.
- [230] Romagnoli R, Mazzaferro V, Bruix J. Surgical resection for hepatocellular carcinoma: Moving from what can be done to what is worth doing. *Hepatology* 2015;62:340–2. doi:10.1002/hep.27831.
- [231] Wald C, Russo MW, Heimbach JK, Hussain HK, Pomfret EA, Bruix J. New OPTN/UNOS policy for liver transplant allocation: standardization of liver imaging, diagnosis, classification, and reporting of hepatocellular carcinoma. *Radiology* 2013;266:376–82. doi:10.1148/radiol.12121698.

- [232] Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, Rolle E, Solbiati L, Tinelli C, et al. Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice? *Hepatology* 2008;47:82–9. doi:10.1002/hep.21933.
- [233] Roayaie S, Obeidat K, Sposito C, Mariani L, Bhoori S, Pellegrinelli A, et al. Resection of hepatocellular cancer ≤ 2 cm: results from two Western centers. *Hepatology* 2013;57:1426–35. doi:10.1002/hep.25832.
- [234] Poon RTP, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, et al. Extended hepatic resection for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: is it justified? *Ann Surg* 2002;236:602–11. doi:10.1097/01.SLA.0000033038.38956.5E.
- [235] Mazzaferro V, Romito R, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Bhoori S, et al. Prevention of hepatocellular carcinoma recurrence with alpha-interferon after liver resection in HCV cirrhosis. *Hepatology* 2006;44:1543–54. doi:10.1002/hep.21415.
- [236] Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, et al. Neither Multiple Tumors Nor Portal Hypertension Are Surgical Contraindications for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2008;134:1908–16. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.091.
- [237] Makuuchi M, Sano K. The surgical approach to HCC: Our progress and results in Japan. *Liver Transplant* 2004;10:S46–52. doi:10.1002/lt.20044.
- [238] Arii S, Tanaka S, Mitsunori Y, Nakamura N, Kudo A, Noguchi N, et al. Surgical Strategies for Hepatocellular Carcinoma with Special Reference to Anatomical Hepatic Resection and Intraoperative Contrast-Enhanced Ultrasonography. *Oncology* 2010;78:125–30. doi:10.1159/000315240.
- [239] Shi M, Guo R-P, Lin X-J, Zhang Y-Q, Chen M-S, Zhang C-Q, et al. Partial Hepatectomy With Wide Versus Narrow Resection Margin for Solitary Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg* 2007;245:36–43. doi:10.1097/01.sla.0000231758.07868.71.
- [240] Lau H, Man K, Fan ST, Yu WC, Lo CM, Wong J. Evaluation of preoperative hepatic function in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *Br J Surg* 1997;84:1255–9.
- [241] Wu J-C, Huang Y-H, Chau G-Y, Su C-W, Lai C-R, Lee P-C, et al. Risk factors for early and late recurrence in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2009;51:890–7. doi:10.1016/j.jhep.2009.07.009.
- [242] Bruix J, Castells A, Bosch J, Feu F, Fuster J, Garcia-Pagan JC, et al. Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure. *Gastroenterology* 1996;111:1018–22.
- [243] Cucchetti A, Cescon M, Trevisani F, Pinna AD. Current concepts in hepatic resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *World J Gastroenterol* 2012;18:6398–408. doi:10.3748/wjg.v18.i44.6398.
- [244] Cescon M, Cucchetti A, Grazi GL, Ferrero A, Viganò L, Ercolani G, et al. Indication of the extent of hepatectomy for hepatocellular carcinoma on cirrhosis by a simple algorithm based on preoperative variables. *Arch Surg* 2009;144:57–63; discussion 63. doi:10.1001/archsurg.2008.522.
- [245] Cucchetti A, Cescon M, Golfieri R, Piscaglia F, Renzulli M, Neri F, et al. Hepatic venous pressure gradient in the preoperative assessment of patients with resectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016;64:79–86. doi:10.1016/j.jhep.2015.08.025.
- [246] Ribero D, Curley SA, Imamura H, Madoff DC, Nagorney DM, Ng KK, et al. Selection for resection of hepatocellular carcinoma and surgical strategy: indications for resection, evaluation of liver function, portal vein embolization, and resection. *Ann Surg Oncol* 2008;15:986–92. doi:10.1245/s10434-007-9731-y.

- [247] Koh W-P, Robien K, Wang R, Govindarajan S, Yuan J-M, Yu MC. Smoking as an independent risk factor for hepatocellular carcinoma: the Singapore Chinese Health Study. *Br J Cancer* 2011;105:1430–5. doi:10.1038/bjc.2011.360.
- [248] Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, Regimbeau JM, Santoro R, Vilgrain V, et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg* 2003;237:208–17. doi:10.1097/01.SLA.0000048447.16651.7B.
- [249] Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ, Damrah O, Tait P, Jackson J, et al. Preoperative Portal Vein Embolization for Major Liver Resection. *Ann Surg* 2008;247:49–57. doi:10.1097/SLA.0b013e31815f6e5b.
- [250] Yeh C-N, Lee W-C, Chen M-F, Tsay P-K. Predictors of long-term disease-free survival after resection of hepatocellular carcinoma: two decades of experience at Chang Gung Memorial Hospital. *Ann Surg Oncol* 2003;10:916–21.
- [251] Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005;25:181–200. doi:10.1055/s-2005-871198.
- [252] Mazzaferro V, Bhoori S, Sposito C, Bongini M, Langer M, Miceli R, et al. Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an evidence-based analysis of 15 years of experience. *Liver Transpl* 2011;17 Suppl 2:S44–57. doi:10.1002/lt.22365.
- [253] Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* 1999;30:1434–40. doi:10.1002/hep.510300629.
- [254] Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver Transplantation for the Treatment of Small Hepatocellular Carcinomas in Patients with Cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334:693–700. doi:10.1056/NEJM199603143341104.
- [255] Bismuth H, Majno P, Adam R. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis* 1999;19:311–22. doi:10.1055/s-2007-1007120.
- [256] Bismuth H, Chiche L, Adam R, Castaing D, Diamond T, Dennison A. Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Ann Surg* 1993;218:145–51.
- [257] Jonas S, Bechstein WO, Steinmüller T, Herrmann M, Radke C, Berg T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001;33:1080–6. doi:10.1053/jhep.2001.23561.
- [258] Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334:693–9. doi:10.1056/NEJM199603143341104.
- [259] Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001;33:1394–403. doi:10.1053/jhep.2001.24563.
- [260] Prasad KR, Young RS, Burra P, Zheng S-S, Mazzaferro V, Moon DB, et al. Summary of candidate selection and expanded criteria for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a review and consensus statement. *Liver Transpl* 2011;17 Suppl 2:S81–9. doi:10.1002/lt.22380.
- [261] Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol* 2009;10:35–43. doi:10.1016/S1470-2045(08)70284-5.
- [262] Wiesner RH, Freeman RB, Mulligan DC. Liver transplantation for hepatocellular cancer: the impact of the MELD allocation policy. *Gastroenterology* 2004;127:S261–7.
- [263] Sala M, Fuster J, Llovet JM, Navasa M, Solé M, Varela M, et al. High pathological risk of

- recurrence after surgical resection for hepatocellular carcinoma: An indication for salvage liver transplantation. *Liver Transplant* 2004;10:1294–300. doi:10.1002/lt.20202.
- [264] Yao FY, Kerlan RK, Hirose R, Davern TJ, Bass NM, Feng S, et al. Excellent outcome following down-staging of hepatocellular carcinoma prior to liver transplantation: An intention-to-treat analysis. *Hepatology* 2008;48:819–27. doi:10.1002/hep.22412.
- [265] Ravaioli M, Grazi GL, Piscaglia F, Trevisani F, Cescon M, Ercolani G, et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Results of Down-Staging in Patients Initially Outside the Milan Selection Criteria. *Am J Transplant* 2008;8:2547–57. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02409.x.
- [266] Siegler M, Simmerling MC, Siegler JH, Cronin DC. Recipient deaths during donor surgery: A new ethical problem in living donor liver transplantation (LDLT). *Liver Transplant* 2006;12:358–60. doi:10.1002/lt.20670.
- [267] Ghobrial RM, Freise CE, Trotter JF, Tong L, Ojo AO, Fair JH, et al. Donor Morbidity After Living Donation for Liver Transplantation. *Gastroenterology* 2008;135:468–76. doi:10.1053/j.gastro.2008.04.018.
- [268] Brown RS. Live Donors in Liver Transplantation. *Gastroenterology* 2008;134:1802–13. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.092.
- [269] Lok AS-F. Hepatitis B: 50 years after the discovery of Australia antigen. *J Viral Hepat* 2016;23:5–14. doi:10.1111/jvh.12444.
- [270] Younossi ZM, Stepanova M, Saab S, Ahmed A, Lam B, Srishord M, et al. The impact of viral hepatitis-related hepatocellular carcinoma to post-transplant outcomes. *J Viral Hepat* 2016;23:53–61. doi:10.1111/jvh.12449.
- [271] Gane EJ, Hyland RH, An D, Svarovskaia E, Pang PS, Brainard D, et al. Efficacy of ledipasvir and sofosbuvir, with or without ribavirin, for 12 weeks in patients with HCV genotype 3 or 6 infection. *Gastroenterology* 2015;149:1454–1461.e1. doi:10.1053/j.gastro.2015.07.063.
- [272] Younossi ZM, Stepanova M, Marcellin P, Afdhal N, Kowdley K V, Zeuzem S, et al. Treatment with ledipasvir and sofosbuvir improves patient-reported outcomes: Results from the ION-1, -2, and -3 clinical trials. *Hepatology* 2015;61:1798–808. doi:10.1002/hep.27724.
- [273] Association for the Study of the Liver E. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016 2016. doi:10.1016/j.jhep.2016.09.001.
- [274] Survival and prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma treated by percutaneous ethanol injection: a 10-year experience. - PubMed - NCBI n.d. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mazzanti+r+AND+Can+J+Gastroenterol+2004> (accessed April 25, 2016).
- [275] Takayasu K, Arai S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, et al. Prospective Cohort Study of Transarterial Chemoembolization for Unresectable Hepatocellular Carcinoma in 8510 Patients. *Gastroenterology* 2006;131:461–9. doi:10.1053/j.gastro.2006.05.021.
- [276] Lencioni R. Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;52:762–73. doi:10.1002/hep.23725.
- [277] Livraghi T, Bolondi L, Lazzaroni S, Marin G, Morabito A, Rapaccini GL, et al. Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A study on 207 patients. *Cancer* 1992;69:925–9. doi:10.1002/1097-0142(19920215)69:4<925::AID-CNCR2820690415>3.0.CO;2-G.
- [278] Lencioni R, Bartolozzi C, Caramella D, Paolicchi A, Carrai M, Maltinti G, et al. Treatment of small hepatocellular carcinoma with percutaneous ethanol injection. Analysis of prognostic factors in 105 Western patients. *Cancer* 1995;76:1737–46.

- [279] Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, de Sio I, Bolondi L, et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 1995;197:101–8. doi:10.1148/radiology.197.1.7568806.
- [280] Single HCC smaller than 2 cm: surgery or ablation: interventional oncologist's perspective. - PubMed - NCBI n.d. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Livraghi+T+AND+J+Hepatobiliary+Pancreat+2010> (accessed April 25, 2016).
- [281] Small Hepatocellular Carcinoma: Radiofrequency Ablation versus Nonanatomic Resection-- Propensity Score Analyses of Long-term Outcomes. - PubMed - NCBI n.d. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25688888> (accessed April 25, 2016).
- [282] Lin S-M, Lin C-J, Lin C-C, Hsu C-W, Chen Y-C. Randomised controlled trial comparing percutaneous radiofrequency thermal ablation, percutaneous ethanol injection, and percutaneous acetic acid injection to treat hepatocellular carcinoma of 3 cm or less. *Gut* 2005;54:1151–6. doi:10.1136/gut.2004.045203.
- [283] Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, et al. A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2005;129:122–30.
- [284] Lencioni RA, Allgaier H-P, Cioni D, Olschewski M, Deibert P, Crocetti L, et al. Small Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Randomized Comparison of Radio-frequency Thermal Ablation versus Percutaneous Ethanol Injection. *Radiology* 2003;228:235–40. doi:10.1148/radiol.2281020718.
- [285] Lin S-M, Lin C-J, Lin C-C, Hsu C-W, Chen Y-C. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma ≤ 4 cm. *Gastroenterology* 2004;127:1714–23.
- [286] Brunello F, Veltri A, Carucci P, Pagano E, Ciccone G, Moretto P, et al. Radiofrequency ablation versus ethanol injection for early hepatocellular carcinoma: A randomized controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:727–35. doi:10.1080/00365520701885481.
- [287] Cho YK, Kim JK, Kim MY, Rhim H, Han JK. Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies. *Hepatology* 2009;49:453–9. doi:10.1002/hep.22648.
- [288] Germani G, Pleguezuelo M, Gurusamy K, Meyer T, Isgro G, Burroughs AK. Clinical outcomes of radiofrequency ablation, percutaneous alcohol and acetic acid injection for hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *J Hepatol* 2010;52:380–8. doi:10.1016/j.jhep.2009.12.004.
- [289] Bouza C, López-Cuadrado T, Alcázar R, Saz-Parkinson Z, Amate JM. Meta-analysis of percutaneous radiofrequency ablation versus ethanol injection in hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2009;9:31. doi:10.1186/1471-230X-9-31.
- [290] Imamura J, Tateishi R, Shiina S, Goto E, Sato T, Ohki T, et al. Neoplastic Seeding After Radiofrequency Ablation for Hepatocellular Carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2008;103:3057–62. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.02153.x.
- [291] Mazzaferro V, Lencioni R, Majno P. Early hepatocellular carcinoma on the procrustean bed of ablation, resection, and transplantation. *Semin Liver Dis* 2014;34:415–26. doi:10.1055/s-0034-1394365.
- [292] Chen M-S, Li J-Q, Zheng Y, Guo R-P, Liang H-H, Zhang Y-Q, et al. A Prospective Randomized Trial Comparing Percutaneous Local Ablative Therapy and Partial Hepatectomy for Small Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg* 2006;243:321–8. doi:10.1097/01.sla.0000201480.65519.b8.
- [293] Huang J, Yan L, Cheng Z, Wu H, Du L, Wang J, et al. A Randomized Trial Comparing Radiofrequency Ablation and Surgical Resection for HCC Conforming to the Milan Criteria. *Ann Surg* 2010;252:903–12. doi:10.1097/SLA.0b013e3181efc656.

- [294] Cho YK, Kim JK, Kim MY, Rhim H, Han JK. Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies. *Hepatology* 2009;49:453–9. doi:10.1002/hep.22648.
- [295] Yu NC, Lu DSK, Raman SS, Dupuy DE, Simon CJ, Lassman C, et al. Hepatocellular Carcinoma: Microwave Ablation with Multiple Straight and Loop Antenna Clusters—Pilot Comparison with Pathologic Findings. *Radiology* 2006;239:269–75. doi:10.1148/radiol.2383041592.
- [296] Pacella CM, Francica G, Di Lascio FML, Arienti V, Antico E, Caspani B, et al. Long-Term Outcome of Cirrhotic Patients With Early Hepatocellular Carcinoma Treated With Ultrasound-Guided Percutaneous Laser Ablation: A Retrospective Analysis. *J Clin Oncol* 2009;27:2615–21. doi:10.1200/JCO.2008.19.0082.
- [297] Orlacchio A, Bazzocchi G, Pastorelli D, Bolacchi F, Angelico M, Almerighi C, et al. Percutaneous Cryoablation of Small Hepatocellular Carcinoma with US Guidance and CT Monitoring: Initial Experience. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2008;31:587–94. doi:10.1007/s00270-008-9293-9.
- [298] Ng KKC, Poon RTP, Chan SC, Chok KSH, Cheung TT, Tung H, et al. High-Intensity Focused Ultrasound for Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg* 2011;253:981–7. doi:10.1097/SLA.0b013e3182128a8b.
- [299] Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S179-88.
- [300] Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 2002;359:1734–9. doi:10.1016/S0140-6736(02)08649-X.
- [301] Lo C-M, Ngan H, Tso W-K, Liu C-L, Lam C-M, Poon RT-P, et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:1164–71. doi:10.1053/jhep.2002.33156.
- [302] Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003;37:429–42. doi:10.1053/jhep.2003.50047.
- [303] Verslype C, Rosmorduc O, Rougier P. Hepatocellular carcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012;23 Suppl 7:vii41-8. doi:10.1093/annonc/mds225.
- [304] Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 2007;46:474–81. doi:10.1016/j.jhep.2006.10.020.
- [305] Lammer J, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A, et al. Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010;33:41–52. doi:10.1007/s00270-009-9711-7.
- [306] Golfieri R, Giampalma E, Renzulli M, Cioni R, Bargellini I, Bartolozzi C, et al. Randomised controlled trial of doxorubicin-eluting beads vs conventional chemoembolisation for hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2014;111:255–64. doi:10.1038/bjc.2014.199.
- [307] Sieghart W, Hucke F, Pinter M, Graziadei I, Vogel W, Müller C, et al. The ART of decision making: retreatment with transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:2261–73. doi:10.1002/hep.26256.
- [308] Raoul J, Guyader D, Bretagne J, Heautot J, Duvauferrier R, Bourguet P, et al. Prospective randomized trial of chemoembolization versus intra-arterial injection of ¹³¹I-labeled-iodized oil in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;26:1156–61.

doi:10.1002/hep.510260511.

- [309] Salem R, Lewandowski RJ, Mulcahy MF, Riaz A, Ryu RK, Ibrahim S, et al. Radioembolization for Hepatocellular Carcinoma Using Yttrium-90 Microspheres: A Comprehensive Report of Long-term Outcomes. *Gastroenterology* 2010;138:52–64. doi:10.1053/j.gastro.2009.09.006.
- [310] Kulik LM, Carr BI, Mulcahy MF, Lewandowski RJ, Atassi B, Ryu RK, et al. Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *Hepatology* 2007;47:71–81. doi:10.1002/hep.21980.
- [311] Hilgard P, Hamami M, Fouly A El, Scherag A, Müller S, Ertle J, et al. Radioembolization with yttrium-90 glass microspheres in hepatocellular carcinoma: European experience on safety and long-term survival. *Hepatology* 2010;52:1741–9. doi:10.1002/hep.23944.
- [312] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–90. doi:10.1056/NEJMoa0708857.
- [313] Cheng A-L, Kang Y-K, Chen Z, Tsao C-J, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009;10:25–34. doi:10.1016/S1470-2045(08)70285-7.
- [314] Brandi G, de Rosa F, Calzà L, Girolamo S Di, Tufoni M, Ricci CS, et al. Can the tyrosine kinase inhibitors trigger metabolic encephalopathy in cirrhotic patients? *Liver Int* 2013;33:488–93. doi:10.1111/liv.12102.
- [315] Terada T, Noda S, Inui K-I. Management of dose variability and side effects for individualized cancer pharmacotherapy with tyrosine kinase inhibitors. *Pharmacol Ther* 2015;152:125–34. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.009.
- [316] Llovet JM, Decaens T, Raoul J-L, Boucher E, Kudo M, Chang C, et al. Brivanib in patients with advanced hepatocellular carcinoma who were intolerant to sorafenib or for whom sorafenib failed: results from the randomized phase III BRISK-PS study. *J Clin Oncol* 2013;31:3509–16. doi:10.1200/JCO.2012.47.3009.
- [317] Zhu AX, Rosmorduc O, Evans TRJ, Ross PJ, Santoro A, Carrilho FJ, et al. SEARCH: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of sorafenib plus erlotinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2015;33:559–66. doi:10.1200/JCO.2013.53.7746.
- [318] Zhu AX, Kudo M, Assenat E, Cattani S, Kang Y-K, Lim HY, et al. Effect of everolimus on survival in advanced hepatocellular carcinoma after failure of sorafenib: the EVOLVE-1 randomized clinical trial. *JAMA* 2014;312:57–67. doi:10.1001/jama.2014.7189.
- [319] Thomas MB, Chadha R, Glover K, Wang X, Morris J, Brown T, et al. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007;110:1059–67. doi:10.1002/cncr.22886.
- [320] Toh HC, Chen P-J, Carr BI, Knox JJ, Gill S, Ansell P, et al. Phase 2 trial of linifanib (ABT-869) in patients with unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2013;119:380–7. doi:10.1002/cncr.27758.
- [321] Barone C, Basso M, Biolato M, Pompili M, Rufini V, Miele L, et al. A phase II study of sunitinib in advanced hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2013;45:692–8. doi:10.1016/j.dld.2013.01.002.
- [322] Miyahara K, Nouse K, Yamamoto K. Chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma in the sorafenib age. *World J Gastroenterol* 2014;20:4151–9. doi:10.3748/wjg.v20.i15.4151.
- [323] Chao Y, Chung Y-H, Han G, Yoon J-H, Yang J, Wang J, et al. The combination of transcatheter arterial chemoembolization and sorafenib is well tolerated and effective in Asian patients with hepatocellular carcinoma: final results of the START trial. *Int J Cancer* 2015;136:1458–67.

doi:10.1002/ijc.29126.

- [324] Castera L. Non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011;51:625–34. doi:10.1007/s12072-010-9240-0.
- [325] Mueller S, Sandrin L. Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease. *Hepatology* 2010;50:2:49–67.
- [326] Boursier J, de Ledinghen V, Zarski J-P, Rousselet M-C, Sturm N, Foucher J, et al. A new combination of blood test and fibroscan for accurate non-invasive diagnosis of liver fibrosis stages in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1255–63. doi:10.1038/ajg.2011.100.
- [327] Seyama Y, Kokudo N. Assessment of liver function for safe hepatic resection. *Hepatology* 2009;49:107–16. doi:10.1111/j.1872-034X.2008.00441.x.
- [328] Bamber J, Cosgrove D, Dietrich CF, Fromageau J, Bojunga J, Calliada F, et al. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 1: Basic principles and technology. *Ultraschall Med* 2013;34:169–84. doi:10.1055/s-0033-1335205.
- [329] Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007;56:968–73. doi:10.1136/gut.2006.111302.
- [330] Boursier J, Konate A, Guilluy M, Gorea G, Sawadogo A, Quemener E, et al. Learning curve and interobserver reproducibility evaluation of liver stiffness measurement by transient elastography. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:693–701. doi:10.1097/MEG.0b013e3282f51992.
- [331] Bardou-Jacquet E, Legros L, Soro D, Latournerie M, Guillygomarc'h A, Le Lan C, et al. Effect of alcohol consumption on liver stiffness measured by transient elastography. *World J Gastroenterol* 2013;19:516–22. doi:10.3748/wjg.v19.i4.516.
- [332] EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis n.d.
- [333] Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sato T, Ohki T, et al. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology* 2009;49:1954–61. doi:10.1002/hep.22870.
- [334] Jung KS, Kim SU, Ahn SH, Park YN, Kim DY, Park JY, et al. Risk assessment of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma development using liver stiffness measurement (FibroScan). *Hepatology* 2011;53:885–94. doi:10.1002/hep.24121.
- [335] Jung KS, Kim SU. Clinical applications of transient elastography. *Clin Mol Hepatol* 2012;18:163–73. doi:10.3350/cmh.2012.18.2.163.
- [336] Hackl C, Schlitt HJ, Kirchner GI, Knoppke B, Loss M. Liver transplantation for malignancy: current treatment strategies and future perspectives. *World J Gastroenterol* 2014;20:5331–44. doi:10.3748/wjg.v20.i18.5331.
- [337] Jung KS, Kim JH, Kim SU, Song K, Kim BK, Park JY, et al. Liver stiffness value-based risk estimation of late recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma: development and validation of a predictive model. *PLoS One* 2014;9:e99167. doi:10.1371/journal.pone.0099167.
- [338] Bosch J, Navasa M, Garcia-Pagan JC, DeLacy AM, Rodés J. Portal hypertension. *Med Clin North Am* 1989;73:931–53.
- [339] Vergniol J, de Ledinghen V. [Transient elastography (FibroScan): a new tool in hepatology]. *Presse Med* 2009;38:1516–25. doi:10.1016/j.lpm.2008.08.018.
- [340] La Mura V, Nicolini A, Tosetti G, Primignani M. Cirrhosis and portal hypertension: The importance of risk stratification, the role of hepatic venous pressure gradient measurement. *World J Hepatol* 2015;7:688–95. doi:10.4254/wjh.v7.i4.688.

- [341] Kumar A, Sharma P, Sarin SK. Hepatic venous pressure gradient measurement: time to learn! *Indian J Gastroenterol n.d.*;27:74–80.
- [342] Colecchia A, Marasco G, Taddia M, Montrone L, Eusebi LH, Mandolesi D, et al. Liver and spleen stiffness and other noninvasive methods to assess portal hypertension in cirrhotic patients: A review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015;27. doi:10.1097/MEG.0000000000000393.
- [343] Park SH, Park TE, Kim YM, Kim SJ, Baik GH, Kim JB, et al. Non-invasive model predicting clinically-significant portal hypertension in patients with advanced fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:1289–93. doi:10.1111/j.1440-1746.2009.05904.x.
- [344] Abraldes JG, Bureau C, Stefanescu H, Augustin S, Ney M, Blasco H, et al. Noninvasive tools and risk of clinically significant portal hypertension and varices in compensated cirrhosis: The “Anticipate” study. *Hepatology* 2016;64:2173–84. doi:10.1002/hep.28824.
- [345] Berzigotti A, Seijo S, Arena U, Abraldes JG, Vizzutti F, García-Pagán JC, et al. Elastography, spleen size, and platelet count identify portal hypertension in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2013;144:102–111.e1. doi:10.1053/j.gastro.2012.10.001.
- [346] Colecchia A, Montrone L, Scaiola E, Bacchi-Reggiani ML, Colli A, Casazza G, et al. Measurement of spleen stiffness to evaluate portal hypertension and the presence of esophageal varices in patients with HCV-related cirrhosis. *Gastroenterology* 2012;143:646–54. doi:10.1053/j.gastro.2012.05.035.
- [347] Stefanescu H, Grigorescu M, Lupsor M, Procopet B, Maniu A, Badea R. Spleen stiffness measurement using Fibroscan for the noninvasive assessment of esophageal varices in liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:164–70. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06325.x.
- [348] Lemoine M, Katsahian S, Ziol M, Nahon P, Ganne-Carrie N, Kazemi F, et al. Liver stiffness measurement as a predictive tool of clinically significant portal hypertension in patients with compensated hepatitis C virus or alcohol-related cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:1102–10. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03825.x.
- [349] Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, Rega L, Foschi M, Colagrande S, et al. Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:1290–7. doi:10.1002/hep.21665.
- [350] Castera L, Pinzani M, Bosch J. Non invasive evaluation of portal hypertension using transient elastography. *J Hepatol* 2012;56:696–703. doi:10.1016/j.jhep.2011.07.005.
- [351] Testa R, Testa E, Giannini E, Borro P, Milazzo S, Isola L, et al. Noninvasive ratio indexes to evaluate fibrosis staging in chronic hepatitis C: role of platelet count/spleen diameter ratio index. *J Intern Med* 2006;260:142–50. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01673.x.
- [352] Colecchia A, Colli A, Casazza G, Mandolesi D, Schiumerini R, Reggiani LB, et al. Spleen stiffness measurement can predict clinical complications in compensated HCV-related cirrhosis: A prospective study. *J Hepatol* 2014;60:1158–64. doi:10.1016/j.jhep.2014.02.024.
- [353] El-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:1118–27. doi:10.1056/NEJMra1001683.
- [354] de Franchis R, Primignani M. Natural history of portal hypertension in patients with cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2001;5:645–63.
- [355] Burroughs AK, McCormick PA. Natural history and prognosis of variceal bleeding. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1992;6:437–50.
- [356] Bosch J, Abraldes JG, Berzigotti A, García-Pagan JC. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:573–82. doi:10.1038/nrgastro.2009.149.

- [357] Kim MY, Jeong WK, Baik SK. Invasive and non-invasive diagnosis of cirrhosis and portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2014;20:4300–15. doi:10.3748/wjg.v20.i15.4300.
- [358] Fraquelli M, Rigamonti C, Colombo M. Spleen stiffness measured by transient elastography accurately predicts esophageal varices in liver cirrhosis. *Gastroenterology* 2012;143:e23; author reply e23-4. doi:10.1053/j.gastro.2012.07.118.
- [359] Robic MA, Procopet B, Métivier S, Péron JM, Selves J, Vinel JP, et al. Liver stiffness accurately predicts portal hypertension related complications in patients with chronic liver disease: a prospective study. *J Hepatol* 2011;55:1017–24. doi:10.1016/j.jhep.2011.01.051.
- [360] Bureau C, Metivier S, Peron JM, Selves J, Robic MA, Gourraud PA, et al. Transient elastography accurately predicts presence of significant portal hypertension in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:1261–8. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03701.x.
- [361] Kazemi F, Kettaneh A, N'kontchou G, Pinto E, Ganne-Carrie N, Trinchet J-C, et al. Liver stiffness measurement selects patients with cirrhosis at risk of bearing large oesophageal varices. *J Hepatol* 2006;45:230–5. doi:10.1016/j.jhep.2006.04.006.
- [362] Kim BK, Han K-H, Park JY, Ahn SH, Kim JK, Paik YH, et al. A liver stiffness measurement-based, noninvasive prediction model for high-risk esophageal varices in B-viral liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1382–90. doi:10.1038/ajg.2009.750.
- [363] de Franchis R. Non-invasive (and minimally invasive) diagnosis of oesophageal varices. *J Hepatol* 2008;49:520–7. doi:10.1016/j.jhep.2008.07.009.
- [364] Colecchia A, Colli A, Casazza G, Mandolesi D, Schiumerini R, Reggiani LB, et al. Spleen stiffness measurement can predict clinical complications in compensated HCV-related cirrhosis: A prospective study. *J Hepatol* 2014;60:1158–64. doi:10.1016/j.jhep.2014.02.024.
- [365] Lebensztejn DM, Skiba E, Sobaniec-Lotowska M, Kaczmarek M. A simple noninvasive index (APRI) predicts advanced liver fibrosis in children with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2005;41:1434–5. doi:10.1002/hep.20736.
- [366] Lok ASF, Ghany MG, Goodman ZD, Wright EC, Everson GT, Sterling RK, et al. Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort. *Hepatology* 2005;42:282–92. doi:10.1002/hep.20772.
- [367] Bonino F, Arena U, Brunetto MR, Coco B, Fraquelli M, Oliveri F, et al. Liver stiffness, a non-invasive marker of liver disease: a core study group report. *Antivir Ther* 2010;15 Suppl 3:69–78. doi:10.3851/IMP1626.
- [368] Cosgrove D, Piscaglia F, Bamber J, Bojunga J, Correas J-M, Gilja O, et al. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Ultrasound Elastography. Part 2: Clinical Applications. *Ultraschall Der Medizin - Eur J Ultrasound* 2013;34:238–53. doi:10.1055/s-0033-1335375.
- [369] Bamber J, Cosgrove D, Dietrich C, Fromageau J, Bojunga J, Calliada F, et al. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Ultrasound Elastography. Part 1: Basic Principles and Technology. *Ultraschall Der Medizin - Eur J Ultrasound* 2013;34:169–84. doi:10.1055/s-0033-1335205.
- [370] Ripoll C, Lastra P, Rincón D, Catalina V, Bañares R. Comparison of MELD, HVPG, and their changes to predict clinically relevant endpoints in cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2012;47:204–11. doi:10.3109/00365521.2011.645500.
- [371] Berzigotti A, Rossi V, Tiani C, Pierpaoli L, Zappoli P, Riili A, et al. Prognostic value of a single HVPG measurement and Doppler-ultrasound evaluation in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Gastroenterol* 2011;46:687–95. doi:10.1007/s00535-010-0360-z.
- [372] Thalheimer U, Bellis L, Puoti C, Burroughs AK. Should we routinely measure portal pressure in patients with cirrhosis, using hepatic venous pressure gradient (HVPG) as a guide for prophylaxis

and therapy of bleeding and rebleeding? No. *Eur J Intern Med* 2011;22:5–7. doi:10.1016/j.ejim.2010.12.006.

- [373] Castera L. Non-invasive tests for liver fibrosis progression and regression. *J Hepatol* 2016;64:232–3. doi:10.1016/j.jhep.2015.10.011.
- [374] Abraldes JG, Bureau C, Stefanescu H, Augustin S, Ney M, Blasco H, et al. Noninvasive tools and risk of clinically significant portal hypertension and varices in compensated cirrhosis: The “Anticipate” study. *Hepatology* 2016;64:2173–84. doi:10.1002/hep.28824.
- [375] Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, Phillips MJ. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983;402:107–37.
- [376] Onori P, Morini S, Franchitto A, Sferra R, Alvaro D, Gaudio E. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats. *J Hepatol* 2000;33:555–63.
- [377] Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis* 2010;30:258–70. doi:10.1055/s-0030-1255355.
- [378] El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745–50. doi:10.1056/NEJM199903113401001.
- [379] Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al. Incidence of Hepatocellular Carcinoma and Associated Risk Factors in Hepatitis C-Related Advanced Liver Disease. *Gastroenterology* 2009;136:138–48. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.014.
- [380] Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, Farmachidi JP, Degott C, Guettier C, et al. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut* 2000;47:131–6.
- [381] Velázquez RF, Rodríguez M, Navascués CA, Linares A, Pérez R, Sotorriós NG, et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2003;37:520–7. doi:10.1053/jhep.2003.50093.
- [382] Pang Q, Qu K, Zhang J-Y, Song S-D, Liu S-S, Tai M-H, et al. The Prognostic Value of Platelet Count in Patients With Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e1431. doi:10.1097/MD.0000000000001431.
- [383] Pang Q, Qu K, Bi J-B, Liu S-S, Zhang J-Y, Song S-D, et al. Thrombocytopenia for prediction of hepatocellular carcinoma recurrence: Systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2015;21:7895–906. doi:10.3748/wjg.v21.i25.7895.
- [384] Nakayama H, Masuda H, Miyake H, Takayama T, Yokoyama E. Endoscopic Prediction of Hepatocellular Carcinoma by Evaluation of Bleeding Esophageal Varices. *Digestion* 2004;70:233–9. doi:10.1159/000082895.
- [385] Saunders D, Seidel D, Allison M, Lyratzopoulos G. Systematic review: the association between obesity and hepatocellular carcinoma - epidemiological evidence. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:1051–63. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04271.x.
- [386] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87–108. doi:10.3322/caac.21262.
- [387] Kim MN, Kim SU, Kim BK, Park JY, Kim DY, Ahn SH, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients with transient elastography-defined subclinical cirrhosis. *Hepatology* 2015;61:1851–9. doi:10.1002/hep.27735.
- [388] Jung KS, Kim SU, Ahn SH, Park YN, Kim DY, Park JY, et al. Risk assessment of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma development using liver stiffness measurement (FibroScan). *Hepatology* 2011;53:885–94. doi:10.1002/hep.24121.

- [389] Pang JXQ, Zimmer S, Niu S, Crotty P, Tracey J, Pradhan F, et al. Liver stiffness by transient elastography predicts liver-related complications and mortality in patients with chronic liver disease. *PLoS One* 2014;9:e95776. doi:10.1371/journal.pone.0095776.
- [390] Jung KS, Kim SU, Song K, Park JY, Kim DY, Ahn SH, et al. Validation of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma prediction models in the era of antiviral therapy. *Hepatology* 2015;62:1757–66. doi:10.1002/hep.28115.
- [391] Thandassery RB, Kaabi S Al, Soofi ME, Tharian B, Singh R. Noninvasive serum models to predict significant liver related events in chronic hepatitis C. *Hepato Int* 2017;11:401–8. doi:10.1007/s12072-017-9800-7.
- [392] Paik N, Sinn DH, Lee JH, Oh IS, Kim JH, Kang W, et al. Non-invasive tests for liver disease severity and the hepatocellular carcinoma risk in chronic hepatitis B patients with low-level viremia. *Liver Int* 2017. doi:10.1111/liv.13489.
- [393] Mobarak L, Omran D, Nabeel MM, Zakaria Z. Fibro markers for prediction of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients with chronic liver disease. *J Med Virol* 2017;89:1062–8. doi:10.1002/jmv.24720.
- [394] Kim BK, Kim DY, Han K-H, Park JY, Kim JK, Paik YH, et al. Risk assessment of esophageal variceal bleeding in B-viral liver cirrhosis by a liver stiffness measurement-based model. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1654–62, 1730. doi:10.1038/ajg.2011.160.
- [395] Shin SH, Kim SU, Park JY, Kim DY, Ahn SH, Han K-H, et al. Liver stiffness-based model for prediction of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection: comparison with histological fibrosis. *Liver Int* 2015;35:1054–62. doi:10.1111/liv.12621.
- [396] Sharma SA, Kowgier M, Hansen BE, Brouwer WP, Maan R, Wong D, et al. Toronto HCC risk index: A validated scoring system to predict 10-year risk of HCC in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2017. doi:10.1016/j.jhep.2017.07.033.
- [397] Goldschmidt I, Brauch C, Poynard T, Baumann U. Spleen stiffness measurement by transient elastography to diagnose portal hypertension in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59:197–203. doi:10.1097/MPG.0000000000000400.