

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA E PATOLOGIE SISTEMICHE

Direttore: Prof. C.E. Fiore

DOTTORATO DI RICERCA IN:

NUOVI SISTEMI DI VALUTAZIONE E STUDIO DELLE COMPLICANZE EMODINAMICHE
E METABOLICHE DELLE EPATOPATIE CRONICHE – XXIII CICLO

DOTT. GIUSEPPE STEFANO CALVAGNO

ATTUALE RUOLO DIAGNOSTICO E PROGNOSTICO DELLA DES-GAMMA-
CARBOSSI-PROTROMBINA NELL'EPATOCARCINOMA.

Tesi di Dottorato

Tutor: Chiar.mo Prof Gaetano Bertino

Coordinatore: Chiar.mo Prof Gaetano Bertino

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

Premessa	pag. 1
Epidemiologia	pag. 1
Fattori di rischio	pag. 3
<i>Epatite cronica B</i>	pag. 6
<i>Epatite cronica C</i>	pag. 7
<i>Cirrosi da altre cause, non virali.</i>	pag. 8
<i>Co-infezione da virus dell'immunodeficienza umana</i>	pag. 11
<i>Epatite cronica sottoposta a trattamento antivirale.</i>	pag. 11
<i>Altri fattori di rischio</i>	pag. 14
Lo screening per l'HCC: ruolo diagnostico e prognostico della acarbossiprotrombina o des-gamma-carbossi-protrombina (DCP).	pag. 14
Meccanismi di produzione della DCP.	pag. 15
Il ruolo diagnostico della DCP nell'HCC.	pag. 22
Il ruolo prognostico della DCP in HCC.	pag. 26
<i>La DCP nella ripresa di malattia tumorale e nel fenomeno dell'invasione vascolare.</i>	pag. 26
<i>Il ruolo pre-trattamento della DCP.</i>	pag. 33
<i>Rapporto tra la DCP e l'insorgenza del carcinoma epatocellulare nei pazienti con epatite cronica da HBV e HCV.</i>	pag. 40
<i>Il ruolo del DCP nell'angiogenesi.</i>	pag. 41
<i>DCP in sistemi di stadiazione prognostica.</i>	pag. 43
Conclusioni	pag. 44
Iconografia	pag. 48
Bibliografia	pag. 51

Premessa.

Epidemiologia.

HCC è il quinto tumore solido più comune al mondo ed è causa di circa 500.000 decessi ogni anno. [1] L'incidenza di HCC non è uniforme in tutto il mondo, ma varia a seconda della prevalenza delle malattie epatiche preesistenti. La più alta incidenza di carcinoma epatocellulare si registra in Cina (~ 100 per 100.000 abitanti) e nel Sud-Est Asiatico, [2,3] in correlazione con l'elevata incidenza e prevalenza di epatite cronica B (tra 40 e 90%). [4] Allo stesso modo, in Africa, dove l'incidenza di HCC è elevata (ad esempio, in Mozambico, 103 casi /100.000 abitanti /anno), la componente principale del rischio è attribuibile all'epatite cronica da virus B. Al contrario, in Europa è l'epatite C per circa il 63% la causa principale sottostante. [4] Negli Stati Uniti, l'epatite C è il principale fattore di rischio, ma il rischio alcol-correlato è altrettanto elevato (circa il 45%) [4].

Negli ultimi decenni l'HCC ha fatto registrare un notevole incremento di frequenza, tanto da rappresentare fino al 3 – 6% di tutti i tumori solidi negli USA e in Europa e fino al 20 – 40% in Africa e Sud-Est Asiatico. Il sesso maschile è più frequentemente colpito (4:1). Raro al di sotto dei 40 anni, in Occidente presenta picchi di incidenza massima nella 3° e 4° decade. Nella maggior parte dei casi si tratta di cirrosi post-epatitiche, meno frequentemente di cirrosi alcoliche o secondarie ad

emocromatosi. Nord America e Europa occidentale sono generalmente considerate regioni a bassa incidenza (incidenza di 2.6-9.8 per 100.000 abitanti), [2,3], ma in queste regioni l'incidenza di carcinoma epatocellulare è in aumento. Studi da registri tumori hanno mostrato una tendenza all'aumento dell'incidenza e morte per HCC negli Stati Uniti, Francia, Giappone, Scozia, Australia e Italia. [5-11] Negli Stati Uniti questo aumento, del 1.4-2.4 per 100.000/anno, è stato registrato in tutte le razze ed è dovuto principalmente ad un aumento dell'incidenza di HCC correlato al virus dell'epatite C, con aumenti minori del tasso di incidenza di carcinoma epatocellulare associato ad alcool ed epatite B. [8,9,12] Poiché l'epidemiologia dell'epatite cronica C indica un progressivo aumento dei tassi di infezione nel mondo, è probabile che questa tendenza verso una maggiore incidenza di HCC sia destinata ad aumentare. Inoltre, il crescente fenomeno dell'immigrazione di individui provenienti da aree ad alta prevalenza di epatite sia B che C comporterà anche un aumento dei casi di HCC legati all'infezione cronica dei due maggiori virus epatotropi.

L'incidenza di HCC è correlata all'età, ma la distribuzione per età si differenzia nelle diverse regioni del mondo. Il modello epidemiologico attuale suggerisce che l'età media di esordio sia spostata verso un'età più avanzata. Tuttavia nei paesi meno sviluppati, non è raro trovare HCC in soggetti con un'età inferiore ai 45 anni. Queste differenze possono riflettere la differenza di età di esposizione ai virus dell'epatite,

un'esposizione che si verifica frequentemente in giovane età nei paesi ad alta incidenza.

Gli uomini sono più a rischio di HCC rispetto alle donne. Il rapporto di incidenza M:F, pur variando nelle diverse parti del mondo, si attesta fra 1.3 e 3.6. [2] Non vi è, a tutt'oggi, una chiara spiegazione di questo fenomeno. Gli studi condotti su popolazioni migranti hanno chiaramente dimostrato che gli immigrati di prima generazione, portano con sé l'incidenza di HCC presente nei loro paesi d'origine. Tuttavia, nella seconda e nelle successive generazioni, tale incidenza diminuisce. [13-15] Questo è probabilmente il riflesso dell'efficienza di adeguati interventi igienico-sanitari, del miglioramento dell'assistenza sanitaria, e del miglioramento dello stato di salute e delle condizioni di vita in generale, di cui beneficiano le nuove generazioni stabilmente consolidate nel tessuto sociale e sanitario del paese ospitante, con una conseguente minore prevalenza di quadri clinici legati ad eventuali malattie epatiche preesistenti.

Fattori di rischio.

Uno degli aspetti importanti della creazione di un programma di screening per il carcinoma epatocellulare è quello di definirne la popolazione a rischio. Anche se sappiamo che l'epatite cronica B e la cirrosi epatica di qualunque origine siano fattori di rischio

per il carcinoma epatocellulare, il rischio non è uniforme in tutti gli individui con queste condizioni. Nell'ambito della popolazione di soggetti affetti da epatite cronica B e, non c'è dubbio, nella popolazione cirrotica, ci sono individui che sono maggiormente a rischio e altri in cui il rischio è minimo, anche se questo può aumentare nel tempo. La vera sfida è quella di identificare quei soggetti per i quali lo screening potrebbe essere realmente di beneficio ed anche quella di individuare coloro in cui il rischio di carcinoma epatocellulare è sufficientemente basso, da rendere lo screening non necessario.

Poiché non ci sono dati certi per indicare quale sottopopolazione potrebbe trarre beneficio da un programma di screening per HCC, study americani di *decision analysis* (DA) sono stati condotti per determinare i tassi di incidenza di HCC per cui lo screening potrebbe essere efficace. Come regola generale in una DA, un intervento è considerato efficace se prevede un aumento della sopravvivenza di circa 100 giorni, cioè circa 3 mesi. Se ciò può essere realizzato ad un costo inferiore a circa 50.000 dollari per anno di vita guadagnato, l'intervento è considerato redditizio. [16,17] Ci sono due modelli di DA, che cercano di individuare il reale rapporto costo-beneficio di un programma di screening per il carcinoma epatocellulare in una popolazione *nontransplant*. [18 , 19] I due modelli si differenziano per la natura della popolazione oggetto di analisi teorica e nei metodi di screening messi in atto. Questi modelli, tuttavia, hanno dimostrato che lo screening è non solo efficace, ma anche redditizio, anche se in

alcuni casi solo marginalmente. Sarasin et al [18] hanno studiato una coorte di pazienti affetti da cirrosi epatica in classe Child A e hanno scoperto che, grazie allo screening, una incidenza di HCC diagnosticati pari a 1.5%/anno ha comportato un aumento della sopravvivenza di circa 3 mesi. Tuttavia, nello stesso studio, se l'incidenza di carcinoma epatocellulare era del 6%, l'aumento della sopravvivenza si allungava a 9 mesi. Questo studio non ha incluso il trapianto come opzione di trattamento. Arguedas et al, [19] con un'analisi simile che ha incluso il trapianto di fegato come opzione terapeutica, ha dimostrato che l'importanza dello screening diviene significativa quando l'incidenza di carcinoma epatocellulare supera l'1.4% / anno. Questi dati suggeriscono che nei pazienti con cirrosi di eziologia diversa, lo screening può essere efficace quando il rischio di HCC supera ~ 1.5% / anno.

Tuttavia, nei soggetti con epatite cronica B, l'HCC può svilupparsi anche in un fegato non ancora cirrotico, come i dati epidemiologici ci suggeriscono, in particolare, per quanto riguarda i pazienti asiatici e africani. Le precedenti analisi di valutazione del rapporto *cost-efficacy*, che sono state limitate a popolazioni di cirrotici, possono non essere applicate ai portatori cronici di HBV non cirrotici.

L'analisi della efficacia dello screening in portatori cronici di epatite B ha suggerito che lo screening risulta efficace quando l'incidenza di HCC supera lo 0.2% / anno. Un tasso di incidenza quindi più basso per l'epatite cronica B è probabilmente riflesso di una minore prevalenza di cirrosi in questo gruppo di pazienti

e, conseguentemente, di una maggiore possibilità di resezione chirurgica. Dopo aver stabilito i tassi di incidenza al di sopra dei quali lo screening può essere efficace, il passo successivo è quello di individuare le popolazioni in cui l'incidenza di carcinoma epatocellulare è superiore al valore soglia.

Epatite cronica B

Il più grande studio prospettico controllato del rischio di carcinoma epatocellulare nei portatori maschi di epatite cronica B [20,21] ha dimostrato che l'incidenza complessiva di HCC in portatori cronici di HBV era di 0.5% / anno. L'incidenza aumentava con l'età e all'età di 70 anni era dell'1%. L'incidenza nei pazienti con cirrosi nota era del 2.5% / anno. Altri studi prospettici hanno raggiunto conclusioni simili. [22] In queste popolazioni, l'incidenza di HCC superava lo 0.2% a circa 40 anni. Pertanto, questa età è stata scelta come l'età in cui iniziare lo screening negli uomini di razza asiatica. Sebbene in questa popolazione l'HCC si verifichi anche in pazienti più giovani, l'efficacia di fornire screening a tutti i portatori di HBV di età inferiore ai 40 anni è scarsa. L'incidenza di HCC in donne asiatiche è più bassa che negli uomini, e pertanto si ritiene opportuno iniziare lo screening per i soggetti di sesso femminile a partire dai 50 anni. Tra gli asiatici, una storia di un parente di primo grado con carcinoma epatocellulare è un altro fattore di rischio per HCC [23], e se c'è una storia familiare di carcinoma

epatocellulare la sorveglianza dovrebbe iniziare in giovane età. Non è chiaro se questi risultati si applichino ad altre popolazioni. In Nord America l'incidenza di carcinoma epatocellulare in portatori cronici di virus dell'epatite B è molto variabile e può raggiungere lo 0.46% / anno. [24-26] Per i portatori cronici di epatite B di razza caucasica, in Europa, l'HCC insorge in larga misura nella popolazione dei cirrotici, [27-29] e quindi è più probabile lo screening risulti più efficace nei pazienti con cirrosi nota. I portatori cronici che sono anti-HBe-positivi con malattia inattiva a lungo termine e che non hanno cirrosi sembrano avere un minore rischio per lo sviluppo di HCC. [27-29] Se lo screening sia dunque utile in questa popolazione non è chiaro. Tuttavia, poiché dal 20 al 30% di tali pazienti si osserva una riattivazione della malattia epatitica, una qualche forma di monitoraggio a lungo termine è richiesta. I soggetti africani affetti da epatite cronica da virus dell'epatite B sembrano contrarre HCC in giovane età. [30,31] Anche se non è possibile definire con precisione l'età appropriata per iniziare la sorveglianza per HCC in queste popolazioni, è possibile affermare che lo screening per HCC dovrebbe iniziare in un'età più giovane per i soggetti di razza asiatica.

Epatite cronica C

Il rischio di carcinoma epatocellulare nei pazienti con epatite cronica C è elevato soprattutto nei pazienti con cirrosi

conclamata, [32-35] in cui l'incidenza di carcinoma epatocellulare è compresa tra 2 e 8% all'anno.

Sebbene anche i pazienti con fibrosi allo stadio 3 dovrebbero essere sottoposti a screening, non è chiaro se questo sia efficace, perché il rischio di sviluppare HCC in questi pazienti è più basso e può non superare il 1.5% / anno. Tuttavia, il punto in cui il rischio di HCC inizia ad aumentare non è ben noto, né tanto meno è possibile stabilire con precisione temporale il momento della transizione a cirrosi. L'Associazione Europea per lo Studio del Fegato (EASL) [37] suggerisce che lo screening dovrebbe essere proposto a pazienti con epatite C e fibrosi allo stadio 3, anche se l'efficacia dei costi di questa raccomandazione non è stata valutata. Ci sono stati tentativi di sviluppare un punteggio predittivo per valutare il rischio di HCC. [38,39] Sono stati condotti diversi altri studi volti a sviluppare marcatori non invasivi, capaci sia di predire la presenza di cirrosi che di prevedere un significativo rischio di HCC. Uno di questi marcatori indiretti non invasivi è la conta piastrinica. È stato suggerito che l'incidenza di HCC in cirrosi da epatite C aumenta quando la conta piastrinica è inferiore a $100.000/\text{mm}^3$. [40] Questo dato tuttavia deve essere ancora validato.

Cirrosi da altre cause, non virali.

La dimensione del rischio di insorgenza di HCC nella cirrosi causata da altre malattie che non siano l'epatite cronica virale B

e/o C, non è nota con precisione. La maggior parte degli studi sull'incidenza di HCC nei fegati affetti da cirrosi alcolica sono datati prima dell'identificazione dell'HCV. Dato che l'epatite C è relativamente frequente negli alcolisti, i tassi di incidenza riportati riflettono un valore che supera quello relativo al rischio di HCC a causa della sola cirrosi alcolica. Tuttavia, che la cirrosi alcolica sia un fattore di rischio per il carcinoma epatocellulare non vi sono dubbi. Diversi studi hanno documentato che la presenza della malattia epatica alcolica è correlata con lo sviluppo di HCC. [41,42] Negli Stati Uniti, il tasso di ospedalizzazioni approssimative per HCC correlate a cirrosi alcolica è stato stimato tra l'8 e il 9 per 100.000 per anno rispetto a ~ 7 per 100.000 per anno per l'epatite C. [43] Questo studio ha confermato che la cirrosi alcolica è un fattore di rischio significativo per HCC, probabilmente sufficiente a giustificare, su questa popolazione di epatopatici, lo screening per il carcinoma epatocellulare.

Grazie alle attuali acquisizioni fisiopatologiche e cliniche circa il ruolo eziologico della steatoepatite quale causa di cirrosi, e grazie alle evidenze biomolecolari e istopatologiche del rapporto tra steatoepatite e fibrosi del fegato, è possibile affermare che la steatoepatite rappresenta un altro fattore di rischio per HCC. Nessuno studio finora ha seguito un gruppo sufficientemente ampio di pazienti, o per un periodo abbastanza a lungo per descrivere con precisione il tasso di incidenza di carcinoma epatocellulare in questi pazienti. In uno studio di coorte di

pazienti affetti da carcinoma epatocellulare [44], il diabete è stato trovato nel 20% dei casi come l'unico fattore di rischio per il carcinoma epatocellulare. Tuttavia se questi pazienti fossero anche cirrotici o no, non è stato valutato. La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è stata descritta in coorti di pazienti con HCC. [45] Poiché l'incidenza di HCC in cirrosi NAFLD-correlate è sconosciuta, non è possibile valutare se, in questo gruppo di pazienti, lo screening potrebbe essere in qualche modo efficace. I pazienti con emocromatosi genetica (GH) che hanno sviluppato cirrosi hanno un aumentato rischio di HCC. [46-48] Il rischio relativo di carcinoma epatocellulare è ~ 20. [46] Il rapporto di incidenza standardizzato per HCC in cirrotici con GH è di 93. [47] Un altro studio ha suggerito che il rischio relativo di carcinoma epatocellulare in GH era pari a 1.1. [48] Tuttavia, l'incidenza di HCC nei soggetti affetti da cirrosi correlata alla GH è sufficientemente elevata dal 3 al 4% / anno, al punto che questi pazienti dovrebbero essere inclusi nei programmi di screening. L'incidenza di HCC nei pazienti affetti da cirrosi biliare primitiva è pressoché sovrapponibile a quella dei pazienti con cirrosi HCV-correlata. [49] Per le cirrosi legate al deficit di α 1-antitripsina [50,51] o secondarie ad epatiti croniche autoimmuni, non ci sono dati sufficienti per valutare con precisione l'incidenza di HCC.

Co-infezione da virus dell'immunodeficienza umana

I pazienti con epatite cronica virale che presentino anche co-infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV) sono ad elevato rischio di carcinoma epatocellulare [52]. Lo studio GERMIVIC ha indicato che l'HCC è stato responsabile del 25% di tutti i decessi nel periodo successivo all'introduzione della terapia antiretrovirale ad elevata attività (HAART). [53] Pertanto, in questa importante sottopopolazione di epatopatici cronici, il rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare è significativamente elevato, ed è giustificato inserire a pieno titolo questi pazienti in un programma di screening per HCC.

Epatite cronica sottoposta a trattamento antivirale.

Diversi studi, in Europa, hanno suggerito che la terapia con interferone pegilato per l'epatite cronica da virus B sia capace di promuovere un aumento della sopravvivenza e possa ridurre l'incidenza di carcinoma epatocellulare. [54-56] Uno studio condotto in Taiwan ha anche indicato che il successo terapeutico della trattamento con interferone, end-point inteso in questo lavoro come comparsa e sviluppo di anti-HBe, era associato ad una ridotta incidenza di carcinoma epatocellulare. [57] Tuttavia, in questo studio l'incidenza è stata bassa, ed inoltre la dimensione del campione era relativamente piccola. Al contrario, uno altro

studio non randomizzato controllato, che includeva una coorte di pazienti maggiore, seguita per un intervallo di tempo più lungo, dimostrava che l'incidenza di HCC non diminuiva nel gruppo trattato. [58] Un solo report suggerisce che il trattamento con lamivudina dei portatori cronici di virus B con cirrosi sembra ridurre l'incidenza di carcinoma epatocellulare [59], ma se tale riduzione del rischio per HCC sia sufficiente a giustificare l'esclusione di questi pazienti da un programma di screening non è chiaro. Quindi, sembra prudente continuare ad prestare un'attenta sorveglianza agli individui asiatici portatori cronici di HBV con cirrosi epatica, anche dopo la sierconversione terapia-indotta, mentre questo può non essere appropriato per i non cirrotici di razza caucasica portatori cronici di HBV che abbiano ottenuto la sierconversione dopo la terapia. Ci sono molti studi che valutano l'effetto del trattamento dell'epatite cronica da virus C sull'incidenza di carcinoma epatocellulare. Un singolo studio randomizzato controllato in Giappone, ha dimostrato che l'incidenza di HCC è stata ridotta in entrambi i responders ed i non responders a interferone. [60] Questi risultati non sono però stati confermati in un secondo studio randomizzato-controllato condotto da un gruppo francese. [61] I risultati di questi e di altri studi sono stati riassunti in una meta-analisi, che ha concluso che il beneficio, in termini di riduzione del rischi per HCC, è stato osservato soprattutto in quei pazienti che hanno presentato una risposta virologica sostenuta (SVR), tuttavia anche in questo caso l'entità di questo effetto era modesta. [62] Numerosi studi sono

stati condotti in Giappone in relazione all'incidenza di epatocarcinoma nei pazienti affetti da epatite cronica da HCV sottoposti a terapia antivirale di combinazione. [63-68] Questi studi hanno dimostrato, nel loro insieme, che vi è una ridotta incidenza di carcinoma epatocellulare nei pazienti trattati. Il beneficio è maggiore in coloro i quali sono andati incontro a eradicazione dell'infezione da HCV, [69], anche se qualche beneficio è ancora evidente in coloro che non sono riusciti a raggiungere questo importante obiettivo virologico. Quindi, sembra ragionevole che i pazienti con epatite cronica C e cirrosi che abbiano raggiunto la clearance virale con il trattamento, dovrebbero, almeno per ora, continuare a sottoporsi a screening per HCC. Si noti che tutti i pazienti che abbiano raggiunto spontaneamente o dopo terapia l'inattivazione dell'epatite cronica B o C, possono mostrare una certa regressione della fibrosi sufficiente a suggerire una parziale involuzione della cirrosi. Il rischio di HCC in questi pazienti probabilmente non diminuisce proporzionalmente con il miglioramento della fibrosi. Ci sono molte teorie circa la patogenesi del carcinoma epatocellulare in questi pazienti, ma un fattore comune sembra essere il fatto che fenomeni ripetuti di necrosi e rigenerazione sono necessari per l'insorgenza dell'HCC. Gli eventi biologici e genetici necessari per avviare il processo cancerogeno probabilmente si verificano molti anni prima che l'epatite diventi inattiva, e così il rischio di HCC persiste anche se si riduce la fibrosi.

Altri fattori di rischio

Diversi autori hanno identificato altri fattori, non legati ad alcuna patologia epatica specifica, ma è probabile che tutti siano legati alla possibilità di indurre cirrosi epatica. Questi includono un livello persistentemente elevato α -fetoproteina (AFP), [70,71] e quadri istologici come la displasia a grandi cellule [72-73].

Lo screening per l'HCC: ruolo diagnostico e prognostico della acarbossiprotrombina o des-gamma-carbossiprotrombina (DCP).

La strategia di screening per HCC attualmente raccomandata per i pazienti con cirrosi epatica comprende la determinazione sierica dell' α -fetoproteina (AFP) e una ecografia addominale ogni 6 mesi, allo scopo di rilevare l'HCC in fase precoce. L'AFP, tuttavia, è un marcatore caratterizzato da scarsa sensibilità e specificità, e l'ecografia addominale è una tecnologia di imaging che è altamente dipendente dall'esperienza dell'operatore.

Oltre alla AFP, la *Lens Culinaris Agglutinin A-reactive fraction* dell'AFP (AFP-L3), la acarbossiprotrombina e diversi altri biomarcatori (come il glypican-3, lo human hepatocyte growth factor, l'insulin-like growth factor, e gli squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes) sono stato proposti come markers potenzialmente utili per la diagnosi precoce di HCC [80-

93]. L'acarbossiprotrombina è conosciuta anche come *protrombina indotta dalla mancanza di vitamina K-II* o *des-gamma-carbossi-protrombina* (DCP), è un importante marcatore bioumorale dosabile nel siero dei pazienti con HCC, ma non rilevabile in quello dei soggetti sani.

Meccanismi di produzione della DCP.

La acarbossiprotrombina è prodotta dagli epatociti maligni e sembra derivare da un difetto acquisito nella carbossilazione post-traduzionale vitamina K-dipendente di un precursore protrombinico (10 residui di acido glutammico al terminale N). Per questo motivo, acarbossiprotrombina è anche definita come *des-gamma-carbossi-protrombina* (DCP). La ridotta attività di gamma-carbossilasi è stata attribuita alla espressione del gene difettoso nei pazienti con HCC [94-99]. In un recente documento, Ueda N. e colleghi hanno dimostrato che la variante genica *exon-2-deletion splice* delle gamma-glutamil carbossilasi causa la produzione DCP in linee cellulari di carcinoma epatocellulare. Utilizzando una real-time PCR gene-specifica per la gamma-glutamil carbossilasi (GGCX), l'mRNA della variante *exon-2-deletion splice* della GGCX vitamina K-dipendente è stato identificato in linee cellulari di carcinoma epatocellulare. Le espressioni sia del gene wild-type che di questa variante della GGCX sono stati analizzati in termini di produzione DCP in

linee cellulari di carcinoma epatocellulare. Hep3B, HepG2, HuH1, HuH7 e PLC/PRF/5 producevano DCP mentre SK-Hep-1, HLE, HLF, e JHH1 non sembravano produrre livelli rilevabili di DCP. Le linee cellulari che producevano DCP esprimevano pertanto l'mRNA della variante *exon-2-deletion splice* per la GGCX mentre le cellule DCP-negative non esprimevano livelli rilevabili di questo mRNA variante. Questi risultati suggeriscono che la variante *exon-2-deletion splice* della GGCX possa determinarne una disfunzione nell'attività enzimatica, con conseguente produzione di DCP in linee cellulari di carcinoma epatocellulare [94]. Nei pazienti con HCC, la produzione DCP è indipendente dalla carenza di vitamina K, sebbene dosi farmacologiche di vitamina K possano transitoriamente sopprimere la produzione di DCP in alcuni tumori.

Il nostro gruppo di ricerca ha studiato l'effetto della somministrazione di vitamina K sulla produzione di DCP e AFP in pazienti con HCC. Abbiamo anche misurato le concentrazioni sieriche di vitamina K per individuare una relazione tra vitamina K ed i livelli sierici di DCP e abbiamo cercato di studiare i meccanismi responsabili dell'elevazione sierica di questo marcatore. Abbiamo determinato i livelli sierici di DCP e AFP e le concentrazioni di vitamina K in 64 pazienti cirrotici con HCC e in 60 pazienti cirrotici senza HCC. Nei soggetti con HCC, i livelli di DCP e AFP sono stati misurati prima e dopo la somministrazione della vitamina K. Solo i pazienti con HCC avevano livelli rilevabili di DCP e significativi livelli di AFP. La

somministrazione di vitamina K riduceva i livelli di DCP ma quelli dell'AFP nel gruppo dei pazienti con carcinoma epatocellulare. Nessuna correlazione è stata osservata tra concentrazione di vitamina K e livelli di DCP: la concentrazione di vitamina K è risultata simile nel gruppo con HCC e nel gruppo di controllo senza HCC; i pazienti con HCC avevano le stesse concentrazioni di vitamina K, indipendentemente dai loro livelli di DCP, dopo somministrazione di vitamina K. Pertanto la presenza di livelli sierici di DCP rilevabili sono probabilmente il risultato di una carenza di vitamina K e/o della presenza di difetti selettivi di carbossilazione e/o alterazioni della membrana epatocitaria, in termini sia di meccanismi recettoriali e che di fenomeni di trasferimento transmembrana, che sono necessari per la corretta funzione della vitamina K [100].

In epatociti normali, la vitamina K induce la sintesi della protrombina attiva dal suo precursore inattivo, attraverso reazioni di carbossilazione su residui di glutammato. In presenza di protrombina sierica anormale (DCP), un deficit di vitamina K o la somministrazione di antagonisti della vitamina K (ad esempio, dicumarolo) sono in grado di inibire l'attività di carbossilazione vitamina K-dipendente nel fegato. Come numerosi studi hanno dimostrato, i livelli di DCP sono utili nei pazienti con HCC e livelli di AFP inferiori a 400 ng/ml, e il controllo combinato dei livelli di AFP e DCP, sia in fase di screening che durante il follow-up dei pazienti con carcinoma epatocellulare è stato proposto per migliorare sia la sensibilità che la specificità e

ridurre l'area sotto la *Receiver Operating Characteristic Curve* (ROC) [101, 96, 102-106].

A causa della stretta relazione tra HCC e DCP, abbiamo studiato e valutato se l'aumento dei livelli sierici di DCP potesse essere secondario a carenza di vitamina K, piuttosto che ad un disturbo del sistema carbossilazione vitamina K-dipendente in cellule neoplastiche.

I nostri risultati mostrano che la somministrazione di vitamina K ha inibito la produzione DCP in modo dose-dipendente, ma non ha avuto alcun effetto sulla produzione di AFP. Infatti, l'elevazione dei livelli sierici di DCP in pazienti con HCC è stata soppressa dalla somministrazione di vitamina K (Figura 1). Questi risultati suggeriscono che la vitamina K può avere un ruolo nel meccanismo di elevazione del livello di DCP nel siero dei pazienti con HCC. Pertanto, misurate le concentrazioni sieriche di vitamina K in questi pazienti, abbiamo osservato che non vi era alcuna correlazione tra i livelli sierici di vitamina K e DCP, infatti, i soggetti con HCC nei quali si è osservata una riduzione dei livelli di DCP dopo somministrazione di vitamina K, questa aveva la stessa concentrazione nel siero, al pari dei soggetti con HCC che non hanno avuto una riduzione significativa dei livelli di DCP dopo la somministrazione della vitamina K. Questo particolare risultato suggerisce che l'elevazione della DCP sierica in questi pazienti non è probabilmente dovuta a carenza di vitamina K. Alcuni studi hanno suggerito che la produzione sia DCP sia il risultato di un

difetto acquisito nella carbossilazione post-traduzionale del precursore della protrombina in cellule neoplastiche e che, nelle cellule di HCC, vi sia un'espressione anormale del gene che codifica per la gamma-carbossilasi con una riduzione dell'attività gamma-carbossilante nel suo insieme [95,96].

Tuttavia, non è plausibile che l'aumento dei livelli sierici di DCP sia solo dovuto ad un difetto del sistema di carbossilazione vitamina K-dipendente in cellule neoplastiche, infatti, se così fosse, la somministrazione di vitamina K non sarebbe in grado di inibire la produzione di DCP. Nel nostro studio, la produzione DCP è stata inibita quando veniva somministrata vitamina K nei soggetti con HCC ed alti livelli circolanti di DCP. Pertanto, la comparsa di DCP nel siero di soggetti con HCC non è espressione di una significativa carenza di vitamina K o una singola alterazione di un gene che codifica per la gamma-carbossilasi.

La vitamina K ha bisogno di legarsi al colesterolo LDL per l'attivazione della gamma-carbossilasi, e questo complesso vitamina K-LDL deve essere riconosciuto da specifici recettori per le lipoproteine a bassa densità (LDL) sull'epatocita. Quindi la vitamina K viene internalizzata nell'epatocita e trasportata attraverso il citoplasma al sito attivo dell'enzima [99]. È plausibile supporre che, nel carcinoma epatico, l'alterazione genetica, che è sicuramente presente, come suggerito da alcuni autori [100-102], si caratterizza per la sintesi di una carbossilasi che non è completamente attiva, per l'espressione ridotta o

alterata dei recettori di membrana per le LDL e per altre disfunzioni nei sistemi di trasferimento intracitoplasmatici. Questa condizione determina una carenza "relativa" di vitamina K nelle cellule neoplastiche del carcinoma epatocellulare e, conseguentemente, l'inefficiacia di tutto il sistema di gamma-carbossilazione. Pertanto, lo sviluppo di questa "resistenza alla vitamina K" potrebbe essere interpretata come espressione di alterazioni genetiche nelle cellule di HCC. La somministrazione di un carico di vitamina K potrebbe superare la soglia di questa resistenza a livello della membrana citoplasmatica e ripristinare una normale concentrazione intracellulare di vitamina K. A sua volta, la ripresa della funzione di gamma-carbossilazione, ripristinando la carbossilazione dei residui di glutammato, determinerebbe la produzione di una protrombina normale e attiva, invece di una protrombina anomala, la DCP appunto.

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che: a) in pazienti con HCC, il fallimento della carbossilazione dei residui di acido glutammico sulla molecola della protrombina non è solo dovuto a carenza di vitamina K, ma anche a difetti selettivi della carbossilasi. Infatti, la funzione normale della gamma-carbossilasi viene ripristinata dalla somministrazione di carichi di vitamina K; b) nelle cellule di HCC producenti DCP, alterazioni dei recettori di membrana epatocitaria, e l'incapacità di assorbimento delle lipoproteine a bassa densità (LDL), modifiche del citoscheletro durante fenomeni di conversione degli epatociti

in fibroblasti e disfunzioni nel trasferimento e trasporto citoplasmatico della vitamina K possono insieme svolgere un ruolo importante nella determinazione di elevati livelli sierici di DCP.

Queste ipotesi sono state successivamente confermate da uno studio di Murata K e colleghi [107,108]. Gli autori di questo studio hanno suggerito che la DCP sia prodotta da cellule di HCC che presentano un danno funzionale nell'assorbimento della vitamina K. Dato che, come precedentemente segnalato, la down-regulation della Caderina-E e l'incremento nel siero della DCP nei pazienti con carcinoma epatocellulare sono associati ad un aumentato rischio di invasione vascolare, metastasi intraepatiche e recidiva tumorale, gli autori hanno esaminato se le cellule di HCC iniziassero a produrre DCP a seguito della conversione fenotipica in fibroblasti (*epithelial-to-fibroblastoid*, EFC) in vitro. Cellule HepG2 sono state indotte alla EFC dal promotore tumorale 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). La produzione di DCP è stata osservata nelle cellule HepG2 che avevano perso l'espressione della Caderina-E in maniera TPA-dose-dipendente. La produzione di DCP è stata inibita con l'aggiunta di vitamina K nelle cellule trattate. Inoltre, l'assorbimento delle LDL, come espressione della captazione della vitamina K, è stata significativamente ridotta nelle cellule HepG2 trattate con TPA. Le cellule con ridotta captazione di LDL producevano DCP. Le vitamine liposolubili vengono assorbite nelle cellule per endocitosi clatrina-mediata, in cui la

polimerizzazione dinamica dell'F-actina svolge un ruolo cruciale. Gli autori hanno scoperto che le cellule HepG2 con riarrangiamento per l'F-actina erano in grado di produrre DCP. Inoltre, la latrunculina A, un depolimerizzatore dell'actina, induceva cellule HepG2 naïve a produrre DCP, attraverso la compromissione della captazione delle LDL, confermando che la disfunzione di polimerizzazione dell'F-actina è un meccanismo chiave della produzione della DCP. Inoltre, l'actina filamentosa, che è coinvolta nei fenomeni di endocitosi clatrina-mediata, subiva una dissociazione nelle cellule produttrici DCP. In vitro i cambiamenti dei filamenti del citoscheletro legati alla conversione fenotipica EFC sono cruciali per la produzione di DCP nelle cellule HepG2, come mostrato nello studio di Murata. Inoltre, la neutralizzazione della Camerina-E con un anticorpo specifico sembra prevenire la produzione di DCP. Infatti, studi immunostochimici hanno dimostrato che la produzione DCP era inversamente correlata con l'intensità dell'espressione della Camerina-E in cellule di HCC. In conclusione, i cambiamenti del citoscheletro durante la EFC giocano un ruolo critico nella produzione di DCP attraverso il blocco dell'assorbimento della vitamina K [107,108].

Il ruolo diagnostico della DCP nell'HCC.

Lo screening per l'HCC è raccomandato nei pazienti ad alto rischio. I pazienti ad alto rischio includono praticamente tutti i

pazienti con cirrosi ed alcuni pazienti con infezione HBV-HCV, indipendentemente dalla presenza o meno di cirrosi. La valutazione nel siero dell'AFP e l'ecografia del fegato (US) sono gli strumenti più utilizzati per la sorveglianza dell'HCC. Sulla base dei tempi di crescita e di sviluppo dell'HCC, l'intervallo di sorveglianza raccomandato è di 6 mesi [109,110,111]. La performance di un esame ecografico del fegato dipende da diversi fattori: l'esperienza dell'esaminatore, la tecnologia utilizzata, l'habitus del paziente, la presenza di cirrosi e le dimensioni del tumore. Studi recenti indicano per l'US in genere una sensibilità del 60% e una specificità del 90% (40). La sensibilità dell'US nel rilevare noduli tumorali nel fegato cirrotico è particolarmente bassa [112,113]. Un livello di AFP nel siero pari a 20 ng/mL, comunemente usato come limite superiore rispetto alla norma [114,115], ha una bassa sensibilità (25% al 65%) per la rilevazione di HCC ed è quindi considerato inadeguato come test di screening isolato. I pazienti con malattie croniche del fegato, in particolare quelli con un elevato grado di rigenerazione epatocitaria (ad esempio, HCV), sono infatti in grado di esprimere elevati livelli serici di AFP in assenza di malignità [116,117,118]. Altri test, come la DCP e la lectina-bound AFP (AFP-L3) sono disponibili, ma non ci sono dati prospettici affidabili sulla loro efficacia nello screening per HCC. Pertanto, le attuali linee guida sostengono l'uso di un US ogni 6-12 mesi per lo screening del carcinoma epatocellulare nei pazienti ad alto rischio. L'uso isolato del dosaggio dell'AFP è

fortemente sconsigliato, e il suo impiego in aggiunta all'esame US è controverso. Attualmente, livelli sierici di AFP superiori a 200 ng / mL sono altamente specifici per la diagnosi di carcinoma epatocellulare nei pazienti con evidenza radiologica di cirrosi e di lesioni focali epatiche. Tuttavia, la sensibilità del siero AFP è molto più bassa perché è stato riferito che solo un terzo dei pazienti con HCC hanno livelli di AFP superiori a 100 ng / mL [109]. La DCP è un marker tumorale ben riconosciuto per la diagnosi di HCC. La sua accuratezza diagnostica è stata valutata in diversi studi, ma con risultati contrastanti. Un livello DCP di 40 mAU / mL è comunemente utilizzato come cut-off: a questo valore, il tasso di individuazione precoce di piccoli HCC aumenta [119]. La presenza nel siero di DCP per la diagnosi di epatocarcinoma si è visto possiede una sensibilità che va dal 48% al 62%, una specificità che va dall'81% al 98%, ed una accuratezza diagnostica che oscilla tra il 59% e 84%, come emerge da diversi studi caso-controllo su grandi popolazioni [95,120]. La DCP è stato segnalato essere più sensibile e specifica rispetto all'AFP nella diagnosi del carcinoma epatocellulare, soprattutto nei paesi dell'Asia orientale e in Nord America [120,121,122]. Al contrario, in Europa, gli studi hanno mostrato risultati diversi. Queste discordanze sono legate non solo ai diversi fattori razziali ma anche ai diversi fattori eziologici della malattia cronica di fegato sottostante.

La DCP plasmatica non correla direttamente con i livelli di AFP, anche se la misura di entrambi i marcatori è consigliata per

aumentare l'efficacia diagnostica dei singoli tests [121]. Quando vengono utilizzati insieme, DCP e AFP aumentano la sensibilità per la diagnosi di HCC in oltre l'85% dei pazienti. Per quanto riguarda la specificità, il dosaggio della DCP sembra avere un potere superiore a quello dell'AFP; infatti meno del 5% dei pazienti con patologie epatiche croniche non maligne hanno livelli di DCP superiori a 100 ng / ml. Nei pazienti con lesioni nodulari di HCC di dimensioni medio-grandi, i livelli di DCP correlano meglio con le dimensioni del tumore, mostrandosi aumentati solo nel 20% dei pazienti con tumori inferiori a 3 cm [94].

Uno studio ha confrontato le caratteristiche “prestazionali” di AFP, DCP e AFP-L3 nella diagnosi di carcinoma epatocellulare. La DCP è risultata significativamente migliore rispetto agli altri marcatori nella differenziazione dell'HCC dalla cirrosi, con una sensibilità dell'86% e una specificità del 93% [101]. Tuttavia, la dimensione del tumore può influenzare la sensibilità e la specificità della DCP nella rilevazione dell'HCC. Secondo uno studio condotto da Nakamura e colleghi [123], l'efficacia di DCP è stata inferiore a quella dell'AFP nella diagnosi di piccoli HCC, anche se è stata superiore a quella dell'AFP per i tumori di grandi dimensioni. Altri studi più recenti hanno valutato il ruolo diagnostico del DCP e la sua correlazione con AFP. Nello studio di Baek YH e colleghi, è stata valutata la correlazione tra DCP e la stadiazione dell'HCC. Questo studio ha dimostrato che gli indici di positività per DCP nel siero di pazienti con tumore di

dimensioni superiori a 5 cm, tra 3 e 5 cm, e meno di 3 cm erano superiori a quelli dell'AFP (96%, 83%, 74% vs 65%, 57%, 48%, rispettivamente). Inoltre, sembra esserci una certa correlazione tra la DCP e i maggiori sistemi di stadiazione come il TNM (*Tumour Node Metastasis staging system*), il *Cancer of the Liver Italian Program Score* e il *Japan Integrated Staging Score* ($p < 0.05$). I risultati di questo studio mostrano che la DCP è un indicatore utile per la rilevazione dell'HCC (soprattutto dei piccoli HCC) e che essa può ben correlare con gli attuali sistemi di stadiazione [124].

Il ruolo prognostico della DCP in HCC.

La DCP nella ripresa di malattia tumorale e nel fenomeno dell'invasione vascolare.

I principali risultati post-trattamento per i pazienti con carcinoma epatocellulare sono la sopravvivenza e l'assenza di recidiva di HCC. Questi due outcomes si attestano ancora oggi a valori bassi a causa di una diagnosi tardiva. Lok AS e colleghi hanno confrontato l'accuratezza dell'AFP e della DCP nella diagnosi precoce di HCC. Tra i 1.031 pazienti randomizzati nel trial *Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment Against Cirrhosis (HALT-C)*, uno studio caso-controllo di 39 casi di HCC (24 fase iniziale) e 77 controlli appaiati è stato condotto per confrontare le

prestazioni di AFP e DCP. Il test è stato eseguito sul siero dei pazienti 12 mesi prima (mese -12) del momento della diagnosi di HCC (mese 0). Per confrontare il valore diagnostico di DCP e AFP, una curva ROC è stata costruita (Figura 2). La sensibilità e la specificità della DCP al mese 0 sono stati il 74% e l'86%, rispettivamente, ad un cut-off di 40 mAU / mL e il 43% e il 100%, rispettivamente, ad un cut-off di 150 mAU / mL. La sensibilità e la specificità di AFP al mese 0 è stata del 61% e 81% ad un cut-off di 20 ng / mL e il 22% e il 100% ad un cut-off di 200 ng / mL. Al mese -12, la sensibilità e la specificità a basso cut-off è stata del 43% e 94%, rispettivamente, per DCP e il 47% e 75%, rispettivamente, per AFP. La combinazione di entrambi i marcatori ha aumentato la sensibilità fino al 91% per il mese 0 e al 73% a dodici mesi, ma la specificità è diminuita al 74% e 71% rispettivamente. La diagnosi precoce di HCC è stata eseguita con US in 14 pazienti, mediante raddoppio dei valori sierici dell'AFP in 5 pazienti e con la combinazione di questi due test in 5 pazienti. Questo studio ha concluso che i biomarcatori sono necessari per completare gli US nella diagnosi precoce di HCC, ma né DCP né AFP da soli sono ottimali [126]. Nello studio di Yamamoto K. e colleghi, gli obiettivi sono stati calcolare la sensibilità e la specificità di AFP e DCP per la diagnosi di HCC, misurare i tassi di risposta dei marcatori dopo resezione a scopo curativo, determinare le correlazioni tra i livelli di tali marcatori ed eventuali altre variabili prognostiche di natura clinico-patologica e determinare le correlazioni tra i livelli dei

biomarkers prima dell'epatectomia e alla diagnosi di recidiva. È stato effettuato uno studio retrospettivo di coorte di 714 pazienti consecutivi con HCC sottoposti ad epatectomia. Le aree sotto la curva (Figura 3) mostrano un valore pari a 0,79 contro 0,91 per AFP e DCP, rispettivamente ($P < 0.001$). La positività per AFP e DCP è scomparsa a 6 mesi post-intervento chirurgico in 184/229 (80.3%) e 245/246 (99.6%) pazienti, rispettivamente (cut-off di 20 ng / ml per AFP e 40 mAU / ml per DCP, $P < 0.0001$). Nessuna correlazione è stata trovata tra i livelli dei due markers ($r_s = 0.23$). Il livello di DCP, ma non quello di AFP, ha dimostrato una stretta correlazione con le dimensioni del tumore ($r_s = 0.51$ e 0.19 , rispettivamente).

I livelli di DCP sono stati associati con gli indici di invasività del tumore, senza associazioni specifiche. I livelli di AFP e DCP nei pazienti con diagnosi di recidiva a 6 mesi o meno dall'intervento correlavano con i livelli misurati prima del trattamento chirurgico ($r_s = 0.78$ e 0.49 , rispettivamente); questa correlazione non è stata trovata nei pazienti con diagnosi di recidiva dopo 2 anni ($r_s = 0.31$ e 0.30 , rispettivamente). Gli autori concludono che la DCP è un marcatore di HCC più accurato, anche se complementari, all'AFP [126]. Molteplici studi hanno dimostrato che la DCP può essere un utile indicatore di invasione vascolare nei pazienti con HCC [127,128,129]. Si ritiene che l'elevazione dei livelli sierici di DCP sia correlata con la presenza di invasione vascolare o metastasi intraepatiche [130-136]. Inoltre, la DCP è stata indicata come possibile fattore prognostico

indipendente per la recidiva e la sopravvivenza dopo resezione epatica [137-141], trapianto di fegato [134], e trattamento di ablazione [142-144] e chemioembolizzazione transarteriosa (TAE) [145]. Tuttavia, il tasso di livelli sierici rilevabili di DCP nei pazienti con piccoli HCC è basso [146-150]. Anche se le metodiche di dosaggio sono migliorate [151,152], la sensibilità è ancora circa del 50% per i più piccoli HCC [153-156]. Così, quasi tutte le relazioni sulla natura biologica della DCP e il suo valore come fattore prognostico si basano su analisi dei pazienti con tumori più grandi o con stadio di malattia tumorale più avanzato con vari gradi di riserva funzionale epatica.

I dati sulla rilevanza del livello sierico pre-operatorio della DCP, come marcatore prognostico nei pazienti con HCC di piccole dimensioni, sono ancora scarsi. Nello studio da Kenichi Hakamada e colleghi [157], l'obiettivo è stato quello di analizzare il valore predittivo dei livelli sierici pre-operatori di DCP sulla recidiva del tumore e la prognosi, in particolare nei pazienti con carcinoma epatocellulare che erano stati sottoposti a resezione epatica, e che presentavano i criteri di trattamento per piccoli HCC [158], cioè un singolo nodulo di dimensioni \leq ai 5 cm, o non più di tre noduli di dimensioni \leq ai 3 cm, per valutare il ruolo di un'elevazione sierica di DCP sulla invasività e la prognosi dei piccoli HCC. Nello studio, dei 142 pazienti consecutivi affetti da HCC sottoposti a epatectomia e con confermata presenza di DCP nel siero, 85 pazienti soddisfacevano i criteri per piccoli HCC. Il tasso di sopravvivenza complessivo dei 142 pazienti era del

92.1% ad 1 anno, del 69.6% a 3 anni e del 56.9% a 5 anni. L'analisi multivariata ha mostrato che l'invasione vascolare microscopica ($P = 0.03$) e un valore di DCP nel siero ≥ 400 mAU / mL ($P = 0.02$) erano fattori prognostici indipendenti. Inoltre, nel gruppo di pazienti che hanno soddisfatto i criteri di trattamento e follow-up per i piccoli HCC, valori di DCP ≥ 400 mAU / mL sono stati considerati un fattore prognostico indipendente di sopravvivenza libera da recidiva ($P = 0.02$) e sopravvivenza globale ($P = 0.0005$). Nei pazienti che non soddisfacevano tali criteri, la presenza di invasione vascolare era un fattore indipendente di sopravvivenza libera da recidiva ($P = 0.02$) e sopravvivenza globale ($P = 0.01$).

Nel 75% dei pazienti con HCC di piccole ed elevati livelli di DCP, recidiva di malattia tumorale si è verificata in sedi extraepatiche. In questi pazienti, un elevato livello pre-operatorio di DCP è stato l'unico indicatore prognostico di recidiva e prognosi sfavorevole. La presenza di microscopiche invasioni vascolari, però, era un predittore indipendente di prognosi sfavorevole, sia in termini di sopravvivenza libera da recidiva che di *overall survival* nei carcinomi epatici più avanzati. Così, sono stati ottenuti diversi risultati per i fattori prognostici a seconda della progressione della malattia. Ci sono dati che dimostrano che un elevato livello di DCP correla con le proprietà di invasività vascolare e metastatica del carcinoma epatocellulare [130-136]. In uno studio di 218 pazienti sottoposti a resezione epatica, Shirabe et al. [136] hanno riferito che livelli preoperatori di DCP,

diametro del tumore e differenziazione istologica correlano con la presenza o assenza di invasione vascolare microscopica. Sakon et al. [130], Grazi et al. [131], Suehiro et al. [132], Sugimoto et al. [133] e Nanashima et al. [141] hanno anche dimostrato che un elevato livello pre-operatorio di DCP correla con la presenza di invasione vascolare microscopica nei pazienti sottoposti a epatectomia. In uno studio su 40 pazienti che avevano subito un trapianto di fegato da donatore vivente, Shimada et al. [134] hanno mostrato la correlazione tra valori di DCP ≥ 300 mAU / mL e presenza di invasione vascolare microscopica, suggerendo pertanto che elevati valori sierici di DCP correlano con una prognosi infausta.

Diverse analisi univariate di 16 parametri clinici in tutti i pazienti con HCC indicano che il numero di lesioni tumorali, le dimensioni del tumore, il grado di differenziazione istologica, l'invasione vascolare, la stadiazione del tumore e i livelli sierici di AFP e DCP sono stati significativi fattori prognostici. Questi risultati concordano con i risultati di studi precedenti [131,136,138,140,142-146]. Tuttavia, limitando l'analisi ai piccoli HCC, la DCP da solo è un fattore prognostico indipendente sia per recidiva tumorale che per la sopravvivenza del paziente, mentre la presenza di invasione vascolare microscopica è un fattore prognostico nei pazienti al di fuori dei criteri validi per i piccoli HCC. Per quanto riguarda il meccanismo alla base di questi diversi risultati, crediamo che: in particolare, elevati livelli di DCP costituiscono un fattore di

rischio per invasione vascolare microscopica in piccoli HCC; DCP è positiva nel siero prima dello sviluppo di invasione vascolare microscopica e diventa un fattore prognostico indipendente. Quando il tumore diventa più grande, la probabilità di individuare segni di invasione vascolare microscopica aumenta, e DCP non è più un fattore di rischio indipendente, mentre l'invasione vascolare microscopica mostra una correlazione con la prognosi maggiore rispetto alla DCP. Nello studio di Kenichi Hakamada [157], un elevato livello di DCP è risultato essere un importante fattore prognostico di recidiva, anche nella condizione di un HCC di piccole dimensioni, che diventi evidente prima dell'invasione vascolare. Questo risultato corrisponde a quanto riportato da Koike et al. [159] e Hagiwara et al. [160], mostrando che nei pazienti con elevati livelli sierici di DCP ci si deve aspettare di in tempi relativamente brevi l'inizio dell'invasione vascolare. Inoltre, in molti di questi pazienti, si è osservata una rapida ripresa di malattia tumorale in sede extraepatica a poca distanza dalla resezione.

In conclusione, gli autori hanno dimostrato che per i piccoli HCC, un elevato livello pre-operatorio di DCP è predittivo di recidiva tumorale.

Il ruolo pre-trattamento della DCP.

Molti studi hanno chiarito il valore pretrattamento della DCP. Nello studio di Toyoda H. et al. [161], gli autori hanno valutato il valore prognostico della elevazione pretrattamento dei marcatori tumorali per il carcinoma epatocellulare nei pazienti sottoposti a trattamento curativo. Hanno studiato 801 pazienti cui era stato diagnosticato un HCC e trattati con epatectomia o ablazione termica locoregionale (LTA). AFP, AFP-L3 e DCP sono stati misurati al momento della diagnosi. Gli effetti degli elevati livelli di tali marcatori tumorali sulla sopravvivenza dei pazienti in questi 2 gruppi distinti e con diversi tipi di trattamento, cioè, epatectomia e LTA, sono stati analizzati. Secondo un'analisi multivariata di 345 pazienti sottoposti a epatectomia, nessun marcatore tumorale ha mostrato una correlazione significativa con una riduzione del tasso di sopravvivenza, mentre in 456 pazienti sottoposti a LTA, l'elevazione della AFP-L3 ($P = 0.0171$) e DCP ($P = 0.0004$) correlava significativamente con una riduzione del tasso di sopravvivenza. L'aumento sierico pretrattamento della DCP appare possedere dunque un maggiore impatto sulla sopravvivenza dei pazienti, mostrando un importante valore prognostico soprattutto nei pazienti trattati con LTA [161].

La DCP è dunque il miglior predittore prognostico nei pazienti con HCC dopo terapia con radiofrequenze. Anche Takahashi S. et al. [162] hanno valutato possibili predittori prognostici nei

pazienti con HCC dopo ablazione con radiofrequenza (RFA). Questo studio ha valutato retrospettivamente i risultati clinici in una coorte di 179 pazienti cirrotici, stadio Child-Pugh A, che hanno ricevuto RFA per HCC naive sulla base dei criteri di Milano [163]. Il follow-up medio è stato di 40,5 mesi. Il tasso cumulativo di sopravvivenza era significativamente più basso nei pazienti con DCP \geq 100 mAU / ml rispetto a valori di DCP $<$ 100 mAU / ml (58% vs 84% a 5 anni, $P < 0.001$). I tassi cumulativi di sopravvivenza libera da recidive erano significativamente più bassi nei pazienti con DCP \geq 100 mAU / ml rispetto a quelli con DCP $<$ 100 mAU / ml (12.1% vs 16.9% a 5 anni, $P < 0.032$). Il tasso cumulativo di sopravvivenza nel periodo di mantenimento in base ai criteri di Milano era significativamente più basso nei pazienti con DCP \geq 100 mAU / ml rispetto a quelli con DCP $<$ 100 mAU / ml (34.1% vs 55.6% a 5 anni, $P < 0.001$). Un'analisi di regressione di Cox ha mostrato che un basso livello di albumina sierica ($< 3,5$ g / dl, $P = 0.002$, RR 3.75, IC 1.64-8.56), un elevato livello di DCP (≥ 100 mAU / ml; $P = 0.04$, RR 3.15, CI 1.45-6.87) e la presenza noduli multipli ($P = 0.021$, RR 2.61, IC 1.15-5.91) erano fattori indipendenti di rischio di mortalità. In conclusione, nei pazienti con HCC in Child-Pugh A, il livello di DCP è il miglior predittore prognostico dopo *curative*-RFA [162].

Attualmente, la resezione chirurgica è considerata il trattamento di prima linea per l'HCC in fase precoce. La RFA è stata una scelta alternativa per gli HCC non resecabili. Tuttavia, la RFA

sembra avere una sovrapponibile efficacia terapeutica per l'HCC in fase iniziale, ma con un minor invasività. Kobayashi M. et al. hanno analizzato retrospettivamente 199 pazienti sottoposti a intervento chirurgico e 209 pazienti che hanno subito RFA per HCC avente un diametro massimo ≤ 3 cm e un numero ≤ 3 di lesioni tumorali. Tutti i pazienti erano cirrotici in Child-Pugh A.

I tassi di sopravvivenza a 3 e 5 anni della resezione (90.3%, 79.0%, rispettivamente) e dalla RFA erano simili (87.4%, 74.8%). Il tassi di sopravvivenza libera da recidiva del tumore a 1 e 3 anni nel gruppo di resezione (83.1%, 51.0%, rispettivamente) erano superiori a quelli del gruppo trattato con RFA (82.7%, 41.8%, $P = 0.011$). L'analisi multivariata ha identificato un tempo di protrombina $\geq 80\%$ (hazard ratio [HR], 2.72, 95% intervallo di confidenza [CI], 1.56-4.74, $P < 0.001$) come fattore prognostico indipendente per la sopravvivenza nel gruppo di resezione. DCP < 100 unità arbitrarie (UA) / L (HR, 5.49; CI 2.23-13.5; $P < 0.001$) e conta piastrinica $\geq 1.0 \times 10^5$ (HR, 2.70; CI 1.24-5.88, $P = 0.012$) sono stati marcatori significativi nel gruppo RFA. Tra i pazienti con DCP ≥ 100 AU / L, la procedura di trattamento (HR, 1.26; CI 1.04-1.53, $P = 0.020$) è stata un importante fattore prognostico per la sopravvivenza. Gli autori concludono che alti livelli di DCP riflettono l'aggressività biologica e la progressione dell'HCC, e nei casi di cui sopra, è consigliata la resezione chirurgica, piuttosto che la RFA [164].

Recentemente, c'è stato un crescente interesse sull'utilizzo della DCP per predire la recidiva di carcinoma epatico dopo trapianto da donatore vivente di fegato (LDLT). Poiché molti pazienti che non soddisfacevano i criteri di Milano [164,165] sono sopravvissuti a lungo dopo aver subito un trapianto di fegato da donatore vivente (LDLT), si è resa necessaria l'elaborazione di criteri "extended" per i pazienti con HCC destinati a LDLT. In un recente studio di Taketomi A. e colleghi [165] sono stati esaminati i dati di 90 pazienti adulti consecutivi destinati a LDLT con carcinoma epatocellulare tra il 1996 e il 2007. I tassi di sopravvivenza libera da recidive di tutti i 90 pazienti sono stati 86.0%, 81.3% e 81.3% a 1, 3 e 5 anni rispettivamente. Su 90 pazienti, 14 hanno sviluppato una recidiva del tumore dopo LDLT. Le riprese di malattia tumorale sono state diagnosticate entro 1 anno dal LDLT in 11 (78.6%) pazienti. In un'analisi multivariata, sia una dimensione del tumore inferiore a 5 cm ($P = 0.0202$) che un livello di DCP inferiore a 300 mAU / ml ($P = 0.0001$) sono risultati fattori indipendenti favorevoli per ricomparsa di HCC dopo LDLT. Quindi gli autori hanno ideato nuovi criteri di selezione per i pazienti con HCC (una dimensione di tumore <5 cm o una DCP di <300 mAU / mL). La percentuale di sopravvivenza globale a 1, 3 e 5 anni degli 85 pazienti che hanno soddisfatto i nuovi criteri sono stati 92.3%, 85.9% e 82.7% rispettivamente, e i tassi di sopravvivenza libera da recidive sono stati 90.5%, 87.0% e 87.0% rispettivamente, valori significativamente diversi da quelli dei restanti 5 pazienti, che

non rispondevano ai nuovi criteri ($P < 0.0001$). In conclusione, una combinazione di due fattori, vale a dire le dimensioni del tumore e il livello di DCP, è stata molto utile per ampliare le possibilità di selezione dei pazienti affetti da HCC, candidati a LDLT.

In un articolo pubblicato nell'ottobre del 2009 sull'*American Journal of Transplantation*, Fujiki M. et al. hanno studiato il significato della DCP nei criteri di selezione per LDLT in pazienti con carcinoma epatocellulare [166], mostrando che i livelli di DCP correlano con le caratteristiche istologiche del carcinoma epatico. Gli autori hanno esaminato il valore sierico di DCP come predittore di recidiva di HCC in 144 pazienti sottoposti a LDLT. L'analisi ROC ha mostrato la superiorità della DCP e dell'AFP rispetto alla dimensione preoperatoria del tumore o al numero di lesioni, in termini di predittività per ricomparsa di malattia. Un'analisi multivariata ha dimostrato che una dimensione del tumore > 5 cm, la presenza di 11 o più noduli e un valore di DCP > 400 mAU / mL sono significativi fattori di rischio indipendenti per *HCC recurrence*. L'incidenza di invasione microvascolare (62% vs 27%, $P = 0.0003$) di scarsa differenziazione (38% vs 16%, $P = 0.0087$) erano significativamente più alti nei pazienti con DCP > 400 mAU / mL rispetto ai pazienti con DCP ≤ 400 mAU / mL. Nell'analisi ROC dei pazienti con 10 o meno noduli, tutti di dimensioni ≤ 5 cm, per predire la *HCC recurrence*, l'area sotto la curva era più alta per la DCP che per l'AFP (0.84 vs

0.69). I criteri di Kyoto sono stati pertanto definiti come un numero ≤ 10 noduli, tutti di dimensioni ≤ 5 cm e una DCP ≤ 400 mAU / mL.

Il tasso di recidiva a 5 anni per 28 pazienti che rientravano nei criteri di Milano, ma nei criteri di Kyoto, si è visto essere simile a quello osservato per 78 pazienti che rientravano nei criteri di Milano (3% vs 7%). Il livello preoperatorio di DCP offre ulteriori informazioni riguardanti le caratteristiche istologiche e quindi può notevolmente migliorare i criteri di selezione dei pazienti [166].

Uno studio di Yamamoto K. et al. pubblicato nel 2009 su *Annals of Surgery Oncology* [125], ha calcolato la sensibilità e la specificità di AFP e DCP per la diagnosi di HCC, misurato i tassi di risposta dei due marcatori dopo resezione curativa, e determinato le correlazioni tra i livelli di AFP e DCP e altre variabili clinico-patologiche e prognostiche, confrontando i livelli di tali markers prima dell'epatectomia e alla diagnosi di recidiva. È stato trovato che i livelli di DCP sono stati associati con indici di invasività del tumore. I livelli di AFP e DCP in pazienti con recidiva comparsa a meno di 6 mesi dopo l'intervento è stata correlata con i livelli misurati prima della chirurgia ($r_s = 0.78$ e 0.49 , rispettivamente) ma non nei pazienti con diagnosi di recidiva due anni dopo l'intervento chirurgico ($r_s = 0.31$ e 0.30 , rispettivamente). Gli autori concludono che la DCP è un marcatore di HCC più accurato dell'AFP, anche se complementare [125].

Alcuni reports indicano che l'espressione tissutale di DCP sia più utile come fattore prognostico del livello sierico della stessa DCP. L'obiettivo di uno studio di Hairino Y. et al. [167] è stato quello di chiarire il ruolo clinico-patologico dell'espressione di DCP sul tessuto neoplastico dell'HCC, soprattutto quando vi è un basso livello sierico di DCP. Un totale di 51 pazienti con HCC sottoposti a epatectomia sono stati inclusi in questo studio. La colorazione immunoistochimica, effettuata utilizzando un anticorpo monoclonale anti-DCP, è stata classificata in 2 gruppi sulla base dell'intensità (forte e debole) da un patologo. L'espressione immunoistochimica di densità microvascolare tumorale (MVD) è stata valutata utilizzando l'anticorpo monoclonale CD34. Le variabili clinico-patologiche sono state confrontate tra i 2 gruppi. Intensa espressione di DCP è stata riscontrata in 31 pazienti. L'espressione di DCP è stata associata con le dimensioni del tumore ($P < 0.05$) e l'infiltrazione della vena porta ($P < 0.01$). Inoltre, i livelli sierici DCP tendevano ad essere maggiori nel gruppo che mostrava intensa colorazione. In 16 pazienti il cui livello sierico di DCP è stato < 200 mAU / ml, il tasso di sopravvivenza libera da recidive è stato significativamente più basso nel gruppo a forte colorazione. Nessuna correlazione è stata osservata tra espressione di DCP e MVD. In conclusione, gli autori hanno suggerito che l'espressione tissutale di DCP in HCC potrebbe essere utile per la previsione di recidiva precoce nei pazienti con bassi livelli sierici di DCP.

Rapporto tra la DCP e l'insorgenza del carcinoma epatocellulare nei pazienti con epatite cronica da HBV e HCV.

Recentemente ci sono stati studi sul ruolo dell'AFP e della DCP come marcatori prognostici nel trattamento dell'HCC associato ad epatite cronica da virus C [167-170]. Tuttavia, i valori prognostici di AFP e DCP sono stati più intensamente studiati nell'HCC associato all'epatite cronica da HBV. In un recente studio [170], Kim HS et al. hanno valutato il valore prognostico di AFP e DCP nell'HCC HBV-correlato. I pazienti (n = 126) sono stati divisi in 4 gruppi secondo il loro livello medio di AFP e DCP (L: basso / basso; A: alto / basso; P: basso / alto; H: alto / alto) al momento della diagnosi. Le caratteristiche cliniche e la sopravvivenza sono stati confrontati tra i gruppi, e un'analisi di regressione è stata effettuata per individuare i fattori indipendenti per la sopravvivenza. I fattori dell'ospite al basale e i fattori virologici non sono risultati significativamente differenti tra i 4 gruppi. I gruppi con aumento di DCP (P e H) mostravano caratteristiche tumorali di maggiore aggressività (dimensione del tumore più grande, più alto numero di tumori, più frequente trombosi della vena porta, $P < 0.05$) e tempi di sopravvivenza inferiori a quelli dei gruppi a bassa DCP (L e A) ($P < 0.05$). Nell'analisi multivariata, elevati livelli di DCP si sono rivelati un predittore indipendente di sopravvivenza (RR: 2.377, intervallo di confidenza 95%: 1.359-4.157, $P = 0.002$) in aggiunta al punteggio di Child-Pugh, alla stadiazione TNM e alla modalità di

trattamento. Anche dopo aver escluso 33 pazienti che avevano cirrosi avanzata (classe C di Child-Pugh score) e uno stadio più avanzato di malattia neoplastica (TNM in stadio III-IV) al momento della diagnosi, un alto livello di DCP era ancora un predittore indipendente di sopravvivenza (RR: 4.258, intervallo di confidenza 95%: 2.418-8.445, $P < 0.001$). Pertanto i livelli sierici di DCP e non di AFP, rappresentano un prezioso fattore prognostico indipendente nell'HCC HBV-correlato.

Il ruolo del DCP nell'angiogenesi.

Per quanto riguarda il significato prognostico della DCP, il ruolo che questa può avere come biomarker di angiogenesi è molto interessante. DCP aumenta l'espressione di fattori angiogenici in cellule di HCC, come dimostrato dalla ricerca di Gao FJ et al. [171]. Lo scopo dello studio era quello di valutare l'attività angiogenica di DCP in cellule di HCC. La DCP stimola la crescita delle cellule di HCC con un meccanismo dose- (5-80 ng / ml) e tempo- (24-96 h) dipendente. La crescita delle cellule di HCC è stata accompagnata da elevati livelli di fattori angiogenici. Le concentrazioni di fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), fattore di crescita trasformante-alfa (TGF-alfa) e del fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF) nel supernatante di cellule SMMC-7721 sono state aumentate da 47, 126 e 60 pg/10⁶ cellule/24 h fino a 400, 208 e 298 pg/10⁶ cellule/24 h, rispettivamente, dopo 72 ore di incubazione con 80

ng / ml di DCP. Anche i risultati delle analisi in Western blot ed immunohistochimica di campioni tissutali di HCC hanno mostrato un aumento significativo del VEGF, TGF-alfa e bFGF in cellule di carcinoma epatocellulare. Questi risultati suggeriscono che DCP è un probabile fattore di crescita, coinvolto nella progressione del carcinoma epatocellulare. Ricerche più recenti hanno dimostrato che la DCP stimola la crescita delle cellule endoteliali vascolari umane e la loro migrazione. Wang SB et al. hanno osservato [172] gli effetti della DCP sulla crescita e la migrazione delle cellule endoteliali vascolari umane. La DCP sembra stimolare notevolmente la proliferazione delle HUVEC (ECV304), con un meccanismo dose- e tempo-dipendente, come misurato con il test MTT. Una migrazione continua e rapida di cellule ECV304 è stata osservata in presenza di DCP, misurata con lo *scratch wound assay* (SWA). La stessa invasività è stata misurata con il *transwell chamber assay* (TCA), e ha dimostrato che un aumento della DCP induce migrazione delle cellule endoteliali attraverso la ricostituzione della matrice extracellulare (Matrigel). Inoltre, la formazione del tubo di cellule endoteliali vascolari su un Matrigel 3-D ha mostrato un aumento del numero di punti di ramificazione di cellule ECV304 indotta da DCP in modo dose-dipendente. Sono stati altresì esaminati i livelli dei fattori di crescita angiogenica delle cellule endoteliali e i livelli di metalloproteinasi della matrice. La DCP è in grado di stimolare i livelli di espressione dei recettori per il fattore di crescita epidermico (EGFR), per il fattore di crescita vascolare

endoteliale (VEGF) e per le metalloproteinasi della matrice (MMP)-2. Altri studi altrettanto recenti [173], dimostrano come la DCP possa indurre e promuovere angiogenesi attraverso un meccanismo di tipo paracrino sull'endotelio vascolare peritumorale, attraverso l'attivazione del sistema intracellulare fosfolipasi C-gamma / MAPK (proteina chinasi attivata da mitogeni), mentre, per via autocrina sulle stesse cellule di HCC, promuoverebbe la proliferazione del tumore, attraverso l'attivazione del noto sistema mitogenico JAK3-STAT. Insieme, questi dati suggeriscono che la DCP agisce da fattore di crescita vascolare endoteliale a potente attività mitogenica, inducente migrazione cellulare nella angiogenesi dell'HCC e proliferazione cellulare del clone neoplastico.

DCP in sistemi di stadiazione prognostica.

Tutti i dati sopra riportati dimostrano l'importanza della DCP nella formulazione di una prognosi nei pazienti con HCC. Pertanto, secondo recenti studi, riteniamo che, in combinazione con altri biomarcatori, la DCP possa migliorare lo sviluppo di più efficaci sistemi prognostici e di staging [174-178]. Il Japan Integrated Staging (JIS) Score è stato dimostrato avere un'elevata capacità di stratificazione dei pazienti con HCC [177]. Tuttavia, attraverso il JIS score non è possibile stimare il grado di malignità dell'HCC. Kitai S. et al. [174,175] hanno valutato le prestazioni di un nuovo sistema di stadiazione: il biomarker

combinato JIS (bm-JIS), che aggiunge tre marcatori tumorali AFP, AFP-L3 e DCP al JIS tradizionale. Un totale di 1.924 pazienti con carcinoma epatocellulare sono stati inclusi in questo studio. Gli autori hanno confrontato la sopravvivenza globale e la capacità di stratificazione e di rappresentazione di un possibile modello prognostico, sulla base del confronto del punteggio bm-JIS e del punteggio convenzionale JIS. Il punteggio bm-JIS si è dimostrato superiore in termini di capacità di stratificazione e di conseguenza è risultato essere un predittore di prognosi migliore rispetto al punteggio JIS convenzionale, specialmente per i pazienti con prognosi favorevole. Questi risultati sono stati confermati da studi successivi. E' stato recentemente proposto un nuovo sistema di stadiazione prognostica [178], chiamato SLiDe (S, stage; Li, liver damage; De, DCP). In seguito a resezione epatica, 207 pazienti con carcinoma epatocellulare sono stati studiati per determinare l'utilità di questo sistema di stadiazione. Il punteggio SLiDe, un sistema di stadiazione che unisce caratteristiche del tumore, un marker tumorale e quantificazione della funzionalità epatica, potrebbe essere un migliore indicatore di prognosi nei pazienti con HCC che sono stati sottoposti a resezione epatica.

Conclusioni

DCP è una protrombina anormale prodotta dagli epatociti

maligni ed è aumentata nel siero dei pazienti con HCC. E' possibile che, in cellule di HCC, alterazioni genetiche, alterazioni recettoriali di membrana, l'incapacità di assorbimento delle LDL, cambiamenti del citoscheletro durante la conversione *epithelial-to-fibroblastoid* ed alterazioni nei fenomeni di trasferimento intracitoplasmatico coinvolti nel trasporto e nella funzione della vitamina K possono svolgere tutti un ruolo importante nell'individuazione e nella determinazione dei livelli sierici di DCP. La DCP nel siero si è visto ha una sensibilità compresa fra 48% e 62%, una specificità compresa fra 81% e 98% , ed un'accuratezza diagnostica compresa fra 59% e 84% per la diagnosi di epatocarcinoma in diversi grandi studi caso-controllo. La DCP plasmatica non si correla con i livelli di AFP. Comunque, quando usati insieme, i dosaggi di DCP e di AFP aumentano la sensibilità per HCC in oltre l'85% dei pazienti. La specificità del test DCP sembra essere superiore a quella di AFP, poiché meno del 5% dei pazienti con patologie epatiche non maligne hanno livelli DCP superiore a 100 ng / ml. Nei pazienti con HCC di medie e grandi dimensioni, i livelli di DCP correlano con le dimensioni del tumore. Nei tumori inferiori a 3 cm, i livelli di DCP sono aumentati solo nel 20% dei pazienti. DCP è un marker utile per la rilevazione di HCC e può essere correlato con i più noti sistemi di staging; è un più accurato, anche se complementare, marcatore di HCC rispetto all'AFP. Molti studi hanno confrontato l'accuratezza dell'AFP e della DCP nella diagnosi precoce di HCC. Questi studi concludono

che i biomarcatori dovrebbero integrare l'ecografia nella diagnosi precoce di HCC, ma né DCP né AFP da soli sono ottimali.

Come diversi studi hanno proposto, l'uso combinato di AFP e DCP in fase di screening e di follow-up di HCC probabilmente migliora la sensibilità e la specificità e riduce l'area sotto la ROC. Il livello sierico di DCP correla con la presenza di invasione vascolare o metastasi intraepatica. Inoltre, la DCP è stata indicata come fattore prognostico indipendente per la recidiva e la sopravvivenza dopo resezione epatica, il trapianto di fegato, il trattamento di ablazione ed il trattamento TAE. Alti livelli di DCP sono un importante fattore prognostico per la *HCC-recurrence*, anche nella condizione di un piccolo HCC che diventa evidente prima dell'invasione vascolare. Alti livelli di DCP correlano anche con l'aggressività biologica e la progressione del carcinoma epatocellulare. Una combinazione di due fattori, vale a dire le dimensioni del tumore e il livello di DCP, è stato utile per ampliare la selezione dei candidati al LDLT per HCC.

Livelli sierici di DCP non, di AFP, sono inoltre un prezioso fattore prognostico indipendente nell'HCC HBV-correlato. Ricerche più recenti hanno dimostrato che la DCP stimola la crescita delle cellule endoteliali vascolari umane e la loro migrazione, stimolando i livelli di EGF, VEGF, MMP-2. Insieme, questi dati suggeriscono che il DCP possa essere un nuovo tipo di fattore di crescita vascolare endoteliale, capace di

potente attività mitogenica e inducente di migrazione cellulare nella angiogenesi di HCC.

Quindi, possiamo concludere che per quanto riguarda la potenza, il ruolo diagnostico della DCP ha una sensibilità inferiore ma una maggiore specificità rispetto all'AFP nella diagnosi di HCC. Per ottenere una migliore specificità diagnostica ed una maggiore sensibilità, due biomarcatori devono essere combinati e integrati con l'ecografia epatica. Il dosaggio preoperatorio della DCP potrebbe essere integrato nella formulazione di uno score prognostico, nello staging e nella formulazione dei criteri di inclusione per la scelta del trattamento (epatectomia, RFA e/ o trapianto di fegato) in pazienti con piccoli HCC. I migliori risultati si otterrebbero con l'inserimento del dosaggio della DCP nel sistema di stadiazione SLiDe, che potrebbe essere un migliore indicatore di prognosi nei pazienti con HCC che si sono sottoposti a resezione epatica. Nei soggetti DCP positivi, questo biomarcatore correla con l'aggressività, l'invasione vascolare e la presenza di metastasi intraepatica di HCC e ha un importante valore prognostico nei soggetti che hanno avuto resezione epatica, trapianto di fegato, TACE o trattamento di ablazione con radiofrequenza.

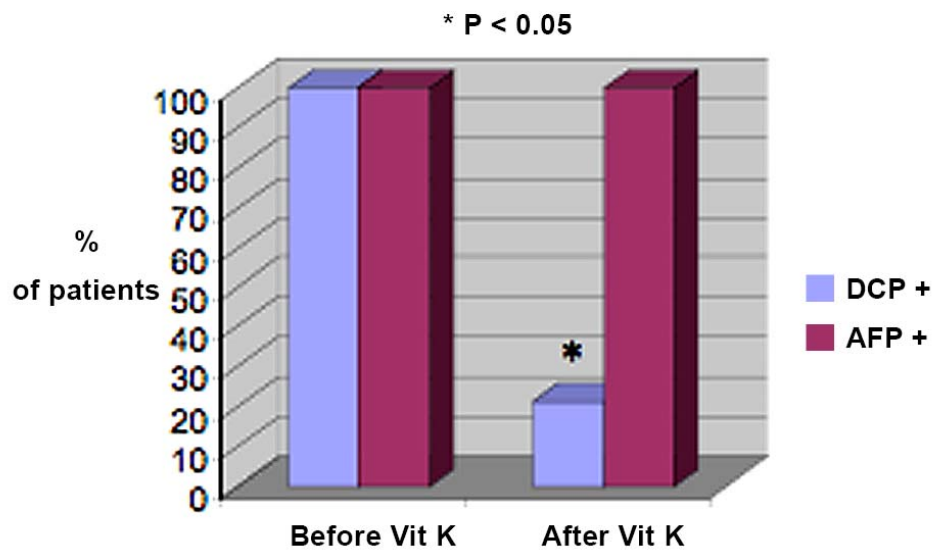


Figura 1. Percentuale dei pazienti DCP-positivi (n=47) e AFP-positivi (n=43) responders alla somministrazione di Vitamina K per 10 giorni. Cut off per DCP-positività = 40 mAU/mL; cut off per AFP-positività = 100 IU/mL (adattata da Bertino G. et al. Panminerva Med 2008;50:221-226).

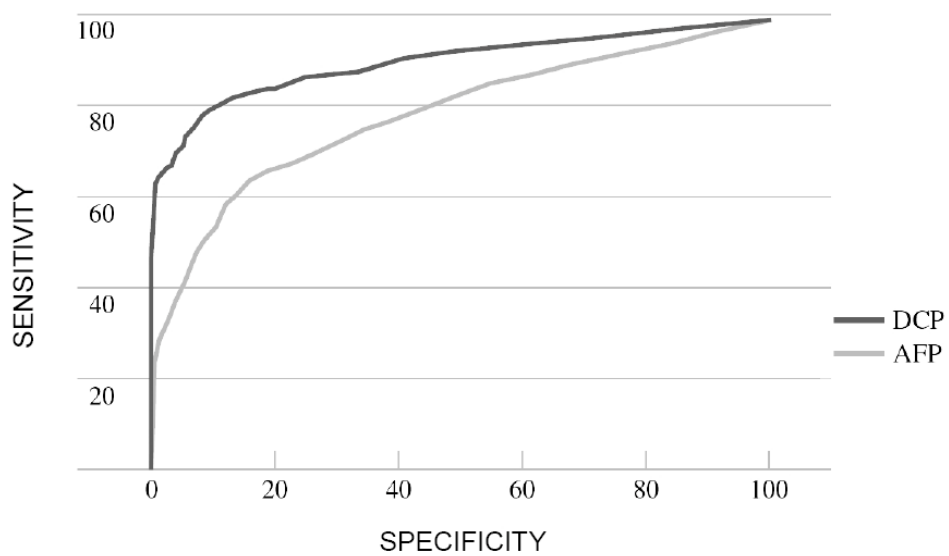


Figura 2. Curva ROC per AFP (linea grigia chiara) e DCP (linea grigia scura). I valori dell'area sotto la curva per AFP e DCP sono 0.79 (0.79 - 0.81) e 0.91 (0.89 - 0.92), rispettivamente, $P < 0.001$ (95% CI). Adattata da Yamamoto K et al. Ann Surg Oncol 2009, 16:2795-2804.

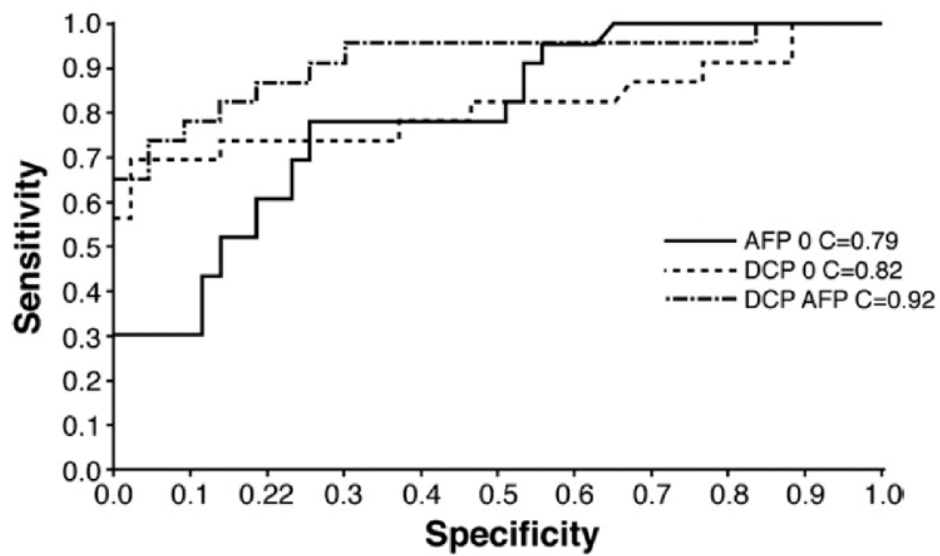


Figura 3. Valori di sensibilità e specificità (curva ROC) per AFP, DCP e AFP + DCP nell'HCC. (adattata da Lok AS et al. Gastroenterology 2010, 138:493-502).

Bibliografia

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000*. Int J Cancer 2001;94:153-156.
2. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. Version 1.0. Lyon, France: IARC Press; 2001.
3. World Health Organization. Mortality database. WHO Statistical Information System. Available at: <http://www.who.int/whosis>, 2001.
4. Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Clèries R. *Primary liver cancer: worldwide incidence and trends*. Gastroenterology 2004;127(suppl 1):S5-S16
5. McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, Devesa SS, Fraumeni JF Jr. *International trends and patterns of primary liver cancer*. Int J Cancer 2001;94:290-296
6. Taylor-Robinson SD, Foster GR, Arora S, Hargreaves S, Thomas HC. *Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-94*. Lancet 1997;350:1142-1143
7. Okuda K, Fujimoto I, Hanai A, Urano Y. *Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan*. Cancer Res 1987;47:4967-4972

8. El-Serag HB, Mason AC. *Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States*. N Engl J Med 1999;340:745-750
9. 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;139:817-823
10. Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Beck A, Elliott P, Thomas HC. *Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours*. J Hepatol 2002;37:806-813
11. Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, la Vecchia C. *Cancer Mortality in Europe, 1995-1999, and overview of trends since 1960*. Int J Cancer 2004;110:155-169
12. Hassan MM, Frome A, Patt YZ, El-Serag HB. *Rising prevalence of hepatitis C virus infection among patients recently diagnosed with hepatocellular carcinoma in the United States*. J Clin Gastroenterol 2002;35:266-269
13. McCredie M, Williams S, Coates M. *Cancer mortality in East and Southeast Asian migrants to New South Wales, Australia, 1975-1995*. Br J Cancer 1999;79:1277-1282
14. King H, Locke FB. *Cancer mortality among Chinese in the United States*. J Natl Cancer Inst 1980;65:1141-1148

15. Rosenblatt KA, Weiss NS, Schwartz SM. *Liver cancer in Asian migrants to the United States and their descendants*. *Cancer Causes Control* 1996;7:345-350
16. Naimark D, Naglie G, Detsky AS. *The meaning of life expectancy: what is a clinically significant gain?*. *J Gen Intern Med* 1994;9:702-707
17. Laupacis A, Feeny D, Detsky AS, Tugwell PX. *How attractive does a new technology have to be to warrant adoption and utilization? Tentative guidelines for using clinical and economic evaluations*. *CMAJ* 1992;146:473-481
18. Sarasin FP, Giostra E, Hadengue A. *Cost-effectiveness of screening for detection of small hepatocellular carcinoma in western patients with Child-Pugh class A cirrhosis*. *Am J Med* 1996;101:422-434
19. Arguedas MR, Chen VK, Eloubeidi MA, Fallon MB. *Screening for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C cirrhosis: a cost-utility analysis*. *Am J Gastroenterol* 2003;98:679-690
20. Beasley RP, Hwang LY. *Epidemiology of hepatocellular carcinoma in viral hepatitis and liver disease*. Vyas AN, Dienstag JL, Hoofuagle JH, eds. New York: Grune and Stratton; 1984;209-224
21. Beasley RP. *Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma*. *Hepatology* 1982;2(suppl):21-26s

22. Sakuma K, Saitoh N, Kasai M, et al. *Relative risks of death due to liver disease among Japanese male adults having various statuses for hepatitis B s and e antigen/antibody in serum: a prospective study.* Hepatology 1988;8:1642-1646
23. Yu MW, Chang HC, Liaw YF, et al. *Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives.* J Natl Cancer Inst 2000;92:1159-1164
24. Villeneuve JP, Desrochers M, Infante-Rivard C, et al. *A long-term follow-up study of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive carriers in Montreal.* Gastroenterology 1994;106:1000-1005
25. McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, et al. *Hepatitis B-related sequelae: a prospective study of 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers.* Arch Intern Med 1990;150:1051-1054
26. 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;22:432-438
27. Fattovich G, Brollo L, Giustina G, et al. *Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B.* Gut 1991;32:294-298
28. De Franchis R, Meucci G, Vecchi M, et al. *The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers.* Ann Intern Med 1993;118:191-194

29. Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, et al. *Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients*. *Gastroenterology* 2002;123:1848-1856
30. Kew MC, Marcus R, Geddes EW. *Some characteristics of Mozambican Shangaans with primary hepatocellular cancer*. *S Afr Med J* 1977;51:306-309
31. Kew MC, Macerollo P. *Effect of age on the etiologic role of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma in blacks*. *Gastroenterology* 1988;94:439-442
32. Fattovich G, Giustina G, Degos F, et al. *Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients*. *Gastroenterology* 1997;112:463-472
33. Bruix J, Barrera JM, Calvet X, et al. *Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis*. *Lancet* 1989;2:1004-1006
34. Niederau C, Lange S, Heintges T, et al. *Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study*. *Hepatology* 1998;28:1687-1695
35. Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, et al. *Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death*. *Gut* 2000;47:131-136

36. Sun CA, Wu DM, Lin CC, et al. *Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan*. Am J Epidemiol 2003;157:674-682
37. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al. *Clinical management of hepatocellular carcinoma: conclusions of the Barcelona-2000- EASL conference*. J Hepatol 2001;35:421-430
38. Ganne-Carrie N, Chastang C, Chapel F, et al. *Predictive score for the development of hepatocellular carcinoma and additional value of liver large cell dysplasia in Western patients with cirrhosis*. Hepatology 1996;23:1112-1118
39. Velazquez RF, Rodriguez M, Navascues CA, et al. *Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis*. Hepatology 2003;37:520-527
40. Moriyama M, Matsumura H, Aoki H, et al. *Long-term outcome, with monitoring of platelet counts, in patients with chronic hepatitis C and liver cirrhosis after interferon therapy*. Intervirology 2003;46:296-307
41. Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, et al. *Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus*. Hepatology 2002;36:1206-1213
42. Schoniger-Hekele M, Muller C, Kutilek M, et al. *Hepatocellular carcinoma in Austria: aetiological and clinical*

characteristics at presentation. Eur J Gastroenterol Hepatol 2000;12:941-948

43. El Serag HB, Mason AC. *Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States.* Arch Intern Med 2000;160:3227-3230

44. Adami HO, Chow WH, Nyren O, et al. *Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus.* J Natl Cancer Inst 1996;88:1472-1477

45. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al. *Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology 2002;123:134-140

46. ElMBERG M, Hultcrantz R, EkBom A, et al. *Cancer risk in patients with hereditary hemochromatosis and in their first-degree relatives.* Gastroenterology 2003;125:1733-1741

47. Hsing AW, McLaughlin JK, Olsen JH, Mellemkjar L, Wacholder S, Fraumeni JF Jr. *Cancer risk following primary hemochromatosis: a population-based cohort study in Denmark.* Int J Cancer 1995;60:160-162

48. Fracanzani AL, Conte D, Fraquelli M, et al. *Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease.* Hepatology 2001;33:647-651

49. Caballeria L, Pares A, Castells A, Gines A, Bru C, Rodes J. *Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: similar incidence to that in hepatitis C virus-related cirrhosis*. Am J Gastroenterol 2001;96:1160-1163
50. Elzouki AN, Eriksson S. *Risk of hepatobiliary disease in adults with severe alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZZ): is chronic viral hepatitis B or C an additional risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma?*. Eur J Gastroenterol Hepatol 1996;8:989-994
51. Eriksson S, Carlson J, Velez R. *Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency*. N Engl J Med 1986;314:736-739
52. Giordano TP, Kramer JR, Soucek J, Richardson P, El-Serag HB. *Cirrhosis and hepatocellular carcinoma in HIV-infected veterans with and without the hepatitis C virus: a cohort study, 1992-2001*. Arch Intern Med 2004;164:2349-2354
53. Rosenthal E, Poiree M, Pradier C, et al. *Mortality due to hepatitis C-related liver disease in HIV-infected patients in France (Mortavic 2001 study)*. AIDS 2003;17:1803-1809
54. Niederau C, Heintges T, Lange S, et al. *Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B*. N Engl J Med 1996;334:1422-1427

55. Fattovich G, Giustina G, Realdi G, Corrocher R, Schalm SW. *Long-term outcome of hepatitis B e antigen-positive patients with compensated cirrhosis treated with interferon alfa. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP)*. Hepatology 1997;26:1338-1342
56. Fattovich G, Giustina G, Sanchez-Tapias J, et al. *Delayed clearance of serum HBsAg in compensated cirrhosis B: relation to interferon alpha therapy and disease prognosis. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP)* Am J Gastroenterol 1998;93:896-900
57. Lin SM, Sheen IS, Chien RN, Chu CM, Liaw YF. *Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection*. Hepatology 1999;29:971-975
58. Yuen MF, Hui CK, Cheng CC, Wu CH, Lai YP, Lai CL. *Long-term follow-up of interferon alfa treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B infection: the effect on hepatitis B e antigen seroconversion and the development of cirrhosis-related complications*. Hepatology 2001;34:139-145
59. Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. *Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease*. N Engl J Med 2004;351:1521-1531
60. Nishiguchi S, Shiomi S, Nakatani S, et al. *Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis*. Lancet 2001;357:196-197

61. Valla DC, Chevallier M, Marcellin P, et al. *Treatment of hepatitis C virus-related cirrhosis: a randomized, controlled trial of interferon alfa-2b versus no treatment.* Hepatology 1999;29:1870-1875
62. Camma C, Giunta M, Andreone P, Craxi A. *Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach.* J Hepatol 2001;34:593-602
63. Hayashi K, Kumada T, Nakano S, et al. *Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C after interferon therapy.* Hepatogastroenterology 2002;49:508-512
64. Ikeda K, Saitoh S, Kobayashi M, et al. *Long-term interferon therapy for 1 year or longer reduces the hepatocellular carcinogenesis rate in patients with liver cirrhosis caused by hepatitis C virus: a pilot study.* J Gastroenterol Hepatol 2001;16:406-415
65. Tanaka H, Tsukuma H, Kasahara A, et al. *Effect of interferon therapy on the incidence of hepatocellular carcinoma and mortality of patients with chronic hepatitis C: a retrospective cohort study of 738 patients.* Int J Cancer 2000;87:741-749
66. Okanoue T, Itoh Y, Minami M, et al. *Interferon therapy lowers the rate of progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C but not significantly in an advanced stage: a retrospective study in 1148 patients.* Viral Hepatitis Therapy Study Group. J Hepatol 1999;30:653-659

67. Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, et al. *Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy.* Ann Intern Med 1999;131:174-181
68. Toyoda H, Kumada T, Nakano S, et al. *Effect of the dose and duration of interferon-alpha therapy on the incidence of hepatocellular carcinoma in noncirrhotic patients with a nonsustained response to interferon for chronic hepatitis C.* Oncology 2001;61:134-142
69. Valla DC, Degos F. *Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-related cirrhosis: first, eliminate the virus.* J Hepatol 2001;34:606-609
70. Oka H, Tamori A, Kuroki T, et al. *Prospective study of alpha-fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma.* Hepatology 1994;19:61-66
71. Zhang JY, Wang X, Han SG, Zhuang H. *A case-control study of risk factors for hepatocellular carcinoma in Henan, China.* Am J Trop Med Hyg 1998;59:947-951
72. Hytioglou P, Theise ND, Schwartz M, et al. *Macroregenerative nodules in a series of adult cirrhotic liver explants: issues of classification and nomenclature.* Hepatology 1995;21:703-708

73. Donato MF, Arosio E, Del Ninno E, et al. *High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity*. Hepatology 2001;34:523-528
74. El-Serag, H.B., Rudolph, K.L. *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis* Gastroenterology 2007, 132: 2557–76.
75. Parkin, D.M. *Global cancer statistics in the year 2000* Lancet Oncol 2001, 2: 533–43.
76. McGlynn, K.A., Tsao, L., Hsing A.W. et al. *International trends and patterns of primary liver cancer* Int J Cancer 2001, 94: 290–96.
77. Kirk, G.D., Lesi, O.A., Mendy, M. et al. *The Gambia Liver Cancer Study: infection with hepatitis B and C and the risk of hepatocellular carcinoma in West Africa* Hepatology 2004, 39: 211–19.
78. Umemura, T., Kiyosawa K. *Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan* Hepatol Res 2007, 37: Abst S95–100.
79. El Serag, H.B., Mason, A.C. *Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States* N Engl J Med 1999, 340: 745-750.
80. Okuda, K. *Hepatocellular carcinoma* J Hepatol 2000, 32: 225-237.

81. Bruix, J., Sherman, M., Llovet, J.M. 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: 421-430.
82. Befeler, A.S., Di Bisceglie, A.M. *Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment* Gastroenterology 2002, 122: 1609-1619.
83. Llovet, J.M., Burroughs, A., Bruix, J. *Hepatocellular carcinoma* Lancet 2003, 362: 1907-1917.
84. Llovet, J.M., Fuster, J., Bruix, J. *The Barcelona approach: diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma* Liver Transpl 2004, 10: S115-120.
85. Kiyosawa, K., Umemura, T., Ichijo, T. et al. *Hepatocellular carcinoma: recent trends in Japan* Gastroenterology 2004, 127: S17-26.
86. El-Serag, H.B. *Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States* Gastroenterology 2004, 127: S27-34.
87. Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I. et al. *Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors* Gastroenterology 2004, 127: S35-50.
88. Blum, H.E. *Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention* World J Gastroenterol 2005, 47: 7391-7400.

89. Di Bisceglie, A.M. *Screening for hepatocellular carcinoma: being old is not all bad* Am J Gastroenterol 2004, 99: 1477-1478.
90. Talwalkar, J.A., Gores, G.J. *Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma* Gastroenterology 2004, 127: S126-132.
91. Spangenberg, H.C., Thimme, R., Blum, H.E. *Serum markers of hepatocellular carcinoma* Semin Liver Dis 2006, 26(4): 385-90.
92. Volk, M.L., Hernandez, J.C., Su, G.L. et al. *Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: a comparison of AFP, DCP, and AFP-L3* Cancer Biomark 2007, 3(2): 79-87.
93. Pontisso, P., Quarta, S., Caberlotto, C. et al. *Progressive increase of SCCA-IgM immune complexes in cirrhotic patients is associated with development of hepatocellular carcinoma* Int J Cancer 2006, 119(4): 735-40.
94. Weitz, I.C., Liebman, H.A. *Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review* Hepatology 1993, 18(4): 990-7. Review.
95. Marrero, J.A., Su, G.L., Wei, W., et al. *Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients* Hepatology 2003, 37(5): 1114-21.

96. Marrero, J.A., Lok, A.S. *Newer markers for hepatocellular carcinoma* Gastroenterology 2004, 127(5 Suppl 1): S113-9. Review.
97. Grizzi, F., Franceschini, B., Hamrick, C. et al. *Usefulness of cancer-testis antigens as biomarkers for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma* J Transl Med 2007, 5: 3.
98. Ueda, N., Shiraha, H., Fujikawa, T. et al. *Exon 2 deletion splice variant of gamma-glutamyl carboxylase causes des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma cell lines* Mol Oncol 2008, 2(3): 241-9.
99. Wright, L.M., Kreikemeier, J.T., Fimmel, C.J. *A concise review of serum markers for hepatocellular cancer* Cancer Detect Prev 2007, 31: 35-44
100. Bertino, G., Ardiri, A.M., Boemi, P.M. et al. *A study about mechanisms of des-gamma-carboxy prothrombin's production in hepatocellular carcinoma* Panminerva Med 2008, 50(3): 221-6
101. Volk, M.L., Hernandez, J.C., Su, G.L., Lok AS, Marrero JA. *Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: a comparison of AFP, DCP, and AFP-L3* Cancer Biomark 2007, 3(2): 79-87.
102. Gotoh, M., Nakatani, T., Masuda, T. et al. *Prediction of invasive activities in hepatocellular carcinomas with special reference to alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxyprothrombin* Jpn J Clin Oncol 2003, 33(10): 522-6.

103. Kaibori, M., Matsui, Y., Yanagida, H. et al. *Positive status of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin: important prognostic factor for recurrent hepatocellular carcinoma* World J Surg 2004, 28(7): 02-7.
104. Saffroy, R., Pham, P., Reffas, M. et al. Takka M, Lemoine A, Debuire B. *New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma* Clin Chem Lab Med 2007, 45(9): 1169-79. Review.
105. Carr, B.I., Kanke, F., Wise, M. et al. *Clinical evaluation of lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular* Dig Dis Sci 2007, 52(3): 776-82.
106. Leerapun, A., Suravarapu, S.V., Bida, J.P. et al. *The utility of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population* Clin Gastroenterol Hepatol 2007, 5(3): 394-402.
107. Murata, K., Sakamoto, A. *Impairment of clathrin-mediated endocytosis via cytoskeletal change by epithelial to fibroblastoid conversion in HepG2 cells: a possible mechanism of des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma* Int J Oncol 2008, 33(6):1149-55.
108. Murata K, Suzuki H, Okano H, et al. *Cytoskeletal changes during epithelial-to-fibroblastoid conversion as a crucial mechanism*

of des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma Int J Oncol 2009, 35(5):1005-14.

109. Bruix J, Sherman M. *Management of hepatocellular carcinoma* Hepatology 2005, 42:1208–1236.

110. Trevisani, F., De, N.S., Rapaccini, G. 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, 97:734–744.

111. Zhang, B., Yang, B. *Combined alpha-fetoprotein testing and ultrasonography as a screening test for primary liver cancer* J Med Screen 1999, 6:108–110.

112. Bolondi, L., Sofia, S., Siringo, S., et al. *Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis* Gut 2001, 48:251–259.

113. Collier, J., Sherman, M. *Screening for hepatocellular carcinoma* Hepatology 1998, 27:273–278.

114. Trevisani, F., D’Intino, P.E., Morselli-Labate, A.M. et al. *Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status* J Hepatol 2001, 34:570–575.

115. Sherman, M., Peltekian, K.M., 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, 22:432–438.
116. Trevisani, F., D’Intino, P.E., Saraceni, P. et al. *Etiologic factors and clinical presentation of hepatocellular carcinoma. Differences between cirrhotic and noncirrhotic Italian patients* Cancer 1995, 75:2220–2232.
117. Bayati, N., Silverman, A.L., Gordon, S.C. *Serum alpha-fetoprotein levels and liver histology in patients with chronic hepatitis C* Am J Gastroenterol 1998, 93:2452–2456.
118. Franca, A.V., Elias, J.J., Lima, B.L. et al. *Diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma* Braz J Med Biol Res 2004, 37:1689–1705.
119. Yuen, M.F., Lai, C.L. *Serological markers of liver cancer* Best Pract Res Clin Gastroenterol 2005, 19: 91-99
120. Grizzi, F., Franceschini B., Hamrick et al. *Usefulness of cancer-testis antigens as biomarkers for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma* J Transl Med 2007, 5: 3.
121. Semela D, Dufour JF. *Angiogenesis and hepatocellular carcinoma* J Hepatol 2004, 41:864-880.

122. França, A.V., Elias Junior J., Lima, B.L. et al. *Diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma* Braz J Med Biol Res 2004, 37:1689-1705
123. Nakamura, S., Nouse, K., Sakaguchi, K. et al. *Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size* Am J Gastroenterol 2006, 101:2038-2043.
124. Baek, Y.H., Lee, J.H., Jang, J.S. et al. *Diagnostic role and correlation with staging systems of PIVKA-II compared with AFP* Hepatogastroenterol 2009, 56(91-92):763-7.
125. Yamamoto, K., Imamura, H., Matsuyama, Y. et al. *Significance of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy* Ann Surg Oncol 2009, 16(10):2795-804.
126. Lok, A.S., Sterling, R.K., Everhart J.E. et al. *Des-gamma-Carboxy Prothrombin and alpha-Fetoprotein as Biomarkers for the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma* Gastroenterology 2010, 138:493-502.
127. Miyaaki, H., Nakashima, O., Kurogi, M. et al. *Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence II are potential indicators of a poor prognosis: a histopathological study of surgically resected hepatocellular carcinoma* J Gastroenterol 2007, 42:962-968.

128. Hagiwara, S., Kudo, M., Kawasaki, T., et al. *Prognostic factors for portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma* J Gastroenterol 2006, 41:1214-1219.
129. Shirabe, K., Itoh, S., Yoshizumi, T. et al. *The predictors of microvascular invasion in candidates for liver transplantation with hepatocellular carcinoma-with special reference to the serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin* J Surg Oncol 2007, 95:235-240.
130. Sakon, M., Monden, M., Gotoh M. et al. *Relationship between pathologic prognostic factors and abnormal levels of des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma* Am J Surg 1992, 163:251-256.
131. Grazi, G.L., Mazziotti, A., Legnani, C. et al. *The role of tumor markers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma, with special reference to the des-gamma-carboxy prothrombin* Liver Transpl Surg 1995, 1:249-255.
132. Suehiro, T., Matsumata, T., Itasaka H. et al. *Des-gamma-carboxy prothrombin and proliferative activity of hepatocellular carcinoma* Surgery 1995, 117:682-691
133. Sugimoto, H., Takeda, S., Inoue, S., et al. *Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP) ratio, a novel parameter measured by monoclonal antibodies MU-3 and 19B7, as a new prognostic indicator for hepatocellular carcinoma* Liver Int 2003, 23:38-44.

134. Shimada, M., Yonemura, Y., Ijichi, H. et al. *Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a special reference to a preoperative des-gammacarboxy prothrombin value* Transplant Proc 2005, 37:1177-1179.
135. Carr, B.I., Kanke F., Wise M. et al. *Clinical evaluation of lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular carcinoma in the United States* Dig Dis Sci 2007, 52:776-782.
136. Shirabe, K., Itoh, S., Yoshizumi, T. et al. *The predictors of microvascular invasion in candidates for liver transplantation with hepatocellular carcinoma-with special reference to the serum levels of desgamma-carboxy prothrombin* J Surg Oncol 2007, 95:235-240.
137. Shimada, M., Takenaka, K., Fujiwara, Y. et al. *Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein positive status as a new prognostic indicator after hepatic resection for hepatocellular carcinoma* Cancer 1996, 78:2094-2100.
138. Imamura, H., Matsuyama, Y., Miyagawa, Y. et al. *Prognostic significance of anatomical resection and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma* Br J Surg 1999, 86:1032-1038.
139. Utsunomiya, T., Shimada, M., Shirabe, K. et al. *Clinicopathological characteristics of patients with extrahepatic recurrence following a hepatectomy for hepatocellular carcinoma.* Hepatogastroenterol 2001; 48: 1088-1093.

140. Kaibori, M., Matsui, Y., Yanagida, H. et al. *Positive status of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin: important prognostic factor for recurrent hepatocellular carcinoma* World J Surg 2004, 28:702-707.
141. Nanashima, A., Morino, S., Yamaguchi, H. et al. *Modified CLIP using PIVKA-II for evaluating prognosis after hepatectomy for hepatocellular carcinoma* European J Surg Oncol 2003, 29(9):735-742.
142. Kawakita, T., Shiraki, K., Yamanaka, Y. et al. *A new prognostic scoring system involving des-gamma-carboxy prothrombin as a useful marker for predicting prognosis in patients with hepatocellular carcinoma* Int J Oncol 2003, 23:1115-1120.
143. Omagari, K., Honda, S., Kadokawa Y. et al. *Preliminary analysis of a newly proposed prognostic scoring system (SLiDe score) for hepatocellular carcinoma* J Gastroenterol Hepatol 2004, 19:805-811.
144. Toyoda, H., Kumada, T., Osaki Y. et al. *Staging hepatocellular carcinoma by a novel scoring system (BALAD score) based on serum markers* Clin Gastroenterol Hepatol 2006, 4:1528-1536.
145. Maeda, S., Fujiyama, S., Tanaka, M. et al. *Survival and local recurrence rates of hepatocellular carcinoma patients treated by transarterial chemolipiodolization with and without embolization* Hepatol Res 2002, 23:202-210.

146. Nakamura, S., Nouse, K., Sakaguchi, K. et al. *Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size* Am J Gastroenterol 2006, 101:2038-2043.
147. Kasahara, A., Hayashi, N., Fusamoto, H. et al. *Clinical evaluation of plasma des-gamma-carboxy prothrombin as a marker protein of hepatocellular carcinoma in patients with tumors of various size* Dig Dis Sci 1993, 38:2170–2176.
148. Chan, C.Y., Lee, S.D., Wu J.C. et al. *The diagnostic value of the assay of des-gamma-carboxy prothrombin in the detection of small hepatocellular carcinoma* J Hepatol 1991, 13:21–24.
149. Nomura, F., Ishijima, M., Kuwa K. et al. *Serum des-gamma-carboxy prothrombin levels determined by a new generation of sensitive immunoassays in patients with small-sized hepatocellular carcinoma* Am J Gastroenterol 1999, 94:650–654.
150. Okuda, H., Nakanishi, T., Takatsu K. et al. *Serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin measured using the revised enzyme immunoassay kit with increased sensitivity in relation to clinicopathologic features of solitary hepatocellular carcinoma* Cancer 2000, 88:544–549.
151. Ikoma, J., Kaito, M., Ishihara, T. et al. *Early diagnosis of hepatocellular carcinoma using a sensitive assay for serum des-*

gamma-carboxy prothrombin: a prospective study
Hepatogastroenterol 2002, 49:235–238.

152. Ando, E., Tanaka, M., Yamashita, F. et al. *Diagnostic clues for recurrent hepatocellular carcinoma: comparison of tumour markers and imaging studies* Eur J Gastroenterol Hepatol 2003, 15:641–648.

153. Sassa, T., Kumada, T., Nakano, S. et al. *Clinical utility of simultaneous measurement of serum high-sensitivity des-gamma-carboxy prothrombin and Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in patients with small hepatocellular carcinoma* Eur J Gastroenterol Hepatol 1999, 11:1387–1392.

154. Shimauchi, Y., Tanaka, M., Kuromatsu, R. et al. *A simultaneous monitoring of Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin as an early diagnosis of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients* Oncol Rep 2000, 7:249–256.

155. Toyoda, H., Kumada, T., Kiriya, M. et al. *Prognostic significance of simultaneous measurement of three tumor markers in patients with hepatocellular carcinoma* Clin Gastroenterol Hepatol 2006, 4:111–117.

156. Mita, Y., Aoyagi, Y., Yanagi M. et al. *The usefulness of determining des-gamma-carboxy prothrombin by sensitive enzyme immunoassay in the early diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma* Cancer 1998, 82:1643–1648.

157. Kenichi Hakamada, Norihisa Kimura, Takuya Miura et al. *Des-gamma-carboxy prothrombin as an important prognostic indicator in patients with small hepatocellular carcinoma* World J Gastroenterol 2008, 14(9):1370–1377.
158. Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R. et al. *Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis* N Engl J Med 1996, 334:693–699.
159. Koike, Y., Shiratori, Y., Sato, S. 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, 91:561–569.
160. Hagiwara, S., Kudo, M., Kawasaki, T. et al. *Prognostic factors for portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma* J Gastroenterol 2006, 41:1214–1219.
161. Toyoda, H., Kumada, T., Kaneoka, Y. et al. *Prognostic value of pretreatment levels of tumor markers for hepatocellular carcinoma on survival after curative treatment of patients with HCC* J Hepatol 2008, 49(2):223-32.
162. Takahashi, S., Kudo M., Chung, H. et al. *PIVKA-II is the best prognostic predictor in patients with hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation therapy* Oncology 2008, 75(Suppl 1):91-8.
163. Kim, do Y., Choi, M.S., Lee, J.H. et al. *Milan criteria are useful predictors for favorable outcomes in hepatocellular carcinoma*

patients undergoing liver transplantation after transarterial chemoembolization World J Gastroenterol 2006, 12(43):6992-7.

164. Kobayashi, M., Ikeda, K., Kawamura, Y. et al. *High serum des-gamma-carboxy prothrombin level predicts poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma* Cancer 2009, 115(3):571-80.

165. Taketomi, A., Sanefuji, K., Soejima, Y. et al. *Impact of des-gamma carboxy prothrombin and tumor size on the recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation* Transplantation 2009, 87(4):531-7.

166. Fujiki, M., Takada, Y., Ogura, Y. et al. *Significance of des-gamma-carboxy prothrombin in selection criteria for living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma* Am J Transplant 2009, 9(10):2362-71.

167. Harino, Y., Fujii, M., Imura, S. et al. *The role of des-gamma-carboxyprothrombin expression in hepatocellular carcinoma* Hepatogastroenterol 2008, 55(85):1385-9.

168. Yuen, M.F., Lai, C.L. *Serological markers of liver cancer*. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2005, 19(1):91-9.

169. Yano, Y., Yamashita, F., Kuwaki, K. et al. *Clinical features of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma and their association with alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II* Liver Int 2006, 26(7):789-95.

170. Kim, H.S., Park, J.W., Jang, J.S. et al. *Prognostic values of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study* J Clin Gastroenterol 2009, 43(5):482-8.
171. Gao, F.J., Cui, S.X., Chen, M.H. et al. *Des-gamma-carboxy prothrombin increases the expression of angiogenic factors in human hepatocellular carcinoma cells* Life Sci 2008, 83(23-24):815-820.
172. Wang, S.B., Cheng, Y.N., Cui, S.X. et al. *Des-gamma-carboxy prothrombin stimulates human vascular endothelial cell growth and migration* Clin Exp Metastasis 2009, 26(5):469-477.
173. Fujikawa T, Shiraha H, Yamamoto K. *Significance of des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma*. Acta Med Okayama. 2009 Dec;63(6):299-304.
174. Kitai, S., Kudo, M., Minami, Y. et al. *A new prognostic staging system for hepatocellular carcinoma: value of the biomarker combined Japan integrated staging score* Intervirology 2008, 51(Suppl 1):86-94.
175. Kitai, S., Kudo, M., Minami, Y. et al. *Validation of a new prognostic staging system for hepatocellular carcinoma: a comparison of the biomarker-combined Japan Integrated Staging Score, the conventional Japan Integrated Staging Score and the BALAD Score* Oncology 2008, 75(Suppl 1):83-90.

176. Sterling, R.K., Jeffers, L., Gordon, F. et al. *Utility of Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin, alone or in combination, as biomarkers for hepatocellular carcinoma* Clin Gastroenterol Hepatol 2009, 7(1):104-113.
177. Seong, J., Shim, S.J., Lee, I.J. et al. *Evaluation of the prognostic value of Okuda, Cancer of the Liver Italian Program, and Japan Integrated Staging systems for hepatocellular carcinoma patients undergoing radiotherapy* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007, 67(4):1037-1042.
178. Nanashima, A., Omagari, K., Sumida, Y. et al. *Evaluation of new prognostic staging systems (SLiDe score) for hepatocellular carcinoma patients who underwent hepatectomy* Hepatogastroenterol 2009, 56(93):1137-1140.