

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA E PATOLOGIE SISTEMICHE**

Dottorato di Ricerca in: "Nuovi Sistemi di Valutazione e Studio delle Complicanze Emodinamiche e Metaboliche delle Epatopatie Croniche"
(XXIII CICLO)
Coordinatore: Chiar.mo Prof. Gaetano Bertino

Dottor GIUSEPPE ABATE

**CARATTERIZZAZIONE DELL'IMMUNOCOMPLESSO SCCA-IgM: UN
NUOVO BIOMARKER PER LA DIAGNOSI PRECOCE
DELL'EPATOCARCINOMA**

TESI DI DOTTORATO

Tutor: Prof. Rosario Scuderi

Relatore Chiar.mo Prof. Gaetano Bertino

Anno Accademico 2009/2010

INTRODUZIONE	
L'EPATOCARCINOMA	3
<i>EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO</i>	
<i>PATOGENESI E ASPETTI MOLECOLARI</i>	
<i>STORIA NATURALE</i>	
<i>PREVENZIONE</i>	
<i>DIAGNOSI</i>	
<i>TRATTAMENTO</i>	
MARCATORI TUMORALI DELL'HCC	21
L'IMMUNOCOMPLESSO SCCA-IGM	24
<i>CARATTERISTICHE STRUTTURALI ED ESPRESSIONE TISSUTALE</i>	
<i>RUOLO DELL'SCCA NELLA BIOLOGIA TUMORALE</i>	
<i>L'IMMUNOCOMPLESSO SCCA-IGM: UN NUOVO BIOMARCATORE PER L'HCC</i>	
I.C. IN CIRCOLO NELLE PATOLOGIE DEL FEGATO	31
PAZIENTI E METODI	32
RISULTATI	
<i>DISTRIBUZIONE DEI VALORI DI POSITIVITA' SCCA-IGM IN RAPPORTO ALLA</i>	
<i>PRESENZA IN CIRCOLO DI FATTORE REUMATOIDE</i>	
DISCUSSIONE	
CONCLUSIONI	
BIBLIOGRAFIA	38

Introduzione

L'epatocarcinoma

Il carcinoma epatocellulare (hepatocellular carcinoma, HCC) rappresenta circa l'85% dei tumori epatici maligni ed è per frequenza il quinto tumore nell'uomo ed il nono nella donna. Esistono aree ad elevata (Asia ed Africa), media (bacino del Mediterraneo) e bassa incidenza (Nord Europa e Nord America). Nell'ultimo decennio, studi epidemiologici hanno evidenziato un incremento di mortalità per HCC sia in Europa che negli Stati Uniti. A livello mondiale l'80-90% dei pazienti con HCC è affetto da cirrosi epatica che rappresenta il più importante fattore di rischio; la mortalità per cirrosi appare globalmente stazionaria o in decremento verosimilmente per la migliore gestione clinica delle complicanze con conseguente allungamento della sopravvivenza del paziente che diviene così a più elevato rischio di sviluppare HCC. Nel nostro paese, nell'88% dei casi, l'infezione virale rappresenta l'eziologia della cirrosi su cui si sviluppa il carcinoma epatocellulare: si tratta di infezione da HCV nel 71,1% dei casi, da HBV nell'11,5%, da entrambi i virus nel 5,3%. Seguono come incidenza l'abuso etilico e molto più raramente, l'emocromatosi ereditaria e la cirrosi biliare primitiva.

Epidemiologia e fattori di rischio

I tumori maligni del fegato comprendono l'epatocarcinoma, la neoplasia di gran

lunga più frequente, il colangiocarcinoma e l'angiosarcoma e rappresentano, a livello mondiale, una delle maggiori cause di morte per tumore. Più del 70% degli oltre 350.000 nuovi casi per anno nel mondo si verificano nei Paesi in via di sviluppo, nei Paesi del Sud-Est Asiatico, nelle regioni del Pacifico occidentale, del Sahara e dell'Africa meridionale, con proporzioni, basate su dati autoptici, che arrivano fino al 30% della globalità dei tumori nelle aree a più alta incidenza. A fronte dell'elevata diffusione in queste aree, i tumori maligni del fegato sono relativamente rari in Europa. L'Italia occupa una posizione intermedia per tassi di incidenza e mortalità e l'epatocarcinoma rappresenta la settima causa di morte per tumore, con circa 5.000 decessi, ossia circa il 3% delle morti per tumore. Negli ultimi anni, la mortalità per tumore del fegato è moderatamente diminuita nel nostro Paese, ma ha mostrato andamenti variabili nei diversi Paesi europei. L'incidenza è stata invece in aumento negli Stati Uniti. Ciò che rende particolarmente importante l'epidemiologia dell'epatocarcinoma primitivo non è soltanto la dimensione numerica del problema, quanto il fatto che esso è, dopo il tumore del polmone, notoriamente associato al tabacco, una delle neoplasie le cui cause sono meglio definite, perciò, almeno in linea teorica, più immediatamente prevenibili.

FATTORI DI RISCHIO

I VIRUS DELL'EPATITE

I virus dell'epatite B e C rappresentano la principale causa di epatocarcinoma.

Vi è ormai una chiara evidenza su tale associazione, accumulatasi da studi di

laboratorio su pazienti con patologia epatica cronica successivamente degenerata in senso neoplastico e da studi epidemiologici prospettici e retrospettivi condotti su diverse popolazioni al mondo. I risultati di una meta-analisi di 32 studi caso-controllo riportati in letteratura hanno mostrato un rischio relativo (RR) di 20 per i portatori dell'epatite B, di 24 per l'epatite C e di 135 per la co-presenza di entrambi i marcatori.

AFLATOSSINA E ALTRI CANCEROGENI NELLA DIETA

Nel mondo, il principale cancerogeno epatico contenuto nei cibi è l'aflatossina, un prodotto del metabolismo del fungo *Aspergillus flavus* che contamina i cibi (in genere le derrate di cereali immagazzinate in climi caldi ed umidi) in molti Paesi tropicali, in particolare nell'Africa Meridionale e nel Sud-Est Asiatico. Sperimentalmente, è tra i più potenti carcinogeni epatici conosciuti: questa micotossina sembra indurre una mutazione molto specifica nel codone 249 del gene oncosoppressivo p53. Nei Paesi sviluppati, l'epatocarcinoma primitivo è molto più raro e, peraltro, la quantità trascurabile di aflatossina nella dieta non è che una delle possibili cause dei relativamente pochi casi che si verificano. Uno studio caso-controllo condotto nel Nord Italia, e basato su un ristretto numero di alimenti indicatori, aveva messo in evidenza una dieta carente in diversi aspetti, in particolare frutta e verdura, nei casi di epatocarcinoma primitivo rispetto al gruppo di controllo. Analoghi risultati sono emersi da più recenti studi condotti in Grecia.

ALCOLE TABACCO

E' noto che un consumo di alcool sufficiente a causare cirrosi epatica, aumenta

anche l'incidenza del cancro del fegato. Stime del rischio relativo di epatocarcinoma in relazione al consumo di alcool sono ricavabili da uno studio condotto in California nel quale non si evidenziava alcun aumento di rischio nei moderati bevitori, ma il rischio relativo saliva a 4,2 nei bevitori di 80 o più grammi di alcool al giorno. Il tabacco è associato al rischio di epatocarcinoma primitivo, con RR attorno a 1,5-2 per i forti fumatori, ed è quindi un'importante causa di neoplasie epatiche primitive a livello mondiale.

Patogenesi e aspetti molecolari

Il processo di trasformazione neoplastica procede attraverso l'accumulo successivo di mutazioni a carico dei geni che governano la proliferazione e la morte cellulare programmata. Le alterazioni che portano alla trasformazione maligna possono essere ricapitolate in sei "caratteristiche" essenziali: la capacità di proliferare indipendentemente dalla presenza di fattori di crescita (attivazione di oncogeni); l'insensibilità ai segnali antiproliferativi (inattivazione di anti-oncogeni o " tumor suppressor genes"); la capacità di sfuggire ai segnali apoptotici; la capacità di divisioni cellulari illimitate; la neoangiogenesi e la potenzialità metastatica.

La maggior parte dei carcinomi epatocellulari insorge come complicanza tardiva di una cirrosi correlata alle infezioni croniche da virus epatitici. La cirrosi rappresenta di per sé un fattore di rischio indipendente per l'insorgenza dell'epatocarcinoma. L'ipotesi più accreditata (fig. 1) prevede un processo a più tappe, in cui epatociti maturi acquisiscono alterazioni genetiche successive in un microambiente epatico in cui il coesistere di necrosi, infiammazione e

rigenerazione porta alla selezione di popolazioni monoclonali ed alla formazione di noduli displastici. I noduli con displasia di grado elevato rappresentano vere e proprie lesioni pre-neoplastiche che evolvono in HCC con una frequenza del 30% in 1-5 anni. L'acquisizione di un fenotipo maligno si accompagna alla neovascolarizzazione del nodulo con vasi neoformati di derivazione dai rami dell'arteria epatica. A questo stadio, i noduli di HCC sono ben differenziati, presentano un alto indice di proliferazione e tendono a divenire meno differenziati e a presentare segni di invasione vascolare quando raggiungono le dimensioni di 1-1,5 cm.

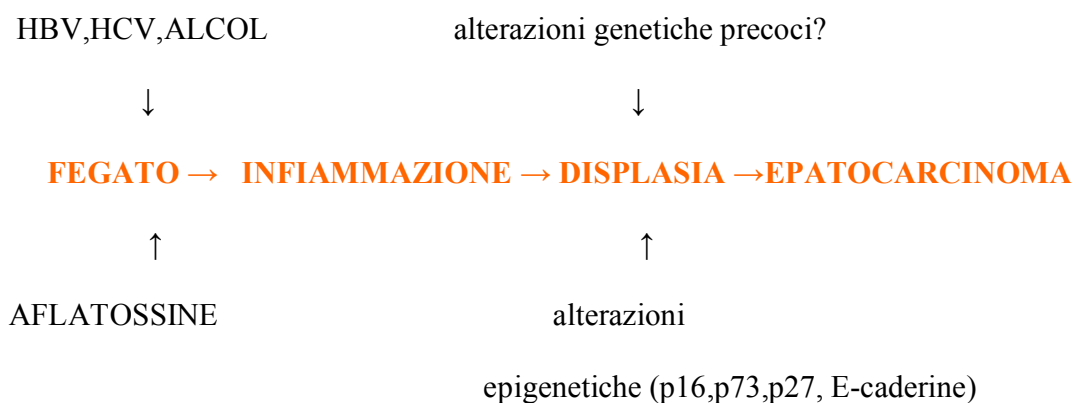


Fig.1 Patogenesi molecolare dell'HCC

Un aspetto fondamentale per la comprensione della patogenesi dell'HCC è quello di definire se e come, oltre che attraverso l'induzione del danno epatico cronico immunomediato che porta allo sviluppo della cirrosi, i virus epatitici contribuiscano direttamente alla trasformazione neoplastica dell'epatocita. È

noto, infatti, che le proteine HBx di HBV e core, NS3 ed NS5a di HCV sono in grado di influenzare profondamente la biologia della cellula infettata attraverso la modulazione di pathway intracellulari di trasduzione di segnali proliferativi, antiproliferativi e metabolici e la loro espressione nel fegato di topi transgenici si accompagna allo sviluppo di HCC. HBx è una proteina a localizzazione prevalentemente citoplasmatica necessaria per la replicazione e l'infettività del virus in vivo. HBx attiva l'espressione di proto-oncogeni, quali c-myc, c-fos e c-jun e recettori per fattori di crescita, come l'EGF-R, coinvolti nel controllo della proliferazione e nella trasformazione cellulare. La capacità di attivare la trascrizione di geni controllati da sequenze regolatrici molto diverse è dovuta alla proprietà di HBx di attivare più di un fattore trascrizionale ed in particolare CREB (cAMP Responsive Element Binding protein), SRF (Serum Response Factor), NFκB (Nuclear Factor κB), AP1 (Activating Protein 1) e NF-AT (Nuclear Factor of Activated T Cells). I meccanismi attraverso cui HBx attiva questi fattori trascrizionali sono molteplici. L'attivazione di CREB è mediata da un'interazione diretta a livello nucleare che porta ad una aumentata affinità per il DNA bersaglio, mentre per AP1 il meccanismo è indiretto e legato all'attivazione nel citoplasma delle chinasi JNK e fosforilazione di c-jun. Nel caso di NFκB coesistono meccanismi "citoplasmatici" (quale la degradazione citoplasmatica dell'inibitore IκBα sia attraverso la classica fosforilazione delle serine aminoterminali che attraverso la fosforilazione di residui tirosinici) e "nucleari" (HBx interagisce con l'IκBα neoformato impedendo la down-regolazione di NFκB dopo attivazione). Il risultato finale è una risposta NFκB prolungata nel tempo, con conseguente

prolungata attivazione di geni proliferativi e anti-apoptotici. NFκB è attivato anche dalle proteine core e NS5a di HCV, a sottolineare la sinergia tra i due virus nel potenziarsi in rapporto alla trasformazione neoplastica del fegato. HBx è anche in grado di legare ed inattivare p53, probabilmente bloccandone l'entrata nel nucleo. La proteina NS5A di HCV inibisce l'attività della PKR, una chinasi indotta dall'interferone, e rende le cellule resistenti all'apoptosi indotta da dsRNA esogeno. NS5a modula anche la trascrizione, la trasduzione di segnali mitogenici, il ciclo cellulare e l'apoptosi. La proteina core di HCV interferisce con il metabolismo lipidico e modula la trascrizione, la proliferazione cellulare e la morte cellulare programmata. Essa attiva NFκB e lega p53 di cui è in grado sia di inibire che attivare le funzioni. La proteina core attiva anche la via di segnalazione delle chinasi MAP (MAPKs o mitogen activated protein kinases) provocando un'attivazione prolungata nel tempo, dopo stimolazione con fattori di crescita, delle chinasi Erk1 ed Erk2, la cui funzione è soprattutto pro-proliferativa. Mentre nel caso dell'attivazione di NFκB il meccanismo di azione della proteina core non è chiaro, nel caso dell'attivazione delle MAPK è stato proposto che core agisca attraverso il legame con le proteine 14-3-3 e potenziando l'attività della chinasi Raf-1. Recentemente è stato dimostrato che l'espressione di HCV core si associa sia a stress ossidativo che a stress reticolo-endoplasmatico, con conseguente mobilitazione di calcio, modificazioni del potenziale mitocondriale, attivazione di NFκB ed induzione di apoptosi.

Storia naturale

Conoscere la storia naturale di un tumore è una premessa indispensabile per valutare nel modo più corretto la prognosi ed offrire al paziente la migliore gestione terapeutica. In passato molti studi riportavano sopravvivenze brevi, di pochi mesi dall'inizio dei sintomi, ma, troppo spesso, si trattava di diagnosi tardive e di pazienti con cirrosi scompensate in stadio avanzato. Inoltre, la modesta accuratezza diagnostica di allora comportava una sotto-stadiazione del quadro neoplastico alla diagnosi con ripresa di malattia in tempi brevi. In seguito, alcuni studi con valutazione retrospettiva hanno iniziato a porsi il problema della reale storia naturale del paziente con tumore non avanzato e pur riportando percentuali di sopravvivenza a 3 anni tra loro discordanti (rispettivamente del 64%, 30% e 13%) hanno dimostrato che i dati pubblicati in precedenza erano falsati da diagnosi troppo avanzate. Il passo successivo, comparare la sopravvivenza del paziente non trattato a quella del paziente sottoposto a resezione chirurgica, è stato affrontato in un interessante studio retrospettivo che in modo inatteso ha riportato nel primo gruppo una sopravvivenza a 2 anni del 50% rispetto al 39% dei pazienti resecati. Questa osservazione ha aperto la discussione sulla necessità di stabilire dei criteri precisi prima di esporre il paziente ad un intervento che poteva non solo non migliorare ma addirittura peggiorare la sopravvivenza e che, spesso, era gravato da elevata mortalità (grave insufficienza epatica post chirurgica). L'affinarsi delle tecniche chirurgiche, l'accurata selezione del paziente e soprattutto l'attenzione al buon compenso epatico, l'avvento di terapie alternative poco invasive ma efficaci come i trattamenti percutanei hanno, negli

anni successivi, interrotto, per motivi etici, studi di confronto tra pazienti trattati e non. Interessante è stato il risultato di due studi prospettici e randomizzati che hanno riportato la sopravvivenza di pazienti non trattati con presentazione non resecabile del tumore. Nel primo studio, che ha seguito un gruppo di pazienti come controllo verso un gruppo trattato con chemioembolizzazione transarteriosa (TACE), la sopravvivenza a 1, 3 e 5 anni è stata in modo inatteso lunga cioè rispettivamente dell'80, 50 e 16%. Nel secondo studio la sopravvivenza è stata sostanzialmente sovrapponibile cioè del 72, 38 e 20%. Una caratteristica che contraddistingue l'HCC e che ne condiziona obbligatoriamente la prognosi è l'origine multicentrica. Se si esclude il trapianto epatico, che rappresenta l'unico trattamento risolutivo, la prognosi dopo qualsiasi altro trattamento, resettivo o non, è sempre penalizzata dall'insorgenza di nuovi noduli con clonalità differente che compaiono in segmenti diversi dal quello del primo tumore. Già nel 50% dei casi resecati per tumore in stadio precoce, infatti, è osservabile una multicentricità microscopica misconosciuta ed entro 5 anni il 93% di questi pazienti presenterà una ripresa clinica di malattia. Un altro fattore determinante è la variabilità del tempo di raddoppiamento del tumore. E' stato osservato infatti che questo può presentare ampie fluttuazioni non solo tra pazienti differenti ma anche nello stesso tumore con una media che può variare da 27 a 605 giorni.

Nella gestione del paziente con HCC è necessario sempre tenere conto che la malattia neoplastica coesiste con una malattia epatica cronica che interagisce sulla prognosi come variabile indipendente. A seconda dello stadio una patologia prevarrà sull'altra. Se l'aspettativa di vita legata al grado di funzione

epatica viene giudicata inferiore a quella della storia naturale del tumore, il trattamento è da considerarsi inutile se non dannoso in quanto può comportare una anticipazione dell'insufficienza epatica.

Prevenzione

PREVENZIONE PRIMARIA

L'infezione cronica da virus epatitici maggiori (HBV, HCV e HDV) costituisce la maggiore causa di cirrosi e quindi indirettamente anche di HCC. La prevenzione primaria, fondata sulla trasmissione dell'epatite virale B e C, si realizza con lo screening dei donatori di sangue, l'uso di materiale pungente a gettare e sostanziali modifiche nello stile di vita sessuale. In numerose nazioni è, inoltre, attivo un programma di vaccinazione dei nuovi nati contro l'epatite HBV. Il trattamento con interferone-alfa dei malati con epatite cronica virale, nell'intento di ritardare o evitare l'evoluzione cirrotica, è in grado di spegnere la lesione necroinfiammatoria, ridurre la fibrosi epatica e prevenire lo sviluppo di cirrosi e di HCC. Nei malati con epatite cronica virale che hanno già sviluppato la cirrosi, invece, il trattamento con interferone-alfa può ridurre l'attività necroinfiammatoria e lo stimolo proliferativo, ma solo in casi rari può far recedere il sovvertimento strutturale del fegato conseguente alla cirrosi, non risultando pertanto efficace nel ridurre l'incidenza o comunque ritardare lo sviluppo di HCC.

PREVENZIONE SECONDARIA

Il trattamento dell'HCC mediante trapianto di fegato presenta una sostanziale

capacità curativa e ha un'elevata forza di raccomandazione con il minor rischio di recidiva oggi possibile. La resezione segmentaria del fegato attuata secondo i criteri di Milano è supportata da studi clinici prospettici con livelli di prova convincenti, ma il livello di raccomandazione rimane di un grado inferiore a quella del trapianto. L'ablazione di porzioni, anche rilevanti, di parenchima epatico non elimina infatti il substrato cancerogeno del fegato, che già ha generato il tumore ed anzi lo sottopone ad un nuovo potente stimolo rigenerativo a rischio di precipitare nuove lesioni nel parenchima epatico residuo. Le ablazioni del nodo neoplastico di tipo meno invasivo della resezione (termoablazione, alcolizzazione, etc.) riducono il rischio suddetto, ma hanno anche un livello più basso di potenzialità di ablazione radicale come dimostrano le verifiche anatomopatologiche di efficacia ablativa nei fegati espuntati a malati trattati in precedenza con queste procedure e successivamente sottoposti a trapianto di fegato. Per tale raccomandazione esiste una sostanziale incertezza che dipende soprattutto dalla competenza ed esperienza dell'operatore. Per quanto riguarda il trattamento chemioterapico adiuvante preventivo della recidiva di HCC, l'unica terapia che pare promettente è ancora la terapia con interferone-alfa, anche se esiste una consistente incertezza sulla raccomandazione. L'esecuzione di ogni altra terapia (chemioterapia di vario tipo) non è raccomandabile, in quanto mancano le prove ottenute da studi o basate sull'opinione di esperti. Inoltre, l'esecuzione di procedure o terapie potenzialmente tossiche per il parenchima epatico residuo è fortemente sconsigliata.

Diagnosi

MANIFESTAZIONI CLINICHE

I pazienti con epatocarcinoma presentano diversi sintomi e segni, tra i quali dolore all'ipocondrio destro, perdita di peso e/o incremento degli enzimi epatici in presenza di una cirrosi nota. Aspetti clinici di più raro riscontro sono l'addome acuto da rottura dell'HCC con emorragia addominale oppure manifestazioni extraepatiche come ipercalcemia, ipoglicemia e tireotossicosi. L'anemia è presente in oltre la metà dei casi, sebbene raramente sia possibile il riscontro di eritrocitosi dovuta alla produzione extrarenale di eritropoietina. Oltre ai segni della cirrosi (ittero, eritema palmare, ginecomastia) e di ipertensione portale (ascite, varici), un soffio arterioso epatico è presente nel 10-20 % dei casi di HCC. Con l'aumentata consapevolezza del rischio di sviluppare un HCC, sempre più pazienti asintomatici rispondono alle campagne di screening. Purtroppo, sono già spesso presenti segni e sintomi di scompenso epatico o di diffusione del tumore.

ESAMI DI LABORATORIO E STRUMENTALI

Gli esami usati per la diagnosi dell'epatocarcinoma includono la diagnostica per immagini, l'esame istologico e il dosaggio sierico dell'AFP. TC ed RM sono necessarie per valutare l'estensione della malattia. In un paziente con un'infezione cronica da virus B o una cirrosi di altra natura, il riscontro incidentale o durante una campagna di screening di un nodulo epatico è con molta probabilità un epatocarcinoma. La sequenza di test usati per la diagnosi

definitiva di HCC dipende dalle dimensioni della lesione.

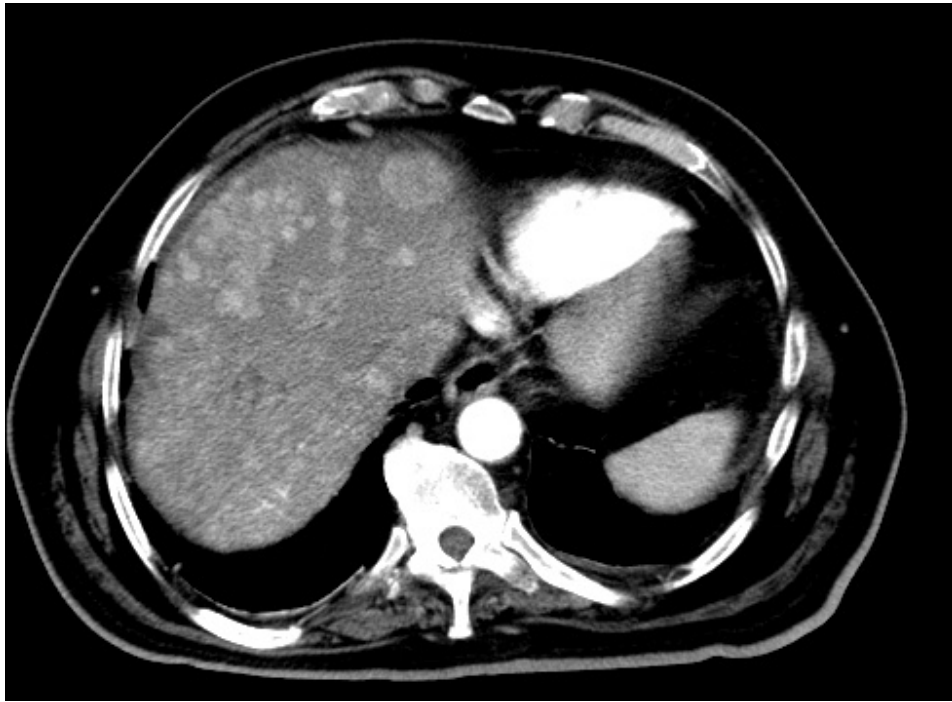


Figura 2 Immagini TC in fase arteriosa di un epatocarcinoma (multi focale)

Lesioni di diametro > 2 cm

Secondo le linee guida EASL, nei pazienti cirrotici con lesioni le cui dimensioni siano maggiori di 2 cm, con livelli sierici di AFP superiori ai 200 ng/mL e con immagini TC ed RM suggestive di epatocarcinoma (lesioni multifocali con ipervascolarizzazione), la probabilità che si tratti di un HCC è pari al 95% e non è necessario il ricorso all'esame biptico. Se, invece, le immagini radiologiche sono dubbie, allora l'esecuzione di una biopsia va

tenuta in considerazione.

Lesioni di diametro 1 - 2 cm

Le lesioni di diametro compreso fra uno e due centimetri di diametro vanno sottoposte a biopsia indipendentemente dal loro profilo vascolare, anche se per lesioni così piccole la biopsia potrebbe non essere affidabile. C'è disaccordo tra i patologi sulla linea di demarcazione tra una displasia e un HCC ben differenziato, specialmente quando le dimensioni del nodulo sono così piccole. Recentemente è stata proposta una distinzione tra “very early HCC” e “small HCC”. Il primo, definito da patologi giapponesi, è generalmente ipovascolarizzato ed ha margini ecografici poco definiti. Istologicamente, le cellule mostrano vari gradi di displasia, c'è un'invasione degli spazi portali da parte degli epatociti ma non c'è invasione vascolare dei tessuti. Comunque la presenza al loro interno di piccoli foci di HCC è stata dimostrata, suggerendo che queste lesioni sono precursori di tipiche lesioni HCC. Lo “small HCC”, invece, ha margini ecografici ben definiti e mostra i tipici caratteri dell'HCC sia alla TC che all'esame istologico, con il riscontro di invasione microvascolare nonostante le piccole dimensioni. Anche la caratterizzazione con tecniche di diagnostica per immagini è difficile per lesioni di diametro inferiore ai 2 cm. Alcuni noduli mostrano un enhancement arterioso senza washout venoso, e questo può generare confusione con noduli displastici. Il 25% di tali lesioni, infatti, rimangono stabili o regrediscono e non sono pertanto degli HCC. La biopsia è dunque importante nei pazienti che non mostrano

caratteristiche radiologiche tipiche. I pazienti con lesioni tra uno e due centimetri con pattern radiologico atipico e con biopsia negativa andrebbero seguiti periodicamente con altre biopsie o ulteriori indagini di imaging per valutarne la crescita.

Lesioni di diametro < 1 cm

Le lesioni più piccole di un centimetro, specialmente se in un fegato cirrotico, difficilmente sono degli HCC. Il carattere maligno della lesione è ancor meno probabile se essa non mostra captazione del contrasto radiografico. Tuttavia rimane alta la possibilità che piccoli noduli riscontrati all'ecografia possano col tempo divenire maligni. Perciò questi noduli vanno monitorati nel tempo per scoprire eventuali modificazioni nelle dimensioni, suggestive di malignità. Se la lesione non mostra segni di accrescimento nell'arco di un paio d'anni, è probabile che non si tratti di un HCC.

Il trattamento dell'epatocarcinoma

Il trattamento dell'HCC coinvolge diverse discipline, dall'epatologia alla chirurgia, dalla radiologia interventistica all'oncologia. Le scelte saranno determinate da vari fattori, come la severità della malattia epatica, la stadiazione tumorale e l'associazione di comorbidità, ma anche fattori pratici legati all'esperienza dei medici nell'esecuzione di resezioni epatiche, trapianti e terapie ablative.

STADIAZIONE

Per la stadiazione dell'HCC esistono diversi sistemi a punteggio, tra i quali il più utilizzato è il Barcelona-Clinic Liver Cancer (BCLC) che prende in considerazione parametri anatomopatologici e clinico-funzionali, (Fig. 3).

Il sistema di stadiazione del tumore secondo BCLC

Stadio	Caratteristiche del tumore	Parametri epatici
Stadio A (EC iniziale)		
A1 PST 0	Nodulo unico	Assenza di ipertensione portale, livelli ematici di bilirubina nella norma
A2 PST 0	Nodulo unico	Ipertensione portale, livelli ematici di bilirubina nella norma
A3 PST 0	Nodulo unico	Ipertensione portale, livelli ematici di bilirubina alterati
A4 PST 0	3 noduli, minori di 3 cm	Child-Pugh A-B
B (EC intermedio) PST 0	Multinodulare (estesi)	Child-Pugh A-B
C (EC avanzato) PST 1-2	Invasione vascolare ed estensione extraepatica	Child-Pugh A-B
D (EC terminale) PST 3-4	Altro	Child-Pugh C

Figura 3 stadiazione BCLC

POSSIBILITA' TERAPEUTICHE

Resezione chirurgica

La resezione epatica è il trattamento di scelta dell'epatocarcinoma nel fegato non cirrotico in cui la riserva epatica è ben preservata. Ciò accade, tuttavia, solo nel 5 % dei casi nel mondo occidentale e nel 40 % dei casi nei Paesi dell'Est dove è endemica l'infezione cronica da HBV. I soggetti in cui si è

svilupata cirrosi epatica, invece, non sono generalmente eleggibili per resezione dell'HCC per l'inadeguata riserva funzionale epatica dopo l'intervento. Il rischio di recidiva del tumore dopo resezione dipende da vari fattori, quali le dimensioni del tumore (43% a 5 anni se >5cm vs 32% se <5cm), il numero di noduli (sopravvivenza a 5 anni del 57% per tumore singolo, 26% per tumori multipli), l'invasione vascolare e l'ampiezza dei margini di resezione.

Trapianto di fegato

Il trapianto di fegato rappresenta in teoria la migliore scelta terapeutica perché elimina il tumore e al tempo stesso la condizione che ne favorirebbe la recidiva, ovvero la cirrosi. I criteri della United Network for Organ Sharing (UNOS), largamente condivisi dalla comunità internazionale, prevedono la possibilità del trapianto per singoli tumori di dimensioni inferiori a 5 cm o per un numero massimo di 3 noduli di dimensioni inferiori ai 3 cm ciascuno. I tassi di sopravvivenza a 5 anni si sono rivelati promettenti, superando soglie del 70 %, mentre i tassi di recidiva sono risultati inferiori al 15%.

Ablazione percutanea

Per i pazienti con HCC in stadio precoce, non eleggibili per resezione o per trapianto, l'ablazione percutanea mininvasiva rappresenta la migliore soluzione

terapeutica. Le due tecniche più utilizzate per indurre la necrosi del tumore sono l'iniezione percutanea di etanolo (PEI) e l'ablazione con radiofrequenza (RFA). La PEI consiste nell'iniezione di etanolo direttamente dentro il nodulo neoplastico. La tecnica permette di raggiungere fino al 70-80% dei casi la necrosi completa di tumori singoli inferiori ai tre centimetri di diametro e fino al 100% dei casi se il tumore è di dimensioni inferiori ai due centimetri. La tecnica ha bassi costi ed è ben tollerata, mostrando pochi effetti collaterali. La RFA, che ha ampiamente sostituito la PEI, fornisce un'ablazione più completa con un minor numero di sedute rispetto alla PEI. La sua efficacia è simile alla PEI per tumori <2cm, mentre è risultata più elevata per tumori di dimensioni maggiori.

Chemioembolizzazione transarteriosa (TACE)

Questa tecnica offre benefici "palliativi" per pazienti con tumore di stadio intermedio, con sopravvivenze a 5 anni che superano il 50%. La sua efficacia e sicurezza sono tuttavia limitate alle situazioni in cui è ancora preservata la funzionalità del fegato, esclusa la diffusione del tumore o la sua l'invasione vascolare e sono ancora assenti i sintomi di malattia. Ciò rende particolarmente selettiva la tecnica, che trova soddisfatti i criteri di eleggibilità solo nel 12% circa dei casi. Il razionale della TACE risiede nell'induzione della necrosi tumorale mediante l'occlusione dell'arteria che lo irroro e nella contemporanea somministrazione selettiva di un chemioterapico. In tal modo si determina un'estesa necrosi tumorale nel 30-50% dei casi, con una risposta completa nel

2% circa dei casi.

Terapie molecolari

Sempre più studi clinici negli ultimi anni si occupano di valutare l'efficacia di nuove terapie molecolari per la cura dell'HCC, da soli o in combinazione coi vecchi chemioterapici. Tra le nuove molecole in uso ricordiamo gli inibitori del VEGF, gli inibitori delle telomerasi e, in fase avanzata di sperimentazione, un inibitore delle multikinasi chiamato sorafenib. Per pazienti con HCC in stadio avanzato, il sorafenib ha dimostrato efficacia nel ritardare, rispetto ai controlli trattati con placebo, l'insorgenza dei sintomi.

Marcatori tumorali dell'HCC

Un marcatore tumorale, inteso come una sostanza prodotta abnormemente dal tessuto neoplastico, dovrebbe essere utile al clinico in diverse fasi della malattia oncologica, dalla diagnosi precoce, alla valutazione della risposta al trattamento, al follow-up. I marcatori tumorali sono attualmente oggetto di una grande attenzione da parte della comunità scientifica internazionale. Essi presentano talvolta percentuali di falsi positivi e falsi negativi inaccettabili perché possano essere proposti come indagini di screening di massa ma, per alcuni di essi, è dimostrata la buona efficacia nella diagnosi precoce di certe forme tumorali (come avviene con il PSA per il cancro della prostata). Possono

essere molto utili anche come complemento diagnostico nell'approccio clinico-laboratoristico a tumori come il carcinoma midollare della tiroide (calcitonina), il carcinoma ovario e testicolare (CA125, HCG e β -HCG), il microcitoma polmonare ed il neuroblastoma (NSE) e tanti ancora. Nel caso dell'epatocarcinoma, fino a non molti anni fa l'unico marcatore affidabile che si conosceva per la diagnosi precoce e il follow-up del tumore era l'alfa-fetoproteina (AFP). Ancora oggi, il gold standard dello screening per HCC nei pazienti a rischio, ovvero nella popolazione dei cirrotici e dei pazienti con infezione virale cronica pur senza cirrosi, è rappresentato dal dosaggio dell'AFP, associato al controllo ecografico del fegato ogni sei mesi. Tuttavia, la sensibilità e la specificità dell'AFP sono basse (60 e 90% rispettivamente) e l'ecografia è molto dipendente dall'esperienza dell'operatore, pertanto la comunità scientifica è alla ricerca di nuovi marcatori per l'HCC e diversi sono stati proposti negli ultimi anni. Tra i nuovi marcatori che possono entrare nell'uso comune come test complementari per la diagnosi precoce dell'epatocarcinoma ve ne sono alcuni che sono strettamente connessi all'AFP, ovvero l'AFP-RNA e le glicoforme di AFP: l'AFP-L3, capace di legare l'agglutinina *Lens culinaris*, e l'AFP monosialilata. Utile, inoltre, il dosaggio dell'immunocomplesso AFP-IgM oltre all'AFP libero per migliorare l'accuratezza diagnostica di quest'ultimo. Come l'AFP-L3, anche la PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II) aumenta la specificità dell'AFP per la diagnosi di epatocarcinoma se misurati in combinazione. Essa è il risultato di un difetto acquisito nella carbosilazione post-traslazionale del precursore della protrombina nelle cellule tumorali, perciò è anche nota come

des-gamma-carbossi protrombina (DCP), per la mancata gamma-carbossilazione dei residui di glutammina. Un altro marcatore proposto per l'HCC è il glicoproteo 3 (GPC3), un proteoglicano eparan-solfato posto sulla superficie della cellula, capace di legare vari fattori di crescita e stimolare così l'attività rigenerativa della cellula. La sua misurazione combinata a quella dell'AFP ne aumenterebbe la sensibilità mentre non interferirebbe in alcun modo sulla sua specificità. Altre molecole proposte come possibili marcatori di epatocarcinoma sono la GGT e il relativo RNA, l'alfa-L-fucosidasi (AFU), il VEGF, l'IL-8, il TGF-beta1 e il relativo RNA, il TSGF (tumor-specific growth factor) e, recentemente, l'SCCA (Squamous cell carcinoma antigen), una serpina (inibitore delle serin-proteasi) che ha mostrato una sensibilità dell'84% e una specificità del 46% e che, misurata in combinazione con il suo immunocomplesso SCCA-IC, con l'AFP e con l'AFP-IC, ha dimostrato un'accuratezza diagnostica maggiore del solo dosaggio di AFP sierico. SCCA viene iperespresso non solo nelle cellule tumorali di epatocarcinoma ma anche nel tessuto cirrotico immediatamente adiacente, a dimostrazione che la sua espressione è un evento precoce nella carcinogenesi epatica. A conferma di questa ipotesi, recenti studi hanno evidenziato un progressivo aumento di SCCA-IgM sia quando l'epatite cronica evolve in cirrosi, sia quando nel contesto della cirrosi epatica si assiste allo sviluppo di un epatocarcinoma.

L'immunocomplesso SCCA-IgM

Nell'ottobre 1973, presso i laboratori del Dipartimento di Ostetricia e

Ginecologia del prof. Hiroshi Kato, tre conigli vennero immunizzati con un estratto di carcinoma della cervice uterina umana. L'antigene verso cui si svilupparono anticorpi circolanti in questi tre conigli, chiamato inizialmente TA-4, venne battezzato definitivamente Squamous Cell Carcinoma Antigen solo nel 1985 quando Dainabot sviluppò un kit commerciale per il suo dosaggio radioimmunologico. Dal 1985 ad oggi numerosissimi studi su SCCAntigen (SCCA) hanno chiarito come la sua utilità come *marcatore* oncologico possa essere estesa oltre il cancro dell'ovaio. Le pietre miliari nella storia della ricerca su SCCA sono molteplici. Il primo fu la scoperta dell'eterogenicità della molecola di SCCA, un altro fu la determinazione della sua completa sequenza genica da parte di Yoshinori Suminami e non meno importante l'individuazione del secondo gene SCCA localizzato in prossimità di importanti geni regolatori del ciclo cellulare quali BCL2 e PAI2. I risultati più recenti ne stanno precisando funzioni e ruolo nella biologia cellulare.

Squamous cell carcinoma antigen: caratteristiche strutturali ed espressione tissutale

SCCA è una proteina avente un peso molecolare di circa 45kDa che appartiene alla superfamiglia delle serpine (inibitori delle proteasi seriniche). Il clonaggio del cDNA di SCCA da parte di Suminami nel 1990 ha permesso di evidenziare che la sequenza amminoacidica di SCCA è omologa a quella di altre serpine e in particolar modo a quelle appartenenti alla sottofamiglia delle *ov-serpine*, così chiamate per la loro omologia di struttura con l'ovoalbumina.



Fig. 5 Struttura secondaria delle serpine

L'antigene SCC (SCCA), inizialmente isolato nel carcinoma della cervice uterina, consiste in più di 10 frazioni proteiche diversamente distribuite nei vari tessuti, in particolare quella acida è presente nel tessuto peritumorale e viene rilasciata in circolo dalle cellule squamose maligne, mentre quella neutra si trova sia nelle cellule squamose maligne sia negli epiteli normali. I due geni codificanti le due isoforme di SCCA sono localizzati sul cromosoma 18, nella regione q21.3 di 600 kb assieme ad almeno altri quattro geni codificanti varianti serpiniche. Questi due geni, quasi identici, sono distribuiti in tandem sul cromosoma: il gene più vicino al centromero codifica l'antigene SCC di tipo 1 (SCCA-1), quello più vicino alla regione telomerica codifica l'SCCA di tipo 2 (SCCA-2). Probabilmente essi derivano da eventi di duplicazione di un gene ancestrale comune. L'analisi della sequenza aminoacidica presumibile dalla sequenza nucleotidica dei due geni e l'analisi dei punti isoelettrici delle due isoforme ha permesso di concludere che il gene SCCA1 codifica l'SCCA neutro, mentre il gene SCCA2 codifica la frazione acida dell'antigene SCC. L'elevata omologia nella sequenza nucleotidica dei due geni (98%) si traduce

in un'altrettanto elevata omologia di sequenza aminoacidica delle due proteine stimata intorno al 92%. Come le altre serpine, SCCA1 ed SCCA2 presentano una struttura secondaria che alterna foglietti β ed α eliche. Il centro di reazione (RSL) è caratterizzato da una sequenza aminoacidica conservata, che però è diversa nelle due proteine e corrisponde a residui serina-serina per SCCA1 e a residui serina-leucina per SCCA2. Questa sostituzione rende conto della diversa specificità d'azione delle due proteine, che agiscono su *target* molecolari diversi. L'SCCA1 infatti è un potente inibitore sia di serin proteasi, come la chimotripsina, sia di cistein proteasi papaina-like, come le catepsine L, S, K. Il bersaglio di SCCA2, è rappresentato dalle proteasi seriniche chimotripsina-like, come la catepsina G e la chimotripsina dei mastociti^{41,42}. Sebbene inizialmente la presenza di SCCA sia stata associata ai soli tumori di tipo squamoso, successivamente questa è stata evidenziata anche in altre condizioni. L'SCCA è infatti espresso anche in tessuti completamente normali, nello specifico a livello dello strato soprabasale dell'epitelio squamoso stratificato di lingua, tonsille, esofago, cervice uterina e vagina, corpuscoli di Hassal del timo e cute. Sembra che esso protegga le cellule dalle cistein-proteasi batteriche e virali e la barriera epiteliale dalle chimasi prodotte dalle mast-cellule. Inoltre l'espressione nello strato spinoso e granulare degli epitelii è ritenuto responsabile della prevenzione dell'apoptosi cellulare dello strato corneo. SCCA è stato rinvenuto, inoltre, nei tessuti di organi affetti da patologie benigne con una componente infiammatoria importante, patologie cutanee (quali eczema, pemfigo, eritroderma, psoriasi) e polmonari (tubercolosi, ARDS, polmonite eosinofila, sarcoidosi, cisti broncogene), nei

quali la sua funzione non è stata ancora chiarita. È stata, infine, dimostrata l'espressione di SCCA anche nel contesto di neoplasie di tipo ghiandolare. Mediante test immunocistochimici nel 2003 Pontisso et Al. hanno dimostrato la presenza delle varianti SCCA1 ed SCCA2 in tutti i campioni chirurgici e nel 79% di quelli ottenuti da FNAB in pazienti con epatocarcinoma, identificando peraltro una nuova variante denominata SCCA-PD in ben un terzo di essi.

Ruolo di SCCA nella biologia tumorale

Il coinvolgimento di SCCA nella regolazione dei processi proteolitici ha sicuramente delle importanti implicazioni a livello dei processi neoplastici, dal momento che l'equilibrio tra le proteasi ed i loro inibitori, può influenzare la mobilità, l'invasività, la proliferazione e la morte cellulare stessa. Questo aspetto è correlabile con la maggiore espressione di SCCA in tessuti tumorali, rispetto agli epiteli normali; proprio a questo proposito esistono evidenze di un legame tra il livello di espressione della proteina SCCA e le caratteristiche di invasività e crescita neoplastica. SCCA avrebbe inoltre un'attività inibitrice sull'apoptosi cellulare in particolare delle cellule neoplastiche di origine epiteliale. Questo è stato dimostrato mediante esperimenti di trasfezione transiente di linee cellulari con il cDNA di SCCA1 tramite vettore retrovirale. Si è osservato che le cellule trasfettate ed esprimenti SCCA1, stimulate con reagenti inducenti l'apoptosi (es. TNF-alpha, FAS), sopravvivono più a lungo rispetto alle cellule di controllo. Le cellule trasfettate con il cDNA dell'SCCA1 si sono dimostrate resistenti anche all'apoptosi mediata in vitro

dalle cellule Natural Killer attivate da IL2. Il meccanismo ipotizzato in grado di proteggere le cellule cancerose dalla morte programmata coinvolgerebbe l'inibizione dell'attività della caspasi-3, una proteasi coinvolta nella cascata dei segnali intracellulari che attivano l'apoptosi. È stato anche evidenziato come le cellule epiteliali esprimenti SCCA1 esprimano a livelli minori caspasi-3 per cui oltre all'inibizione funzionale è plausibile un effetto indiretto di SCCA sulla sintesi di caspasi 3. Più recentemente Murakami e Suminami sono giunti alla conclusione che pure le cellule trasfettate con cDNA di SCCA2 possiedono una ridotta attività delle caspasi-3 e 9 e che anch'esse resistono maggiormente all'apoptosi indotta da radiazioni. L'SCCA può avere quindi un ruolo nello sviluppo del fenotipo tumorale, perchè favorisce la sopravvivenza delle cellule neoplastiche interferendo con i processi apoptotici cellulari.

L'immunocomplesso SCCA-IgM: un nuovo biomarcatore per l'epatocarcinoma

L'utilizzo di immunocomplessi come biomarcatori tumorali è riportato nell'esperienza di alcuni gruppi di lavoro che concordano con la visione più recente dell'immunologia tumorale. Le attuali conoscenze a proposito individuano nell'immunoediting tumorale un modello secondo cui lo sviluppo di una neoplasia seguirebbe fasi legate anche alla risposta immunitaria dell'organismo alle cellule tumorali. Dal concetto di immunosorveglianza, un

concetto generico secondo cui il sistema immunitario è in grado di controllare la proliferazione di cellule neoplastiche, si è passati all'idea che dopo un'iniziale fase di controllo sulla crescita tumorale il sistema immunitario ceda alla proliferazione cellulare neoplastica liberando la moltiplicazione cellulare tumorale. L'interazione tra sistema immunitario e neoplasie selezionerebbe quindi, secondo questa teoria, delle varianti tumorali meno immunogeniche favorendone lo sviluppo. Gli studi finora condotti sull'utilità di marcatori associati ad immunoglobuline non sono molti e riguardano solo alcuni marcatori: l'Antigene Carcino-Embrionario e TA90 per il cancro del colon e MUC-1 e p53 per il cancro della mammella. In queste esperienze sono stati riscontrati soprattutto immunocomplessi con immunoglobuline IgG peraltro sempre accompagnate da significativo rialzo anche del marcatore libero sierico. Dal punto di vista dei risultati poi, si è sempre riconosciuta una loro limitata utilità nella diagnosi e nella stadiazione clinica ed un potenziale ruolo nel monitoraggio della malattia nel post-operatorio. Beneduce et Al. nel 2005 hanno condotto uno studio rilevante in tal senso. Introducendo una nuova metodica ELISA per il dosaggio degli immunocomplessi circolanti, hanno rilevato che in una casistica di 160 pazienti affetti da epatite cronica, cirrosi epatica ed epatocarcinoma il dosaggio dell'immunocomplesso SCCA-IgM sierico ha caratteristiche di specificità e sensibilità migliori dell'AFP, marcatore comunemente utilizzato nell'approccio laboratoristico del carcinoma epatico. L'uso di SCCA-IgM in associazione ad AFP nei pazienti di questo studio ha dimostrato una sensibilità nella diagnosi di HCC doppia rispetto ad AFP da sola. Questo lavoro, che peraltro non riconosce livelli circolanti

significativi né di SCCA libero, determinabile con scarsa specificità e sensibilità sia nei pazienti sia nei soggetti sani, né di IgM o IgG libere, pone le basi per una serie di speculazioni molto interessanti dal punto di vista biologico che vedono nella presenza degli immunocomplessi circolanti il segno di una risposta dell'organismo alla neoplasia. La presenza di soli immunocomplessi di tipo SCCA-IgM è attribuita al fatto che l'esposizione del sistema immunitario a basse dosi antigeniche (le varianti SCCA) sarebbe in grado di indurre una risposta umorale di tipo IgM senza attivare l'immunità IgG-mediata.

Immunocomplessi in circolo nelle patologie del fegato

Già nel 1981 Narumoto dimostrò che alti livelli di immunocomplessi potevano essere dosati in diverse condizioni di danno epatico, tra cui nel siero di pazienti con cirrosi e in quello di soggetti portatori di HCC, ma anche nel siero di pazienti con epatite fulminante ed epatite lupoide. Non vi era evidenza, invece, di un aumento significativo degli immunocomplessi in circolo in pazienti con epatite acuta o cronica. Pochi anni più tardi, altri autori confermavano che gli immunocomplessi circolanti erano presenti in maggior quantità nei pazienti con epatocarcinoma rispetto ai soggetti con epatite cronica e, ancor di più, rispetto ai soggetti sani. Nello stesso studio, inoltre, gli studiosi rilevavano minori concentrazioni di immunocomplessi nel liquido ascitico dei soggetti con HCC piuttosto che nel siero degli stessi pazienti. Ci sono evidenze di un

legame stretto dell'infezione cronica da HCV con la comparsa in circolo di immunocomplessi IgG, IgM, tra cui il fattore reumatoide, e complessi di natura virale. Essi tendono a precipitare in presenza di condizioni locali favorevoli come la stasi ematica o il freddo, che predispongono alla formazione di lesioni vasculitiche a livello cutaneo, soprattutto agli arti inferiori, condizione clinica nota come crioglobulinemia mista. Sembra che responsabile della produzione di immunocomplessi sia la proliferazione benigna di una popolazione specifica di linfociti B responsabile della risposta dell'ospite all'infezione da HCV. Questi linfociti sono auto replicanti, sono stimolati da antigeni self ed esprimono il marker CD5. Alla base di questa autoreattività sembra esserci la capacità dell'HCV di legarsi alle VLDL in circolo, sia per eludere il sistema immunitario, sia per penetrare più facilmente le cellule che captano l'ApoE2 tramite l'LDLR. Ciò potrebbe rappresentare la spiegazione etiologica sia della crioglobulinemia mista che della capacità del virus di sviluppare un'infezione cronica. Un altro studio del 2000 dimostra che costituenti principali delle crioglobuline che si formano nel siero di soggetti con infezione cronica da HCV sono il fattore reumatoide, gli anticorpi policlonali anti-HCV e l'RNA virale. Gli autori spiegano, inoltre, il meccanismo con cui HCV induce i linfociti B a proliferare attribuendo al virus la capacità di legare la molecola CD81 dei linfociti B e di influenzare le funzioni regolatorie delle cellule una volta che si trovano al loro interno. Ciò spiega perché l'infezione cronica da HCV predispone all'insorgenza di malattie autoimmuni e di disordini reumatici (artriti, vasculiti, malattie tiroidee, fibrosi polmonare, nefropatie), difficilmente gestibili con immunosoppressori per il rischio di peggiorare l'infezione da

virus C.

Contributo sperimentale

Pazienti e metodi

Sono stati arruolati 12 pazienti con diagnosi di epatocarcinoma e 45 pazienti affetti da cirrosi epatica. La diagnosi di HCC era basata sulla presenza di lesioni focali visualizzate all'ecografia epatica e confermate con TC e/o RM.

Per ogni paziente è stato eseguito un prelievo ematico a digiuno dopo l'ottenimento del consenso informato. Il sangue è stato quindi raccolto in provetta Vacutainer da 10ml priva di anticoagulanti.

Per ogni campione è stata poi eseguita la sieratura, mediante centrifugazione a 1500 giri/minuto per 15 minuti, e i sieri sono stati conservati a -80°C fino al momento della preparazione delle piastre per il test ELISA.

La quantificazione sierica dell'immunocomplesso SCCA-IgM è stata eseguita sui campioni dei pazienti e dei controlli utilizzando un metodo immunoenzimatico su fase solida di tipo ELISA indiretto (Hepa-IC; Xeptagen; Mestre-Venezia, Italia). Sono stati ricoperti 96 pozzetti di una piastra da microtitolazione con 100µl di anticorpo policlonale di coniglio anti-SCCA

umano alla concentrazione di 10µg/ml in PBS (soluzione buffer), lasciandoli in incubazione a 4°C per una notte. Dopo 3 lavaggi con soluzione detergente, è stato eseguito il bloccaggio dei legami aspecifici con 300 µl di albumina sierica bovina (BSA) all'1% in PBS, per 2 ore a temperatura ambiente. È stata effettuata incubazione di 100 µl di siero da testare diluito 1:8 con soluzione 1% di BSA e 0.05% Tween20 per un'ora a temperatura ambiente. Il dosaggio di SCCA-IgM è stato eseguito mediante incubazione di una soluzione 1:1000 di anticorpo secondario anti IgM umane coniugato con perossidasi per un'ora a temperatura ambiente e successivo sviluppo della reazione enzimatica con soluzione ABTS (acido 2,2'-azo-bis [3etilbenziazolin-6-sulfonico]) e perossido di idrogeno (25 ul al 30% in 50ml). L'analisi spettrofotometrica delle soluzioni finali è avvenuta con misura dell'assorbanza del campione a 405 nm. Il valore scelto di cut-off per definire la positività al dosaggio di SCCA-IgM è stato calcolato presso il nostro laboratorio su 100 soggetti sani, come 95° percentile ed è risultato pari a 156 AU/ml. La presenza del fattore reumatoide nel siero è stata determinata con metodo immunonefelometrico (BN II, Siemens), considerando come normali valori <40 IU/mL. L'analisi statistica dei dati raccolti per questo studio è stata condotta mediante l'ausilio del software SSPS.

La significatività statistica delle analisi condotte è stata considerata per valori di $p < 0,05$.

DISTRIBUZIONE DEI VALORI DI POSITIVITA' SCCA-IgM IN RAPPORTO ALLA PRESENZA IN CIRCOLO DI FATTORE

REUMATOIDE

Nel nostro studio abbiamo analizzato la percentuale di pazienti con epatocarcinoma e con cirrosi epatica che risultavano positivi per SCCA-IgM e per Fattore Reumatoide, suddividendoli a loro volta in gruppi eziologici, a seconda della natura virale o non virale della malattia.

È stata studiata quindi la relazione esistente tra i livelli sierici di SCCA-IgM e di Fattore Reumatoide nei pazienti con epatocarcinoma e in quelli con cirrosi epatica. L'analisi è stata ulteriormente condotta con studi di correlazione per verificare l'esistenza di una eventuale relazione tra i livelli di positività per SCCA-IgM e per Fattore Reumatoide nei due gruppi di pazienti. Nei casi con HCC non è stata documentata alcuna correlazione tra le due reattività ($r=0,1$).

Nel gruppo dei pazienti cirrotici l'analisi dei valori di positività per SCCA-IgM in relazione alla reattività per FR ha documentato una relazione significativa con un valore di r è pari a 0.58.

E' stata quindi valutata la correlazione suddividendo i pazienti in base all'eziologia, in particolare alla presenza di infezione HCV. Il grado di correlazione all'interno del sottogruppo dei pazienti con cirrosi HCV-correlata è risultato maggiore ($r=0,71$) rispetto al valore riportato per tutti i pazienti cirrotici, mantenendo un'elevata significatività statistica nonostante la numerosità del campione fosse diminuita.

È stato calcolato, inoltre, il grado di correlazione all'interno del sottogruppo dei pazienti con epatocarcinoma e infezione da HCV. A differenza che nel caso dei pazienti cirrotici, non è stata trovata alcuna correlazione tra le due variabili in questo sottogruppo di pazienti.

Discussione

Fino a non molti anni fa l'unico marcatore utilizzato in ambito clinico per la diagnosi precoce e il follow-up dell'epatocarcinoma era l'alfa-fetoproteina (AFP). Data la scarsa sensibilità e specificità dell'AFP, la comunità scientifica si è focalizzata sulla ricerca di nuovi marcatori per la diagnosi di HCC e diversi marcatori sono stati proposti negli ultimi anni. L'immunocomplesso SCCA-IgM si è mostrato un marcatore utile per la diagnosi di HCC ed anche un parametro prognostico in grado di identificare i pazienti cirrotici a maggior rischio di sviluppo di HCC. Scopo del nostro studio è stata la caratterizzazione della specificità del dosaggio dell'SCCA-IgM nei pazienti cirrotici o già portatori di epatocarcinoma in rapporto alla presenza in circolo di altri immunocomplessi, quali il fattore reumatoide. I soggetti analizzati sono stati sia pazienti con epatocarcinoma che controlli affetti da cirrosi epatica. Solo il 6,6% dei soggetti con HCC positivi per SCCA-IgM è risultato positivo anche per Fattore Reumatoide, mentre nell'ambito dei pazienti cirrotici la percentuale di casi SCCA-IgM positivi con reattività per FR è risultata del 24%. Questi dati

evidenziano come nei soggetti con HCC non vi sia una relazione tra i due parametri, mentre nei pazienti con cirrosi la relazione è risultata significativa in circa un quarto dei pazienti con reattività SCCA-IgM. L'analisi ulteriore effettuata suddividendo i pazienti in base all'eziologia virale ha documentato che la correlazione osservata era più evidente nei pazienti con infezione HCV. È noto in letteratura che i casi con cirrosi HCV correlata presentano alti livelli in circolo di immunocomplessi IgG e IgM, tra cui il fattore reumatoide, e complessi di natura virale, i quali tendono a precipitare in presenza di condizioni locali favorevoli come la stasi ematica o il freddo, determinando il quadro clinico di crioglobulinemia mista. I nostri risultati evidenziano che in un sottogruppo di pazienti cirrotici, in effetti, la reattività osservata potrebbe essere correlata alla presenza del fattore reumatoide. D'altro canto il 93,3% delle reattività SCCA-IgM nei pazienti con HCC non risultano correlate alla presenza del FR, assodando quindi la specificità dei risultati in questo gruppo di pazienti. Per una migliore interpretazione del parametro SCCA-IgM, comunque, i dati dello studio suggeriscono indicazione al contestuale dosaggio del FR, specie nei pazienti con cirrosi HCV correlata.

Conclusioni

In conclusione, la validità del nuovo biomarcatore SCCA-IgM non risulta correlata alla presenza di FR nei pazienti con HCC, mentre l'utilizzo del test per la sorveglianza dei pazienti cirrotici, specie nei casi dovuti ad infezione da

HCV, potrebbe essere limitato in una frazione dei pazienti da una moderata correlazione coi livelli in circolo di FR. Questi risultati necessitano comunque di essere ulteriormente validati in ambito clinico.

Bibliografia

- Agnello V et al. The etiology and pathophysiology of mixed cryoglobulinemia secondary to hepatitis C virus infection. Springer Semin Immunopathol. (1997)
- Amarapurkar D et al. Application of surveillance programs for hepatocellular

carcinoma in the Asia-Pacific Region. *J Gastroenterol Hepatol.* (2009)

-Antonelli A. et Al. HCV infection: pathogenesis, clinical manifestations and therapy.

Clin Exp Rheumatol. 2008 Jan-Feb;26(1 Suppl 48):S39-47.

-Barbara L. et Al. Natural history of small untreated HCC in cirrhosis: a multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology* 1992; 16: 132-137.

-Beneduce et Al. Improvement of liver cancer detection with simultaneous assessment of circulating levels of free alpha-fetoprotein (AFP) and AFP-IgM complexes. *Int J Biol Markers.* 2004 Apr-Jun;19(2):155-9.

-Beneduce L, Castaldi F, Marino M, Quarta S, Ruvoletto M, Benvegnù L, Calabrese F, Gatta A, Pontisso P, Fassina G. Squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103:2558-2565.

-Biasiolo A. et Al. Monitoring SCCA-IgM complexes in serum predicts liver disease progression in patients with chronic hepatitis. *J Vir Hepat* 2008; 15:246-9

-Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 5093-5107

-Bruix J, Sherman M. Management of Hepatocellular Carcinoma. AASLD practice guideline. *Hepatology* 2005;vol. 42, No 5

-Cammà 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.

-Cataltepe S, Gornstein ER, Schick C, Kamachi Y, Chatson K, Fries J, Silverman GA, Upton MP. Co-expression of the squamous cell carcinoma antigen 1 and 2 in normal

adult human tissues and squamous cell carcinoma. *The journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2000; 48(1): 113-122.

-Chen ZM, Liu BQ, Boreham J, Wu YP, Chen JS, Peto R. Smoking and liver cancer in China; case-control comparison of 36,000 liver cancer deaths vs. 17,000 cirrhosis deaths. *Int J Cancer* 2003; 107:106-112

-Cottone M. et Al. Asymptomatic HCC in Child's A cirrhosis. A comparison of natural history and surgical treatment. *Gastroenterology* 1989; 96: 1566-1771.

-Croce MV, Isla Larrain MT, Demichelis SO, Gori JR, Price MR, Segal-Eiras A. Tissue and serum MUC1 mucin detection in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 81: 195-207.

-Debruyne EN, Delanghe JR. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications. *Clin Chim Acta*. 2008 Sep;395(1-2):19-26. Epub 2008 May 17.

-Donato F, Boffetta P, Puoti M: A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 75: 347-354

-Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber D. Cancerimmunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. 2002; 3(11):991-998.

-Ebara M. et Al. Natural history of minute HCC smaller than 3 cm complicating cirrhosis. A study in 22 patients. *Gastroenterology* 1986; 90: 289-298.

-Edgar D., Lynn B. Hepatitis C Virus-Induced Cryoglobulinemia. *Kidney Int*. 2009 October ; 76(8): 818–824

-Fuchs C, Krapf F, Kern P, Hoferichter S, Jager W, Kalden JR CEA-containing immunocomplexes in sera of patients with colorectal and breast cancer – analysis of

- complexed immunoglobulin classes. *Cancer Immunol Immunother.* 1988; 26: 180-184.
- Giambartolomei S, Covone F, Levrero M, Balsano C. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene* 2001; 20: 2606-2610
- Giannelli G. et Al. Clinical validation of combined serological biomarkers for improved hepatocellular carcinoma diagnosis in 961 patients. *Clin Chim Acta.* 2007 Aug;383(1-2):147-52. Epub 2007 May 26.
- Guido M. et Al. Squamous cell carcinoma antigen in human liver carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2008;61(4):445-7.
- Habal N, Gupta RK, Bilchick AJ, Johnson T, Morton DL. TA-90-IC, a new marker for advanced colon cancer. *Ann Surg Oncol.* 2000; 7: 352-356.
- Hamada K, Shinomiya H, Asano Y, Kihana T, Iwamoto M, Hanakawa Y, Hashimoto K, Hirose S, Kyo S, Ito M. Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter. *Biochim Biophys Acta* 2001;1518:124-31.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70
- Harrison, *Principi di medicina interna*, 15ma ed., 2003; vol. 1, 693-694
- Hashem B. El-Serag et Al. Diagnosis and treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2008;134:1752-1763
- <http://progettooncologia.cnr.it/strategici/epatocarcinoma>
- Kato H. 20th Anniversary meeting on SCC antigen proceeding. *Tumor Biol* 1998; 478-479.
- Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical

squamous cell carcinoma. *Cancer* 1977;40:1621-8.

-Kuper HE, Tzonou A, Kaklamani E, Hadziyannis S, Tasopoulos N, Laggiou P, Trichopoulos D, Stuver S. Hepatitis B and C viruses in the etiology of hepatocellular carcinoma; a study in Greece using thirdgeneration assays. *Cancer Causes Control* 2000; 11: 171-175

-Kuwano A, Kodo I, Kishi F, Suminami Y, Kato H. Assignment of the squamous cell carcinoma antigen locus (SCC) to 18q21.3 by in situ hybridization. *Genomics* 1995;30:626.

-La Vecchia C, Negri E, Pelucchi C. The rise and fall in primary liver cancer mortality in Italy. *Digestive Liver Dis* 2002; 34: 169-171

-La Vecchia C, Negri E, Cavalieri D'Oro L, Franceschi S. Liver cirrhosis and the risk of primary liver cancer. *Eur J Cancer Prev* 1998; 7: 315-320

-Livraghi T. et Al. No treatment, resection and ethanol injection in HCC: a retrospectiveanalysis of survival in 391 patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1995; 22: 522-556.

-Llovet J.M. et Al. Prognosis of HCC: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999;19: 329-338.

-Murakami A, Suminami Y, Hirakawa K, Nawata S, Numa F, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death. *Br J Cancer* 2001;84:851-8.

-Nakashima Y, Nakashima O, Tanaka M, Okuda K, Nakashima M, Kojiro M. Portal vein invasion and intrahepatic micrometastasis in small hepatocellular carcinoma by gross type. *Hepatol Res* 2003; 26: 142-147

-Nakashima O. et Al. Recurrence of HCC: multicentric occurrence or intrahepatic metastases? Aviewpoint in terms of pathology. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8:

404-409.

-Narumoto J et al. Studies on circulating soluble immune complexes of the liver disease. 7. Immune complexes in the clinical course and their ultracentrifugal analysis. Gastroenterol Jpn. (1981)

-Numa F, Takeda O, Nakata M, Nawata S, Tsugana N, Hirabayashi K, Suminami Y, Kato H, Hamanaka S. Tumor necrosis factor- α stimulates the production of squamous cell carcinoma antigen in normal squamous cells. Tumor Biol 1996;17:6040-6.

-Parenti A, Porzionato A, Pizzi S, Guzzardo V, Fascina G, Macchi V, Ninfo V, De Caro R. Expression pattern of squamous cell carcinoma antigen in oesophageal displasia and squamous cell carcinoma. Histol Histopatol 2007; 22:989-995.

-Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J cancer 2001; 94: 153-156

-Peyrat JP, Bonnetter J, Lubin R, Vanlemmens L, Fournier J, Soussi T. Prognostic significance of circulating p53 antibodies in patients undergoing surgery for loco-regional breast cancer. Lancet. 1995; 345: 624-622.

-Pontisso P, Calabrese F, Benvegnù L, Lise M, Bellucco C, Rivoletto MG, De Falco S, Marino M, Valente M, Nitti D, Gatta A, Fascina G. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. British Journal of Cancer. 2004; 90: 833-837.

-Pontisso P. et Al. Progressive increase of SCCA-IgM immune complexes in cirrhotic patients is associated with development of hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 2006; 119:735-740

-Sasso EH, The rheumatoid factor response in the etiology of mixed cryoglobulins associated with hepatitis C virus infection. *Ann Med Interne (Paris)*. 2000 Feb;151(1):30-40

-Schneider SS, Schick C, Fish KE, Miller JC, Pena SD, Treter SM, Hui GA, Silverman GA. A serine protease inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3147-51.

-Schick C, Kamachi Y, Bartuski AJ, Cataltepe S, Schecher NM, Pemberton PA, Silverman GA. Squamous cell carcinoma antigen: a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chynase. *J Biol Chem* 1997;272:1849-55.

-Schick C, Pemberton PA, Shi GP, Kamachi Y, Cataltepe S, Bartoski AJ, Gornstein ER, Bromme D, Chapman HA, Silverman GA. Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsin K,L,and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* 1998;37:5258-5266.

-Silverman GA, Bartuski A, Cataltepe S, Gornstein ER, Kamachi Y, Schick C, Uemura Y. SCCA1 and SCCA2 are proteinase inhibitors that map to the serpin cluster at 18q21.3. *Tumor biology* 1998;19:480-7.

-Stefaniuk P. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010 Jan; 16(4):418-424.

-Stroffolini T. et Al. Characteristics of HCC in Italy. *J Hepatol* 1998; 29: 944-952

-Suminami Y, Nagashima S, Vujanovic N, Hirabayashi K, Kato H. Inhibition of apoptosis in human tumor cells by the tumor-associated serpin, SCC antigen-1. *Br J Cancer* 2000;82:981-9.

-Suminami Y, Nagashima S, Murakami A, Nawata S, Gondo T, Hirakawa H, Numa F, Silverman G, Kato H. Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killers cells. *Cancer Res* 2001;61:1776-80.

-Suminami Y, Kishi F, Sakaguchi K, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:51-8.

-Suminami Y, Kishi F, Sakaguchi K, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:51-8.

-Theise ND, Park YN, Kojiro M. Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis. *Clin Liver Dis* 2002; 6: 497-512

-Torre GC. SCC antigen in malignant and non malignant squamous lesions. *Tumour Biol.* 1998; 19(6): 517-26.

-Verslype C. et Al. The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2008. *Annals of Oncology* 20 (Supplement 7): vii1–vii6, 2009

-Villa E. et Al. Natural history of inoperable HCC: estrogen receptors' status in the tumor is the strongest factor for survival. *Hepatology* 2000; 32: 233-238.

-Waris G, Siddiqui A. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci* 2003; 28: 311-321

-Yuen MF, Lai CL. Serological markers of liver cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005 Feb;19(1):91-9. Review

-Yu MC, Mack T, Hanisch R et al. Hepatitis, alcohol consumption, cigarette smoking, and hepatocellular carcinoma in Los Angeles. *Cancer Res* 1983; 43: 6077-6079

