



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA**  
**"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN TECNOLOGIE AVANZATE IN BIOMEDICINA

XXI CICLO

**NUOVI MARCATORI PROGNOSTICI NEL CARCINOMA EPATOCELLULARE:  
ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA IN "EASTERN" e "WESTERN" MICROARRAY  
TISSUTALI**

Dottoranda: Serena Battista

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Prof. L.G. Spagnoli

Coordinatore: Prof. L.G. Spagnoli

# INDICE

1. RIASSUNTO	pag 3
2. INTRODUZIONE	pag 5
3. BIOMARCATORI DI AGGRESSIVITA' DELL'EPATOCARCINOMA	pag 7
3.1 MOLECOLE DI ADESIONE CELLULARE	pag 8
3.1.1 LAMININA-5	
3.1.2 OSTEOPONTINA	
3.2 MARCATORI DI MOTILITA' CELLULARE	pag 9
3.2.1 <i>p21-ATTIVATED KINASE 1</i> (Pak-1)	
3.2.2 $\alpha$ -TUBULINA E $\beta$ -TUBULINA	
3.3 MARCATORI DI STAMINALITA'	pag 10
3.3.1 CITOCHERATINA 19	
3.3.2 Ep-CAM	
3.4 ALTRI MARCATORI	pag 12
3.4.1 GLUTAMINA SINTETASI	
3.4.2 GLIPICAN 3	
3.4.3 <i>HEAT SHOCK PROTEIN 70</i> (Hsp70)	
4. SCOPO DEL LAVORO	pag 14
5. MATERIALE E METODI	pag 15
6. RISULTATI	pag 19
7. DISCUSSIONE	pag 53
8. BIBLIOGRAFIA	pag 59

## 1- Riassunto

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è la più frequente patologia neoplastica primitiva del fegato, il quinto tumore maligno in ordine di frequenza nel mondo e la terza causa di morte correlata a neoplasia maligna. La sua incidenza annuale è in costante crescita. Tra i fattori patologici che ne influenzano la sopravvivenza e il trattamento sono ritenuti essere assai significativi il numero di noduli tumorali e relative dimensioni, il grado di differenziazione tumorale e l'invasione vascolare. Infatti, pazienti con neoplasie di piccole dimensioni (< cm. 3), senza invasione vascolare e con nodulo unico hanno una sopravvivenza di circa 50% a 5 anni e sono candidabili a terapie radicali, quali la resezione chirurgica e il trapianto. Tuttavia, l'invasione vascolare e il grado di differenziazione sono parametri non sempre accertabili con affidabilità su materiale bioptico, prima del trattamento. Esiste quindi un grande interesse nel campo della ricerca biologica nel determinare criteri prognostici/predittivi basati sulla espressione di nuovi marcatori tissutali, documentabile anche su materiale bioptico.

In questo studio abbiamo selezionato alcuni biomarcatori tissutali ( $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina, LAMA3, osteopontina, Ep-CAM, Pak1, glipican3, glutamina sintetasi, *heat shock protein 70*) già correlati con una maggiore aggressività tumorale allo scopo di testarne la validità come marcatori prognostici nella pratica clinica.

Il dosaggio di questi marcatori è avvenuto con l'uso di tecniche di immunoistochimica, utilizzando un duplice supporto: un *microarray* tissutale occidentale costituito da 98 casi di HCC, HCV-correlati, raccolti da una casistica italiana, e un *microarray* tissutale orientale costituito da 136 casi di HCC, HBV-correlati, raccolti da una casistica proveniente dalla Repubblica della Corea del Sud.

Complessivamente, le due casistiche orientale e occidentale, pur diversificandosi per età, grado e stadio tumorale, con evidenza di una quota di neoplasie meno differenziate, con diametro maggiore, ancorché più giovanili, nelle casistica orientale, hanno dimostrato una sopravvivenza complessiva (Overall Survival) e libera di malattia (Disease Free Survival) sovrapponibili.

La distribuzione dei marcatori tissutali ha evidenziato associazioni di tipo epidemiologico, dimostrando alcuni marcatori quali  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina un'impatto sulla sopravvivenza complessiva e libera da malattia prevalentemente nella casistica occidentale, mentre altri quali Pak1, *heat shock protein 70* e osteopontina, risultavano associati sia isolatamente che in combinazione, ad una maggiore aggressività tumorale, sempre in termini di sopravvivenza complessiva e libera da malattia, esclusivamente nella casistica orientale. E' interessante tuttavia rilevare che tra i parametri morfologici considerati, solo il grado di differenziazione tumorale resisteva come predittore di aggressività tumorale, alla selezione operata dall'analisi multivariata, e questo nella sola casistica occidentale.

In conclusione, il nostro studio ha documentato che:

- A) nell'epatocarcinoma, l'iperespressione di alcuni biomarcatori singolarmente o in combinazione, si associa a una maggiore aggressività tumorale, con un potenziale impatto prognostico.
- B) il significato clinico di questi marcatori non appare universale in quanto correlato a specifici parametri epidemiologici, tra i quali rilevanti appaiono la collocazione geografica e l'eziologia della epatite cronica/cirrosi.
- C) il grado di differenziazione tumorale rimane un parametro morfologico forte contro il quale va validato il significato clinico di nuovi biomarcatori.

## 2. INTRODUZIONE

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è la più frequente patologia neoplastica primitiva del fegato, il quinto tumore maligno in ordine di frequenza nel mondo e la terza causa di morte correlata a neoplasia maligna. La sua incidenza annuale è in costante crescita. Globalmente, ci sono circa 500.000-1.000.000 nuovi casi/anno e 600.000 decessi/anno. La maggior parte dei casi di HCC sono documentati in Asia, prevalentemente nell'Asia orientale, ad esempio Mongolia, Corea, Cina e Giappone. L'incidenza è 2-3 volte maggiore nelle regioni in via di sviluppo (Africa Subsahariana ed Estremo Oriente) rispetto a regioni a prevalenza intermedia come l'Europa mediterranea (Italia, Grecia, Francia e Spagna).

I principali fattori di rischio per lo sviluppo dell'epatocarcinoma sono l'infezione dal virus dell'epatite B (HBV) e C (HCV). Altri fattori di rischio sono l'ingestione di alimenti contaminati da aflatossina B1, il consumo di alcool, e alcune malattie ereditarie tra le quali emocromatosi, tirosinemia ereditaria e deficit di  $\alpha$ 1 anti-tripsina. L'HBV e l'HCV hanno distinte aree di prevalenza. L'HCV predomina nei paesi occidentali, Giappone e Australia ed è il più importante fattore eziologico per l'HCC nei paesi dell'Europa Occidentale e del Nord America. L'HBV prevale nell'Africa e nell'Asia (Montalto et al., 2002).

La maggior parte dei pazienti affetti da HCC ha una prognosi sfavorevole per la rapida progressione tumorale. L'ablazione tumorale, la chirurgia e il trapianto sono le principali opzioni di cura per i pazienti portatori di HCC (Bruix et al., 2006; Forner et al., 2006). Il trapianto epatico è il *gold standard* per il trattamento curativo dei pazienti portatori di un nodulo unico o di un numero massimo di 3 piccoli noduli di HCC (criterio di Milano). Tuttavia, solo pochi pazienti sono arruolabili e l'11%-17% di questi pazienti presentano una recidiva dopo il trapianto e questa è la principale causa di morte (Parfitt et al., 2007). Pazienti in stadio iniziale secondo i criteri di Barcellona (che tiene conto dello status del pazienti affetti nel 90% da cirrosi epatica) possono essere sottoposti ad intervento chirurgico ed hanno buona prognosi, con 89% di sopravvivenza a 5 anni dopo resezione

tumorale e 71% di sopravvivenza a 5 anni dopo ablazione tumorale, e con 8% di recidiva a 3 anni. Tuttavia, la maggioranza dei pazienti portatori di HCC si presenta in stadio avanzato e ha una sopravvivenza media di 6 mesi. Per la cura di questi pazienti, attualmente, si dispone del Sorafenib, un inibitore multiplo di chinasi, la prima terapia molecolare mirata per l'HCC che si è dimostrata efficace in un ampio *trial* clinico eseguito su pazienti affetti da tumori in stadio avanzato, prolungando la loro sopravvivenza (Chaparro et al., 2008).

A fronte della varietà di approcci terapeutici (trapianto, chirurgia, ablazione medica, chemioterapia, terapia biologica) esiste una relativa carenza di criteri sufficientemente robusti utile a selezionare i pazienti per indirizzarli in maniera mirata a queste diverse forme di trattamento. Appare paradossale come a tutt'oggi il numero e le dimensioni delle lesioni tumorali costituiscono il *gold standard* per candidare i pazienti al trattamento epatico e/o resezione o trapianto.

Il grado tumorale, le dimensioni, la multinodularità, la presenza di angioinvasione microvascolare, la presenza di trombosi tumorale nella vena porta e di lesioni microsatelliti sono tutti fattori predittivi della prognosi del paziente, ma poco sensibili.

Esiste quindi la necessità, anche in considerazione dei dati forniti da studi di *expression profiling*, di caratterizzare biologicamente gli HCC e di rendere disponibile questi marcatori per una valutazione sul materiale bioptico.

### **3. BIOMARCATORI DI AGGRESSIVITA' DELL'EPATOCARCINOMA**

Per biomarcatori tumorali si intendono proteine coinvolte nei processi di cancerogenesi in grado di fornire informazioni biologiche complementari a quelle clinico-patologiche del tumore, utili per predire il comportamento biologico della malattia e la maggiore o minore suscettibilità alla terapia.

Diversi fattori sono coinvolti nel processo di progressione tumorale e metastasi e molti fra questi sono stati proposti come marcatori predittivi del comportamento della malattia, ed anche come eventuali *target* terapeutici. Sono molecole coinvolte in diverse funzioni biologiche, come l'angiogenesi, l'adesione cellulare, l'invasione vascolare e la motilità cellulare, tutti eventi essenziali nella progressione tumorale.

Oggi, le scienze di base hanno svelato numerosi marcatori, ma nessuno fra questi è utilizzato nella pratica clinica per la mancanza di studi che ne abbiano validato il significato.

In questo studio sono stati selezionati alcuni biomarcatori ( $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina, LAMA3, osteopontina, Ep-CAM, Pak1, glipican3, glutamina sintetasi, *heat shock protein 70*), associati a recidiva precoce, metastasi linfonodali, metastasi a distanza o intraepatiche e angioinvasione dell'epatocarcinoma al fine di verificare se la loro iperpressione ha un potere predittivo sul comportamento dell'epatocarcinoma.

Tali marcatori sono elencati in seguito e schematicamente raggruppati nella loro presentazione in accordo alla loro presunta e presente funzione biologica.

## **3.1 MARCATORI DI ADESIONE CELLULARE**

Alterazioni nei processi di adesione cellulare hanno anche effetti evidenti nella motilità cellulare. E' noto come le cellule cancerogene devono essere capaci di muoversi e "migrare" al fine di diffondersi, e l'adesione cellulare gioca un ruolo molto importante nella regolazione di questo processo.

### **3.1.1 Laminina 5**

La laminina-5 (Ln-5), una proteina glicosilata eterodimerica della matrice extracellulare promuove l'adesione statica e la formazione di emidesmosomi e stimola la migrazione e l'invasione cellulare (Qin et al., 2004). La Ln-5 è costituita dalle catene polipeptidiche  $\alpha3\beta3\gamma2$ , prodotte rispettivamente dai geni *LAMA3*, *LAMB3*, and *LAMC2*. Studi di espressione della catena  $\gamma2$  dimostrano una significativa correlazione tra la sua iperespressione e l'invasione tumorale, le metastasi linfonodali, le metastasi a distanza e la recidiva tumorale nei tumori del colon-retto, nel carcinoma esofageo, nell'adenocarcinoma pancreatico, e nel carcinoma mammario (Qin et al., 2004). Nell'epatocarcinoma, la Ln-5 è stata trovata nel microambiente del tumore ed i suoi due principali recettori, le integrine  $\alpha3\beta1$  e  $\alpha6\beta4$ , sono espressi sulla superficie delle cellule tumorali. E' stato suggerito che la sua iperespressione, così come quella delle integrine, correla con una prognosi peggiore (Giannelli et al., 2003).

### **3.1.2 Osteopontina**

Un'altra molecola recentemente associata a invasione, progressione e metastasi tumorale di diversi tipi di tumori è la osteopontina (OPN). L'OPN è una glicoproteina adesiva, secretoria e fosforilata espressa e secreta da diversi tipi cellulari, incluso osso dentario, rene, epitelio, cellule immuni attivate e il cancro. L'OPN agisce come una citochina, legandosi a recettori come le integrine, per inviare segnali alle cellule. E' coinvolta nei processi fisiologici e patologici come la migrazione e adesione cellulare, la risposta infiammatoria, il rimodellamento vascolare, l'apoptosi e la calcificazione ossea. Diversi studi hanno dimostrato che



l'iperespressione dell'OPN tumorale si associa a una prognosi peggiore in pazienti con tumore gastrico, mammario, polmonare, colico, ovarico e nei sarcomi dell'adulto (Qin et al., 2004). In pazienti affetti da tumore mammario, della testa e collo, prostata e ovaio, la concentrazione di OPN circolante del sangue elevata è significativamente correlata ad una peggiore prognosi e sopravvivenza minore (Qin et al., 2004). Tuttavia, il significato biologico è ancora controverso e poco conosciuto. Nell'epatocarcinoma, diversi studi hanno suggerito l'OPN come marcatore di progressione tumorale (Takafuji et al., 2007; Yuan et al., 2006). Di conseguenza l'OPN è stato proposto come marcatore di potenziale interesse per la recidiva tumorale e la sua valutazione sierica suggerita come utile nel monitoraggio delle metastasi (Pan et al., 2003; Zhang et al., 2006; Xie et al., 2007; Kim et al., 2006; Ye et al., 2003).

## **3.2 MARCATORI DI MOTILITA' CELLULARE**

La capacità di una cellula di muoversi è essenziale in svariati ed importanti contesti fisiologici e patologici. In processi patologici la capacità di migrare è una prerogativa delle cellule tumorali con potenzialità metastatizzante. Infatti, marcatori associati ad un'aumentata motilità cellulare sono stati correlati a fenotipi tumorali più aggressivi. Tra questi marcatori, abbiamo selezionato *p21-activated kinase 1*,  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina .

### **3.2.1 *p21-activated kinase 1* (Pak1)**

Pak (*p21-activated kinases*) sono importanti mediatori di segnali della Rho GTPase e hanno ruolo importante in diversi processi biologici vitali come nella dinamica del citoscheletro e motilità della cellula, nella tumorigenesi, nella apoptosi, mitosi, angiogenesi e espressione genica (Bokoch et al., 2003; Ching et al., 2007; Rayala et al., 2007). L'iperespressione di Pak1, la prima molecola di questa famiglia ad essere descritta, è stata associata all'iperplasia e al carcinoma mammario (Jordan, 2006) ed è stata trovata in diversi tipi di tumori maligni. Rayala et al (2007) hanno correlato l'iperespressione nucleare di Pak1 alla resistenza alla terapia con il tamoxifeno nel carcinoma mammario. Studi recenti suggeriscono che Pak1 sia necessaria alla progressione tumorale e alle metastasi nei carcinomi mammario e del colon-retto (Carter et al., 2007; Ching et al., 2007). Verosimilmente l'iperespressione di Pak1 attiva la via del JNK (*c Jun NH2 terminal kinase*) e della

fosforilazione della paxilina aumentando la motilità cellulare. Recentemente, Ching et al. (2007) hanno dimostrato che l'iperespressione di Pak1 negli HCC si correla con l'angioinvasione, la dedifferenziazione, nonché con gli stadi tumorali più avanzati e con recidiva precoce.

### **3.2.2 $\alpha$ -Tubulina e $\beta$ -Tubulina**

Esiste un'ampia variabilità nella distribuzione e nell'attività dei microfilamenti e dei microtubuli, strutture fondamentali del citoscheletro. Queste variabilità, ciò è alla base delle variazioni dei processi di interazione cellula-cellula, conseguono modificazioni del fenotipo cellulare e la modulazione dei processi di adesione e motilità cellulare. I microtubuli e le proteine a essi associate sono importanti in diversi processi cellulari, neoplastici o non neoplastici, incluso mitosi, migrazione cellulare ed invasione (Westerlund e al., 1997; Vasiliev et al., 2004; Korb et al., 2004). Più recentemente, l'alterazione di un'isoforma di  $\beta$ -tubulina, proteina globulare che dimerizza con  $\alpha$ -tubulina nella formazione del microtubulo, è stata considerata fattore predittivo della resistenza alla radioterapia nei tumori rettali (Allal et al., 2004). Oltre a questo, mutazioni puntiformi del gene delle tubuline così come l'iperespressione di alcuni isotipi sono stati messi in correlazione alla resistenza ad agenti antitubulinici, come il taxano o la vinorelbina, e a una recidiva precoce con prognosi sfavorevole e diminuzione del tasso di sopravvivenza nei tumori ovarici e in altri tumori solidi, come il carcinoma polmonare non a piccole cellule, mammario, ovarico, gastrico o di origine occulta (Bernard-Marty et al., 2002; Dumontet et al., 2005; Ferradina et al., 2006). Non ci sono a tutt'oggi disponibili dati in letteratura riguardo l'espressione di  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina nell'HCC.

### **3.3 MARCATORI DI STAMINALITA'**

L'interesse per il ruolo svolto dalle cellule staminali/progenitrici nel processo di carcinogenesi è recente. I dati attualmente disponibili suggeriscono che i tumori maligni possano originare tanto da cellule staminali trasformate, con alto potenziale proliferativo, quanto da cellule mature, con limitato potenziale proliferativo. Recenti studi hanno dimostrato che una frazione dei tumori epatici ha un fenotipo coerente con l'espressione di marcatori di staminalità epatici (vimentina, Ep-CAM, c-Kit). Inoltre, l'espressione di marcatori di tipo staminale/progenitore è stato associato in alcune casistiche negli HCC, la presenza di cellule poco differenziate simili per profilo

fenotipico agli epatoblasti si associa ad una prognosi peggiore e ad una maggiore frequenza di recidive. (Durnez et al., 2006; Uenishi et al., 2003, Komuta et al., 2008). L'analisi morfologica delle lesioni pre-neoplastiche e della progressione tumorale favorisce l'ipotesi di un progressivo dedifferenziamento di epatociti maturi piuttosto che un blocco differenziativo di precursori epatici (cellule progenitore residenti), come invece ben dimostrato in alcuni modelli di carcinogenesi sperimentale epatica (Durnez et al., 2006). Come marcatori di staminalità abbiamo scelto di studiare la CK19 e Ep-CAM.

### **3.3.1 CK19**

Studi recenti hanno indicato che le citocheratine, inclusa la CK19, hanno un importante ruolo nella regolazione della migrazione e nell'invasione cellulare; l'iperespressione di CK19 nell'HCC è correlata a un comportamento più aggressivo ed è uno dei fattori predittivi indipendenti di recidiva (Uenishi et al., 2003); il livello serico della CK19 riflette la progressione tumorale e può essere un'utile marcatore predittivo per le metastasi nei pazienti con HCC (Ding et al., 2003).

### **3.3.2 Ep-CAM**

Ep-CAM - Molecola di Adesione delle Cellule Epiteliali - ha una importante funzione morforegolatrice, rilevante non soltanto per lo sviluppo tissutale ma anche per la carcinogenesi e progressione tumorale (Balzar et al., 1999); essa è presente nella maggioranza dei tessuti epiteliali non patologici, con eccezione dei cheratinociti, cellule gastriche parietali, cellule mioepiteliali, epitelio corticale timico ed epatociti (Schmelzer et al., 2008), partecipa all'adesione intercellulare monotipica, calcio-indipendente ed è coespressa con E-caderina. La gran parte dei carcinomi è EpCAM+, inclusi il carcinoma del colon-retto, il carcinoma mammario, della testa e collo, lesioni pre-neoplastiche della cervice e il colangiocarcinoma (Yanamoto et al., 2006; Ensiger et al., 2006; Gosens et al., 2007; Ruck et al., 2000; Brunner et al., 2008). Tuttavia, il ruolo di Ep-CAM nella tumorigenesi non è del tutto chiaro. Nel carcinoma laringeo, l'assenza di Ep-CAM si correla a un significativo aumento del numero di metastasi linfonodali. Ensiger et al. (2006) hanno dimostrato che la perdita dell'espressione di Ep-CAM è significativamente correlata alla dedifferenziazione dei carcinomi tiroidei. Nel carcinoma mammario, alti livelli di Ep-CAM si collegano con la maggiore

dimensione tumorale e con la presenza di metastasi linfonodali. Nel carcinoma a cellule transizionale della pelvi renale, il numero di cellule che esprimono EpCAM correla direttamente al grado tumorale e alla presenza di metastasi linfonodali (Brunner et al., 2008a); nel carcinoma uroteliale della vescica, l'iperespressione di EpCAM correla a una prognosi sfavorevole, alla dedifferenziazione tumorale e un stadio avanzato (Brunner et al., 2008b).

Nel fegato embrionario gli epatociti esprimono Ep-CAM mentre nel fegato adulto, solo i dotti biliari risultano positivi. Nel fegato cirrotico, Ep-CAM viene espresso dai dotti biliari proliferanti, che si pensa originino delle cellule progenitrici epatiche (HPC). Studi hanno recentemente identificato il TACSTD1, gene che codifica Ep-CAM, come potenziale biomarcatore dell'epatocarcinoma. Si stima che fino al 35% degli HCC esprimano Ep-CAM (Yamashita et al., 2008; Ruck et al., 2000). Tuttavia solo i casi in cui tale espressione è correlata alla presenza di  $\alpha$ -fetoproteina (AFP) sono stati ipotizzati derivare di cellule staminali/progenitrici epatiche.

### **3.4 ALTRI MARCATORI**

Recentemente, alcuni marcatori sono stati dimostrati come utili alla diagnosi differenziale tra le lesioni precancerose e l'HCC, ad esempio la glutammina sintetasi, il glipican 3 e l'HSP70, che sono iperespressi nell'HCC. Quindi, abbiamo deciso di inserire questi 3 biomarcatori in questo studio per valutare la loro eventuale correlazione con la prognosi dei pazienti.

#### **3.4.1 Glutammina sintetasi**

La glutammina sintetasi (GS) catalizza la sintesi di glutammine, attività esclusiva degli epatociti attorno alle venule epatiche nei murini e nel fegato umano. Si sa che la glutammina, il prodotto finale della attività della GS, è una delle principali fonti di energia di epatociti anossici nonché di epatociti tumorali. Dati di carcinogenesi sperimentale indicano che l'espressione immunohistochimica di GS possa tracciare l'ontogenesi delle cellule tumorali. Studi hanno documentato un aumento progressivo nella immunoreattività della GS dalle lesioni precancerose agli HCC precoci e da questi alle lesioni avanzate, ciò che suggerisce che la GS abbia un ruolo nella promozione del HCC con potenziale metastatico (Di Tommaso et al., 2007).

### **3.4.2 Glipican 3**

Glipican 3 (GPC3) é un componente della famiglia del proteoglicano eparin-sulfato che si lega alla superficie cellulare mediante un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo. Studi suggeriscono che GPC3 abbia un ruolo negativo della proliferazione cellulare, agendo come induttore della apoptosi in alcuni tessuti specifici. Il gene é frequentemente metilato in diversi tumori e nelle cellule, fatto che suggerisce un ruolo di soppressione tumorale nel processo della tumorigenesi. Tuttavia, GPC3 è iperespresso nell'HCC tanto a livello del mRNA quanto a livello proteico.

### **3.4.3 *Heat shock protein 70* (Hsp70)**

La maggioranza dei casi di HCC sono associati a un'epatopatia cronica HBV- o HCV-correlata e il processo di infiammazione cronica e fibrosi agisce come fattore di stress, portando alla sintesi di Hsp (*heat shock proteins*). Hsp70 appartiene a una classe di geni coinvolti nel processo della tumorigenesi, nella regolazione della progressione del ciclo cellulare e nella apoptosi. Hsp70, in particolare, insieme alla Hsp27, è un potente antiapoptotico e la sua iperespressione permette la sopravvivenza cellulare in condizioni di stress. Di recente è stato segnalato come questo gene e la proteina da esso prodotta risultino iperespressi negli HCC, contrariamente a quanto accade nelle lesioni precancerose (Chuma et al., 2003; Di Tommaso et al., 2007).

## 4. SCOPO DEL LAVORO

Il presente lavoro ha valutato su 2 *microarray* tissutali (TMA) di HCC, uno HCV-correlato (*western array*) e l'altro HBV-correlato (*eastern array*), l'espressione fenotipica di alcuni presunti biomarcatori di aggressività tumorale quali EpCAM, PAK1, CK19,  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina, LAMA3, Osteopontina, Ep-CAM, GS, HSP70 e GPC3. L'obiettivo dello studio è individuare un profilo fenotipico capace di predire il comportamento biologico della malattia, discriminando fra i pazienti ad alto rischio di recidiva e con prognosi sfavorevole e quelli con comportamento meno aggressivo. L'ipotesi è che tale pannello possa essere utilizzato su preparati bioptici pre-operatori così da guidare in maniera "personalizzata" la scelta terapeutica .

## 5. MATERIALE E METODI

### 5.1 CASISTICA

La casistica oggetto di studio è costituita da 234 casi di HCC asportati chirurgicamente, provenienti dalla Unità Operativa di Anatomia Patologica (Direttore prof. M. Roncalli) dell'Istituto Clinico Humanitas (n° 98) e dal Dipartimento di Patologia (Direttrice prof. Y.N. Park) della South Korea Yonsey University (n° 136).

Tra i criteri clinici e patologici sono stati considerati l'età ed il sesso dei pazienti, l'eziologia, la dimensione dei noduli (<3cm vs. >3cm.), la multifocalità, le metastasi intraepatiche, il grado (sec. Edmondson-Steiner) e lo stadio tumorale (TNM, VI edizione, 2002), la presenza di angioinvasione microscopica e di macroinvasione vascolare (documentata dalla radiologia e/o dall'esame macroscopico), la sopravvivenza globale (OS) e la sopravvivenza libera da malattia (DFS). Criterio di inclusione è stato infatti la disponibilità del *follow up* dei pazienti. Le caratteristiche clinico-patologiche delle 2 casistiche sono riportate sulla Tabella 1.

I seguenti criteri sono stati impiegati per accertare la presenza di metastasi intraepatiche: noduli apparentemente originati da un trombo tumorale della vena porta e/o noduli satelliti in prossimità al nodulo tumorale maggiore e/o identica istologia nel nodulo maggiore ed in quelli minori (Chuma et al., 2004). Per converso sono considerate come multicentriche le neoplasie multiple con istologia nettamente distinta e/o con componente di tipo early (Masamichi and Roskam, 2005).

**Tabella 1:** Caratteristiche clinico-patologiche delle due casistiche

	CASISTICA OCCIDENTALE	CASISTICA ORIENTALE
N	98	136
Età	66,86 ± 8,62	53,02 ± 9,44
Sesso (F)	19 (19,39%)	27 (19,85%)
eziologia		
HCV	56 (57,14%)	8 (5,88%)
HBV	22 (22,45%)	104 (76,47%)
Non virale	20 (20,41%)	10 (7,35%)
Dim. nod. <3 cm.	43 (44,79%)	27 (20,00%)
Multinodularità	38 (38,78%)	10 (7,35%)
Metastasi intraepatica	24 (24,49%)	22 (16,18%)
Grado		
G1	16 (16,33%)	1 (0,74%)
G2	45 (45,92%)	57 (41,91%)
G3	37 (37,76%)	78 (57,35%)
T 3 – 4	16 (16,32%)	21 (15,44%)
Angioinvasività (micro)	31 (31,63%)	82 (60,29%)
Angioinvasività (macro)	24 (24,49%)	15 (11,03%)
Overall survival		
Mediana tempo, range	25, 1 – 117	30, 0 – 126
Disease free survival		
Mediana tempo, range	19,5, 1 – 69	13, 0 – 126

## 5.2 MICROARRAY TISSUTALE

I casi di HCC selezionati sulla base della disponibilità di follow up presso le due differenti istituzioni sono stati rivisti così da definire in maniera univoca le caratteristiche patologiche delle lesioni. Di ciascuna lesione è stato selezionato un blocchetto rappresentativo della lesione e del tessuto non neoplastico adiacente per l'allestimento del microarray. Da ciascun caso sono state effettuate 4 punzature di 0,6 mm (casistica occidentale) e 3 punzature da 2 mm (casistica orientale). In questo modo sono stati allestiti un microarray di 4 blocchetti nella casistica occidentale (*western array*) ed uno da 9 blocchetti nella casistica orientale (*eastern array*) .



### 5.3 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

Le sezioni di tessuto microarray sono state immunocolorate con gli anticorpi elencati nella Tabella 2 secondo procedure routinarie.

Tabella 2: Immunoistochimica

	<b>Origine</b>	<b>Prodotti in</b>	<b>DILUIZ.</b>	<b>PRE-TRATTAMENTO</b>	<b>Sistema di rivelazione</b>
<b>LAMA 3</b>	Sigma-Aldrich	rabbit/ p	1:100,	Citrato pH=6, 98°C, 30 minuti	ENVISION DAKO
<b>OSTEOP.</b>	Novus B.	rabbit/p	1:2000,	nessuno	ENVISION DAKO
<b>A-TUB</b>	Novus B.	rabbit/p	1:400	Citrato pH=6, 98°C, 30 minuti	ENVISION DAKO
<b>B-TUB</b>	Novus B.	rabbit/p	1:400	Citrato pH=6, 98°C, 30 minuti	ENVISION DAKO
<b>EPCAM</b>	Thermo Scientific	mouse/m	1:800	Pepsina 0,4% in HCl 0,01 M, 40°C, 10 minuti	ENVISION DAKO
<b>PAK 1</b>	ABCAM	rabbit/p	1:100	Citrato pH=6, 98°C, 30 minuti	ENVISION DAKO
<b>HSP 70</b>	Santa cruz	mouse/m	1:100	Citrato pH=6, 98°C, 30 minuti	ENVISION DAKO
<b>GS</b>	Chemicon	mouse/ m	1:500	Citrato pH=6, 98°C, 30 minuti	ENVISION DAKO
<b>GPC 3</b>	Biomosaic	mouse/m	1:5000	Citrato pH=6, 98°C, 30 minuti	ENVISION DAKO
<b>CK 19</b>	Dako	mouse/m	1:100	Pepsina 0,4% in HCl 0,01 M, 40°C, 10 minuti	ENVISION DAKO

## 5.4 MODALITÀ DELLA VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA

Per quanto attiene la valutazione della immunoreattività (IR) questa è stata effettuata con una analisi microscopica non automatizzata di ogni singolo spot. Di ciascun caso sono state valutate la percentuale di cellule IR [0% (0); 1-10% (1+), >10% (2+)] e, laddove presente, la intensità della immunoreazione [debole (1+), forte (2+)]. Sono stati considerati come iperespressi quei casi in cui la somma del punteggio di ciascun parametro fosse  $\geq 3$ . Per converso sono stati considerati come negativi i casi con punteggio compreso fra 0 e 2.

## 5.5 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita con il programma Stata10 ([www.stata.com](http://www.stata.com)). I dati sono stati presentati come media e deviazione standard, o mediana e range, o numero e percentuale, ove appropriato. Le differenze nelle popolazioni sono state esplorate attraverso il test  $\chi^2$  con correzione di Fisher ove necessario, o con il t-test, ove appropriato.

L'analisi dei fattori prognostici per la sopravvivenza globale e per quella libera da malattia è stata eseguita attraverso una regressione univariata di Cox. Tutte le variabili che avevano un livello di significatività  $p < 0.1$  nella analisi univariata sono state considerate candidate per l'analisi di regressione multivariata stepwise di Cox. Prima di effettuare l'analisi di regressione di Cox è stata verificata la correlazione fra le variabili e variabili altamente correlate non sono state inserite contemporaneamente nell'analisi multivariata di Cox. Il riscontro di un unico biomarcatore o di una combinazione di espressione di biomarcatori è stata statisticamente correlata a parametri di prognosi sfavorevole (ricidiva, metastasi intra- e extraepatica, overall survival e disease-free survival) in analisi univariata e multivariata, prendendo in considerazione gli attuali fattori prognostici dell'epatocarcinoma (dimensione tumorale, grado tumorale, stadio, angioinvasione).

## 6. RISULTATI

### 6.1 Differenze clinico-patologiche tra le due casistiche

La Tabella 1 illustra i differenti aspetti clinico-patologici delle due casistiche. Brevemente nella casistica occidentale i pazienti hanno una età maggiore ed una prevalenza di HCV come fattore eziologico (57,14%); i tumori hanno dimensioni minori e risultano meglio differenziati, la malattia tuttavia è più frequentemente multifocale e presenta una più elevata ma non significativa percentuale di metastasi intraepatiche. Nella casistica orientale, al contrario, i pazienti sono più giovani e prevale il virus dell'epatite B come fattore eziologico (76,47%); i noduli hanno dimensioni maggiori e appaiono morfologicamente meno differenziati. Come atteso, in entrambe le casistiche, l'HCC prevale nei pazienti di sesso maschile.

**Tabella 1:** Caratteristiche clinico-patologiche delle due casistiche

	CASISTICA OCCIDENTALE	CASISTICA ORIENTALE	P
N	98	136	
Età	66,86 ± 8,62	53,02 ± 9,44	0.001
Sesso (F)	19 (19,39%)	27 (19,85%)	-
Eziologia			0.001
HCV	56 (57,14%)	8 (5,88%)	
HBV	22 (22,45%)	104 (76,47%)	
Non virale	20 (20,41%)	10 (7,35%)	
Dim. nod. <3 cm.	43 (44,79%)	27 (20,00%)	0.001
Multinodularità	38 (38,78%)	10 (7,35%)	0.001
Metastasi intraepatica	24 (24,49%)	22 (16,18%)	-
Grado			0.001
G1	16 (16,33%)	1 (0,74%)	0.001
G2	45 (45,92%)	57 (41,91%)	-
G3	37 (37,76%)	78 (57,35%)	0.004
T 3 – 4	16 (16,32%)	21 (15,44%)	-
Angioinvasività (micro)	31 (31,63%)	82 (60,29%)	0.001
Angioinvasività (macro)	24 (24,49%)	15 (11,03%)	0,003
Overall survival mediana tempo, range	25, 1 – 117	30, 0 – 126	-
Disease free survival Mediana tempo, range	19,5, 1 – 69	13, 0 – 126	-

Nonostante queste differenze, le curve di *overall survival* (OS) e *disease free survival* (DFS) hanno un andamento sovrapponibile e comunque privo di differenze significative (Figura 1a e 1b).

Figura 1a: Overall Survival

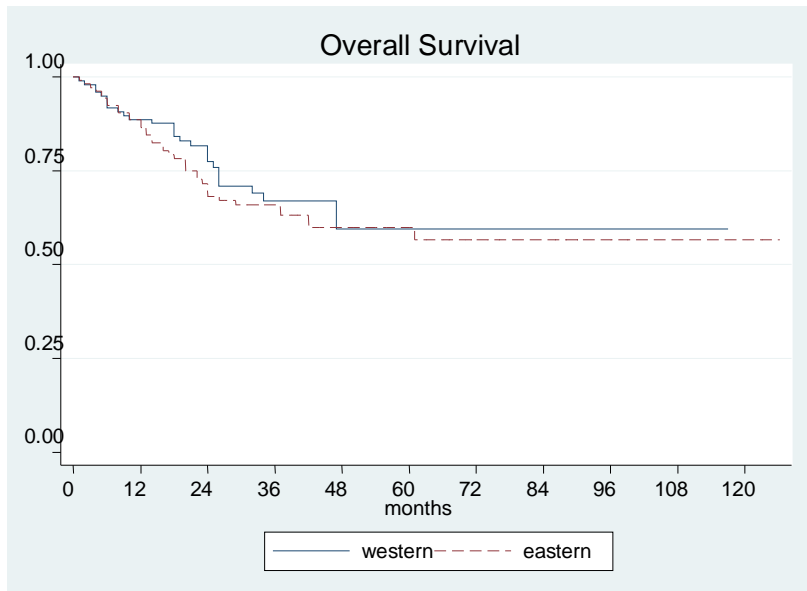
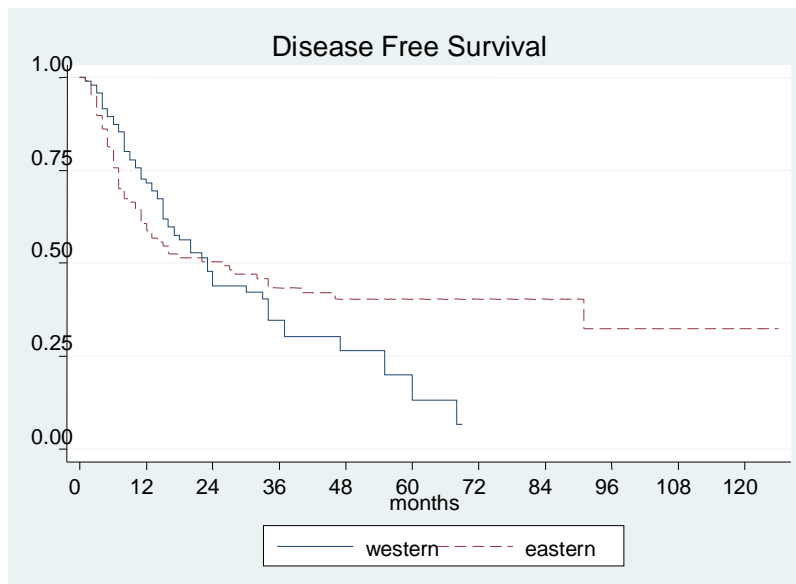


Figura 1b: Disease free survival



p = 0,42

La Tabella 3 illustra come i diversi parametri clinico-patologici influiscano sulla OS nelle due casistiche. In maggior dettaglio nella casistica occidentale, i fattori che influiscono negativamente sono: la dimensione del tumore (> cm. 3), la presenza di metastasi intraepatica, la dedifferenziazione tumorale, lo stadio avanzato della malattia e la presenza di microinvasione e di macroinvasione vascolare [analisi univariata]; la dedifferenziazione e la presenza di macroinvasione vascolare [analisi multivariata]. Nella casistica orientale sono parametri correlati negativamente con la sopravvivenza: il sesso, la dimensione dei noduli (> cm. 3), la dedifferenziazione tumorale, lo stadio più avanzato della malattia e la macroinvasione vascolare [analisi univariata]; il sesso, la dimensione del tumore e la macroinvasione vascolare [analisi multivariata].

**Tabella 3:** Parametri clinico patologici influenti sulla *Overall Survival*

<b>OVERALL SURVIVAL</b>				
	<b>Occidente</b>		<b>Oriente</b>	
	<b>Univariata</b>	<b>Multivariata</b>	<b>Univariata</b>	<b>Multivariata</b>
<b>Sesso (F)</b>	-	-	0,045	0,039
<b>Dim noduli &lt;3 cm.</b>	0,099	-	0,033	0,019
<b>Metastasi intraepatica</b>	0,057	-	-	-
<b>Grado</b>	0,008	0,006	0,030	-
<b>T 3-4</b>	0,002	-	0,010	-
<b>Angio invasione (micro)</b>	0,005	-	-	-
<b>Angio invasione (macro)</b>	0,006	0,011	0,003	0,003

La Tabella 4 illustra come i diversi parametri clinico-patologici influiscano sulla DFS nelle due casistiche. Nella casistica occidentale, i fattori che influiscono negativamente sono la presenza di metastasi intraepatica, la dedifferenziazione tumorale, lo stadio avanzato della malattia e l'eziologia (HCV) [analisi univariata]; la dedifferenziazione tumorale, lo stadio più avanzato della malattia e l'eziologia (HCV) [analisi multivariata]. Nella popolazione orientale sono il sesso, la presenza di metastasi intraepatica, la dedifferenziazione tumorale e la presenza di angioinvasione macrovascolare [analisi univariata]; angioinvasione macrovascolare [analisi multivariata].

**Tabella 4:** Parametri clinico patologici influenti sulla *Disease Free Survival*.

#### DISEASE FREE SURVIVAL

	Occidente		Oriente	
	Univariata	Multivariata	Univariata	Multivariata
<b>Sesso (F)</b>	-	-	0,070	-
<b>Metastasi intraepatica</b>	0,047	-	0,039	-
<b>Grado</b>	0,008	0,021	0,059	-
<b>T 3-4</b>	0,001	0,001	-	-
<b>Angioinvasione (macro)</b>	-	-	0,001	0,001
<b>Eziologia HCV</b>	0,051	0,008	-	-

## 6.2 Analisi dei biomarcatori

### 6.2.1 Marcatori di adesione cellulare

#### 6.2.1.1 LAMA3

LAMA3 è iperespresso nel 18,4% [casistica occidentale] e nel 18,2% [casistica orientale] degli HCC. L'anticorpo mostra IR di membrana e di citoplasma, come illustra la Figura 2a. Nel fegato non tumorale, abbiamo riscontrato un'espressione nel 9,2% (casistica occidentale) e nel 0,9% (casistica orientale) degli epatociti. Si osserva inoltre una positività dei dotti biliari e delle cellule ovali perisettali, elementi che abbiamo usato come controllo positivo. Nella casistica orientale si è osservata positività degli epatociti perisettali (Figura 2b).

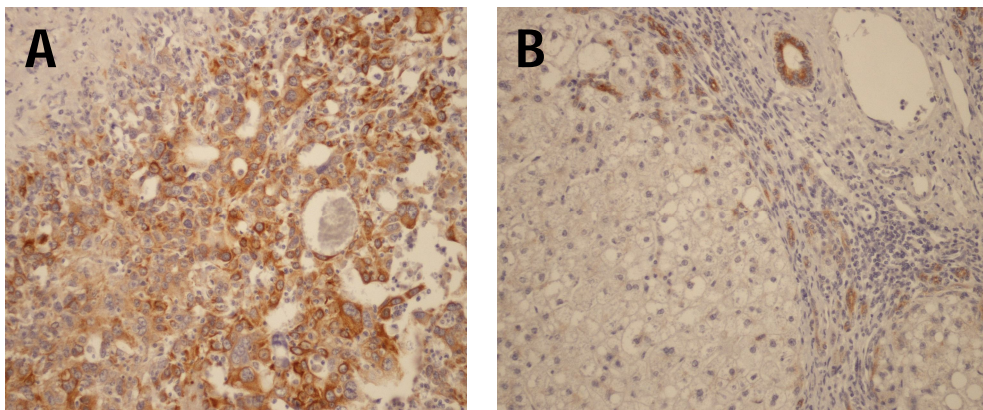


Figura 2. In (A) , HCC, IR di membrana e citoplasma (20x); in (B), fegato non tumorale, dotti biliari positivi, controllo interno (20x).

Il LAMA3 non mostra correlazioni statisticamente significative.

### 6.2.1.2 Osteopontina

L'OPN è iperespressa nel 9,3% [casistica occidentale] e nel 16,2% [casistica orientale] degli HCC. L'anticorpo mostra un'immunoreattività di citoplasma, come illustra la Figura 3. Nel fegato non tumorale, abbiamo riscontrato un'espressione nel 1,1% (casistica occidentale) e nel 0,8% (casistica orientale) degli epatociti e nel tessuto fibroso dei setti.

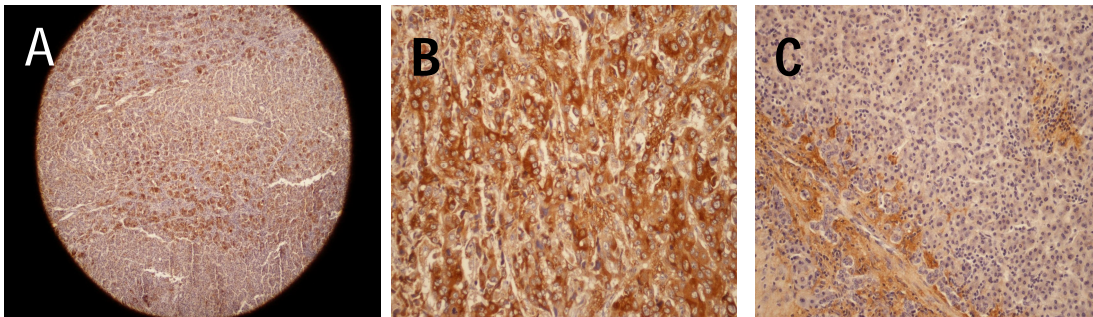


Figura 3. In (A) e (B), HCC, IR citoplasmatica all'OPN (4x, 20x); in (C), HCC non reattivo all'OPN (20x)

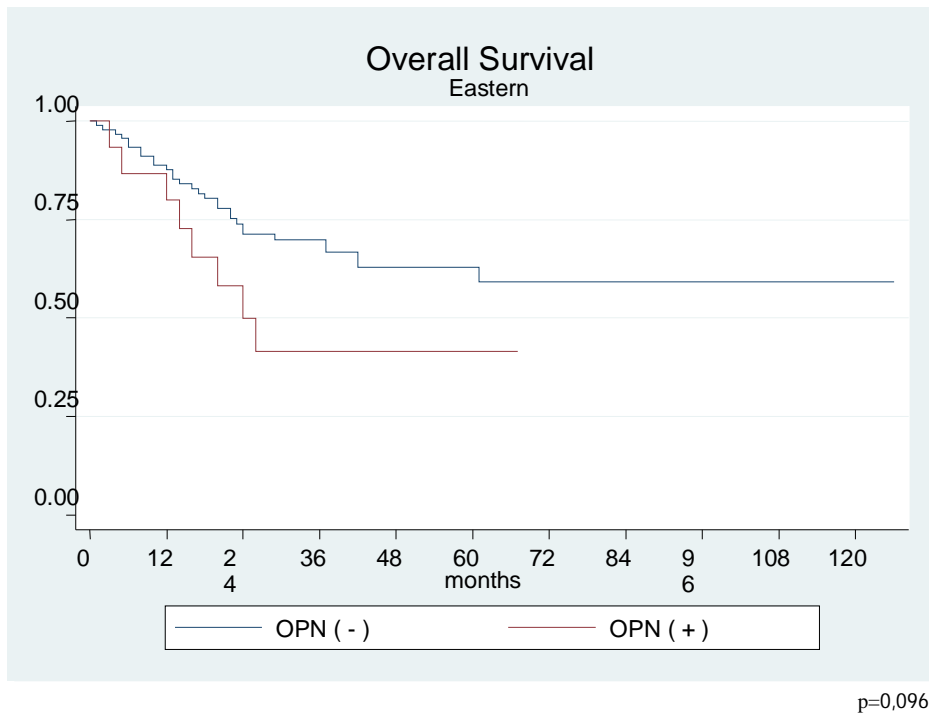
La Tabella 5 mostra come l'iperespressione di OPN si correli con alcuni parametri clinico-patologici delle due casistiche. Nella sola casistica orientale si è osservata una correlazione con l'età ( $p=0,041$ ), lo stadio di malattia avanzato ( $p=0,045$ ), l'angioinvasività ( $p=0,057$ ), l'eziologia da virus C ( $p=0,047$ ) e OS ( $p=0,096$ ) (Figura 4).



**Tabella 5:** Iperespressione di Osteopontina

OSTEOPONTINA	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Negativi	Positivi		Negativi	Positivi	
N	88	9		114	22	
Età	66,9 ± 8,5	66,7 ± 10,7	-	52,2 ± 9,3	56,8 ± 9,2	0,041
Sesso (F)	18 (20,45%)	1 (11,11%)	-	24 (22,02%)	3 (13,64%)	-
Eziologia			-			0,047
Hbv	21 (23,86%)	0 (0,00%)		88 (87,13%)	16 (76,19%)	
Hcv	48 (54,55%)	8 (88,89%)		4 (3,96%)	4 (19,05%)	
Non virale	19 (21,59%)	1 (11,11%)		9 (8,91%)	1 (4,74%)	
Dim. nod. <3 cm.	38 (44,19%)	5 (55,56%)	-	20 (17,70%)	7 (31,82%)	-
Multinodularità	41 (46,59%)	3 (33,33%)	-	8 (7,02%)	2 (9,09%)	-
Metastasi intraepatica	21 (26,92%)	2 (25,00%)	-	20 (17,54%)	2 (9,09%)	-
Grado			-			-
G1	15 (17,05%)	1 (11,11%)		1 (0,88%)	0 (0,00%)	
G2	38 (43,18%)	6 (66,67%)		45 (39,47%)	12 (54,55%)	
G3	35 (39,77%)	2 (22,22%)		68 (59,65%)	10 (45,45%)	
T 3 - 4	15 (17,05%)	1 (11,11%)	-	14 (12,84%)	7 (33,33%)	0,045
Angioinvasività (micro)	28 (32,56%)	3 (33,33%)	-	73 (64,04%)	9 (40,91%)	0,057
Angioinvasività (macro)	21 (23,86%)	3 (33,33%)	-	11 (9,65%)	4 (18,18%)	0,265
Overall survival Mediana, range	25, 1 - 117	23, 15 - 68	-	33, 0 - 126	21, 2 - 67	0,096
Disease free survival Mediana, range	19,5, 1 - 69	18, 5 - 55	-	14, 0 - 126	9, 2 - 67	-

Figura 4. Casistica orientale: Osteopontina e OS



## 6.2.2 Marcatori di motilità cellulare

### 6.2.2.1 Pak1 (*p21-activated kinase 1*)

Pak1 è iperespresso nel 20% [casistica occidentale] e nel 10,7% [casistica orientale] degli HCC, mostra un'immunoreattività nucleare, come illustra la Figura 5. Nel fegato non tumorale, abbiamo riscontrato un'espressione nel 7,1% nella sola casistica occidentale.

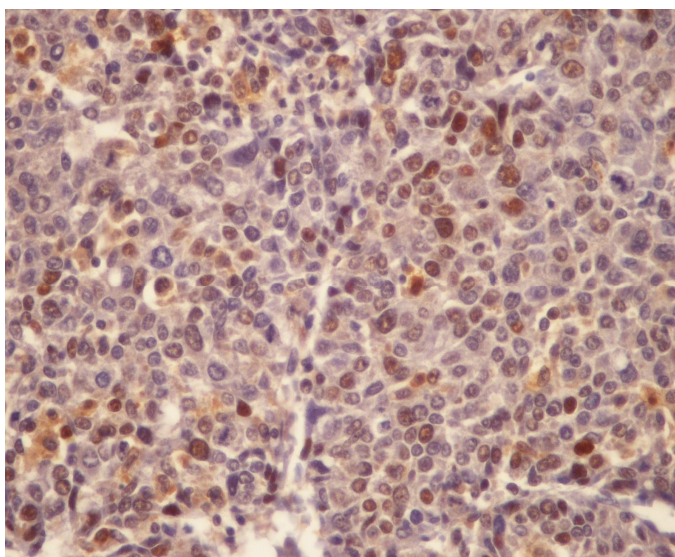


Figura 5. HCC, IR di Pak1, positività nucleare, 40x

La Tabella 6 illustra come l'iperpressione di Pak1 correli con alcuni parametri clinico-patologici delle due casistiche. Nella casistica occidentale, si è osservata una correlazione con il sesso ( $p=0,008$ ), la multinodularità ( $p=0,076$ ) e la dedifferenziazione tumorale mentre nella sola casistica orientale si è messa in evidenza una correlazione con l'angioinvasione macrovascolare ( $p=0,034$ ), con OS ( $p=0,003$ ) e con la DFS ( $p=0,066$ ) (Figura 6a e 6b).

**Tabella 6:** Iperespressione di Pak1.

PAK1	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Negativi	Positivi		Negativi	Positivi	
N	76	19	-	108	13	
Età	67,2 ± 8,5	65,8 ± 9,2	-	53,0 ± 9,5	54,5 ± 9,7	-
Sesso (F)	10 (13,16%)	8 (42,11%)	0,008	24 (23,08%)	2 (15,38%)	-
Eziologia			-			-
Hbv	16 (21,05%)	5 (26,32%)		84 (85,71%)	9 (81,82%)	
Hcv	42 (55,26%)	12 (63,16%)		6 (6,12%)	1 (9,09%)	
Dim. nod. <3 cm.	34 (45,95%)	8 (42,11%)	-	24 (22,43%)	1 (7,69%)	-
Multinodularità	38 (50,00%)	5 (26,32%)	0,076	8 (7,41%)	2 (15,38%)	-
Metastasi intraepatica	19 (28,79%)	3 (16,67%)	-	17 (15,74%)	3 (23,08%)	-
Grado			0,012			-
G1	15 (19,74%)	1 (5,26%)		1 (0,93%)	0 (0,00%)	
G2	38 (50,00%)	5 (26,32%)		50 (46,30%)	3 (23,08%)	
G3	23 (30,26%)	13 (68,42%)		57 (52,78%)	10 (76,92%)	
T 3 – 4	13 (17,11%)	1 (5,26%)	-	14 (13,59%)	3 (23,08%)	-
Angioinvasività (micro)	22 (29,33%)	7 (38,89%)	-	62 (57,41%)	10 (76,92%)	-
Angioinvasività (macro)	18 (23,68%)	5 (26,32%)	-	9 (8,33%)	4 (30,77%)	0,034
Non virale	18 (23,68%)	2 (10,53%)		8 (8,16%)	1 (9,09%)	
Overall survival Mediana, range	26, 5 – 117	23, 1 – 86	-	34, 0 – 126	14, 1 – 60	0,003
Disease free survival Mediana, range	20, 2 – 69	16, 1 – 60	-	18, 0 – 126	4,5, 1 – 60	0,066

Figura 6a. Casistica orientale: Pak1 e OS.

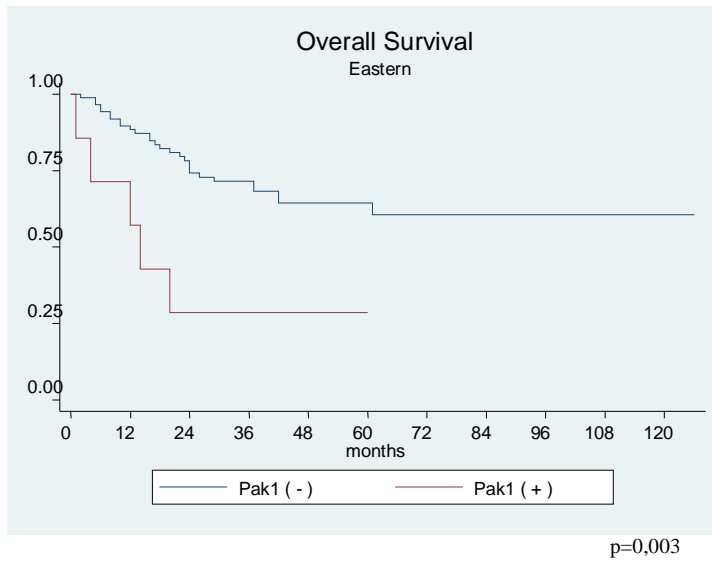
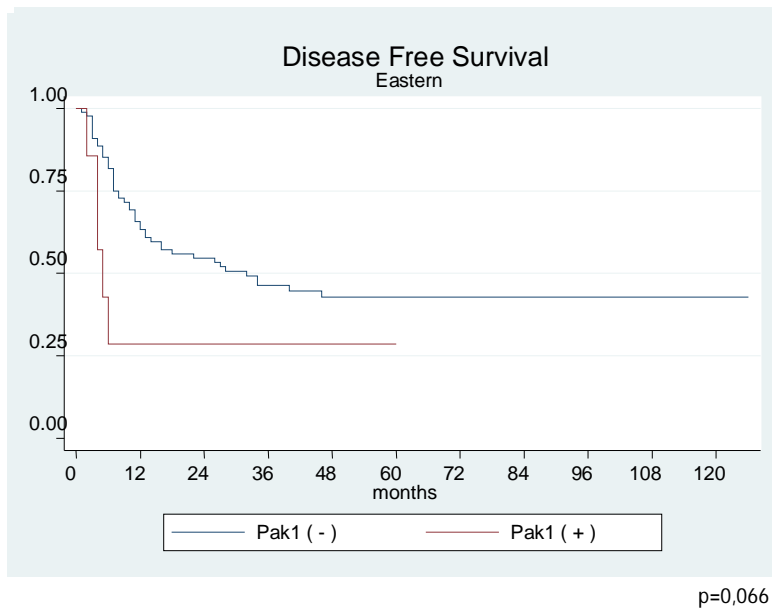


Figura 6b. Casistica orientale: Pak1 e DFS.



#### 6.2.2.2 $\alpha$ -tubulina

$\alpha$ -tubulina è iperespressa nel 17,3% [casistica occidentale] e nel 17,8% [casistica orientale] degli HCC. L'anticorpo mostra una diffusa immunoreattività (IR) citoplasmatica, come illustra la Figura 7a. Nel fegato non tumorale, gli epatociti sono prevalentemente negativi [4,7% (casistica occidentale); 3,1% (casistica orientale)], mentre risultano positivi, e quindi possono essere considerati come controllo interno, i nervi, i dotti biliari, l'endotelio dei capillari dei tratti portalì ed i sinusoidi (Figura 7b).

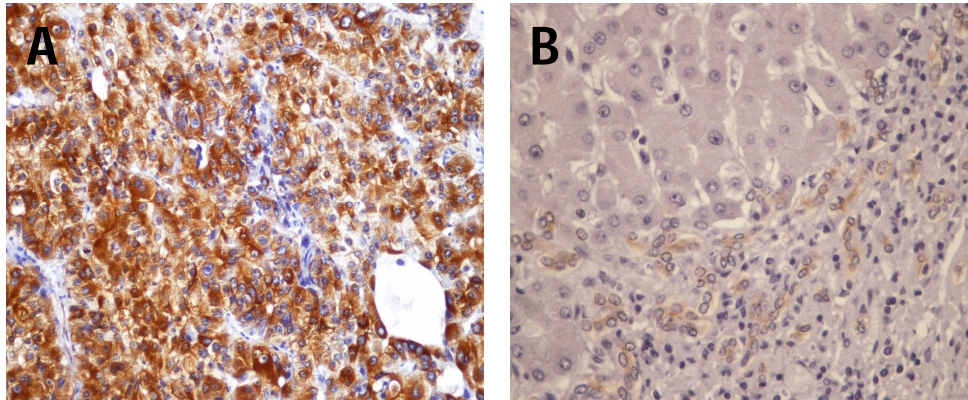


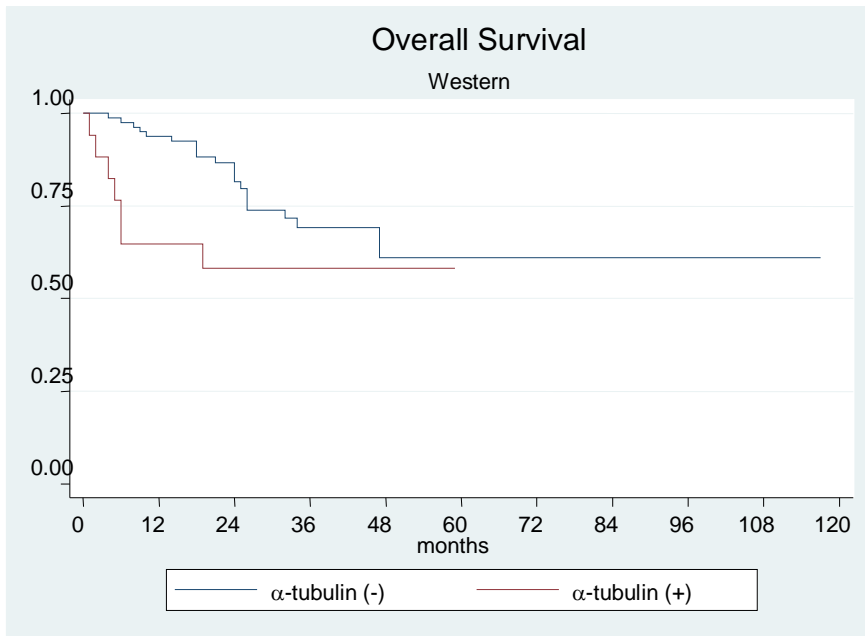
Fig. 7: Immunoreattività (IR) all' $\alpha$ -tubulina. In (A), HCC con diffusa IR citoplasmatica all' $\alpha$ -tubulina (20x); in (B), fegato non tumorale con parenchima non immunoreattivo e con dotti biliari positivi, (controllo interno) (20x).

La Tabella 7 illustra come l'iperpressione di  $\alpha$ -tubulina correli con i diversi parametri clinico-patologici nelle due casistiche. In entrambe si è osservata una correlazione tra iperpressione e ridotta differenziazione tumorale ( $p=0,051$ ,  $p=0,048$ ) mentre nella sola casistica occidentale è stata messa in evidenza una correlazione con l'angioinvasività microvascolare ( $p=0,083$ ), OS ( $p=0,052$ ) e DFS ( $p=0,032$ ) (Figura 8a e 8b) e nella sola casistica orientale una correlazione con una minore dimensione dei noduli tumorali ( $p=0,093$ ) e con la presenza di metastasi intraepatiche ( $p=0,072$ ).

**Tabella 7:** Iperpressione di  $\alpha$ -tubulina

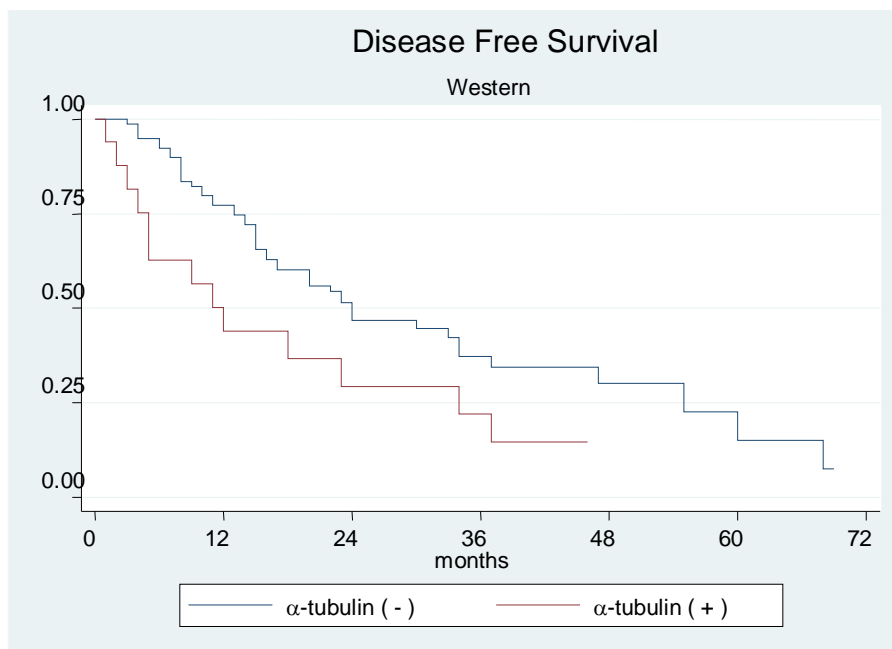
$\alpha$ TUBULINA	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Negativi	Positivi		Negativi	Positivi	
N	81	17		106	24	
Età	66,3 ± 9,1	69,3 ± 5,4	-	53,4 ± 9,2	51,5 ± 10,6	-
Sesso (F)	14 (17,28%)	5 (29,41%)	-	24 (22,64%)	3 (12,50%)	-
Eziologia			-			-
Hbv	19 (23,46%)	3 (17,65%)		86 (86,00%)	17 (80,95%)	
Hcv	43 (53,09%)	13 (76,47%)		7 (7,00%)	1 (4,76%)	
Non virale	19 (23,46%)	1 (5,88%)		7 (7,00%)	3 (14,29%)	
Dim. Nod. <3	34 (43,04%)	9 (52,94%)	-	19 (17,27%)	8 (33,33%)	0,093
Multinodularità	31 (38,27%)	7 (41,18%)	-	9 (8,11%)	1 (4,17%)	-
Metastasi intraepatica	19 (26,76%)	5 (31,25%)	-	15(13,51%)	7 (29,17%)	0,072
Grado			0,051			0,048
G1	15 (18,52%)	1 (5,88%)		1 (0,90%)	0 (0,00%)	
G2	40 (49,38%)	5 (29,41%)		51 (45,95%)	5 (20,83%)	
G3	26 (32,10%)	11 (64,71%)		59 (53,15%)	19 (79,17%)	
T 3-4	13 (16,05%)	3 (17,65%)	-	16 (15,24%)	5 (20,83%)	-
Angioinvasività (micro)	22 (27,85%)	9 (52,94%)	0,083	66 (59,46%)	15 (62,50%)	-
Angioinvasività (macro)	17(20,99%)	7 (14,18%)	-	12 (10,81%)	3 (12,50%)	-
Overall survival Mediana, range	26, 4 – 117	19, 1 - 59	0,052	30, 0 – 126	26, 3 – 88	-
Disease free survival Mediana, range	20, 3 – 69	11, 1 – 46	0,032	15, 0 – 126	8, 1 – 88	-

Figura 8a. Casistica occidentale:  $\alpha$ -tubulina e OS



p=0,052

Figura 8b. Casistica occidentale:  $\alpha$ -tubulina e DFS



p=0,032



### 6.2.2.3 $\beta$ -tubulina

La  $\beta$ -tubulina è iperespressa nel 25,5% [casistica occidentale] e nel 37,5% [casistica orientale] degli HCC. L'anticorpo mostra una diffusa IR citoplasmatica, come illustra la Figura 9a. Nel fegato non tumorale, gli epatociti sono prevalentemente negativi [5,8% (casistica occidentale); 2,5% (casistica orientale)] ed i controlli interni sono gli stessi della  $\alpha$ -tubulina (Figura 9b).

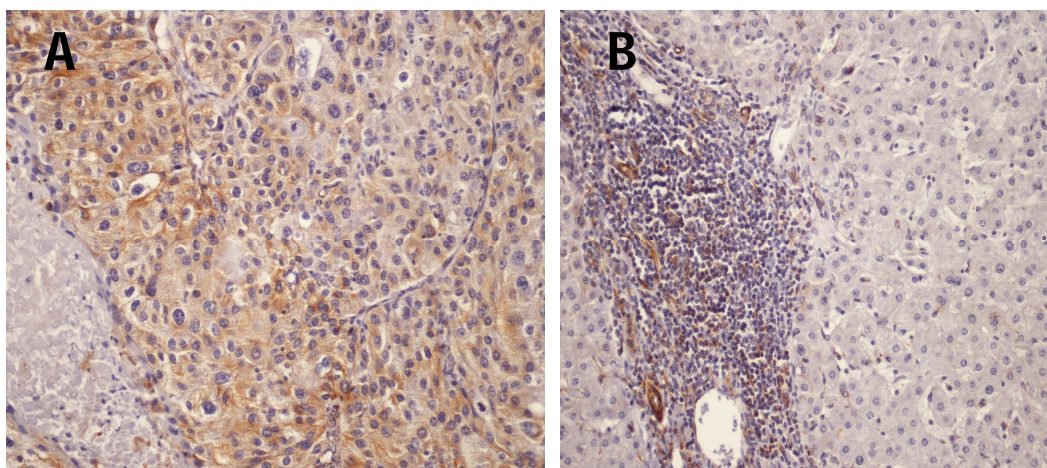


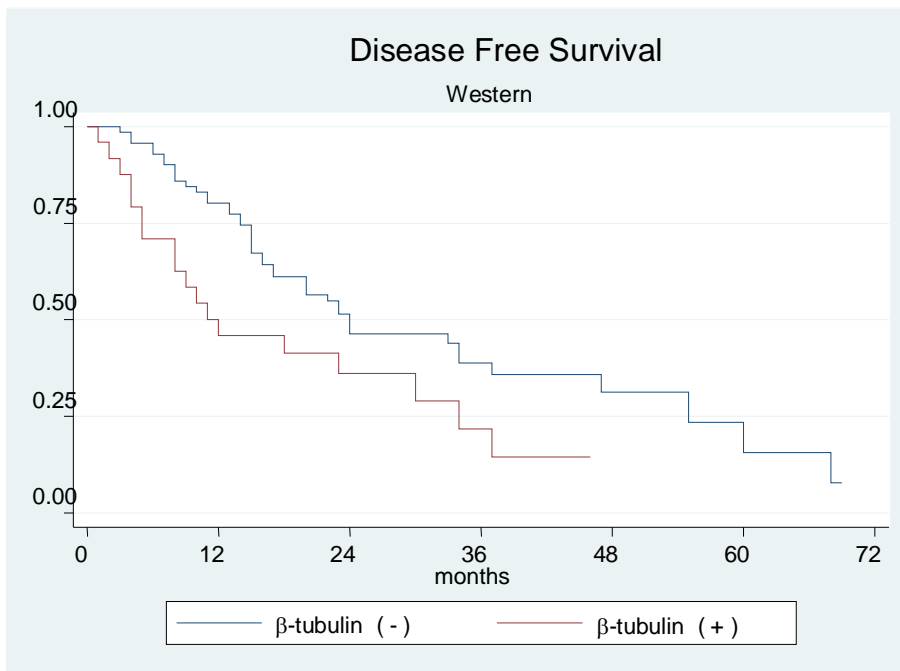
Figura 9. In (A), HCC immunoreattivo alla  $\beta$ -tubulina (40x); in (B), HCC non reattivo, si osservano alcuni dotti biliari circostanti positivi (20x).

La Tabella 8 illustra come l'iperpressione di  $\beta$ -tubulina correli con alcuni parametri clinico-patologici delle due casistiche. In entrambe si è osservata una correlazione con la DFS ( $p=0,028$ ,  $p=0,090$ ) (Figura 10a e 10b) mentre nella sola casistica occidentale si è messa in evidenza una correlazione con la dedifferenziazione tumorale ( $p=0,045$ ) e l'angioinvasività microvascolare ( $p=0,080$ ).

**Tabella 8: Iperespressione di  $\beta$ -tubulina**

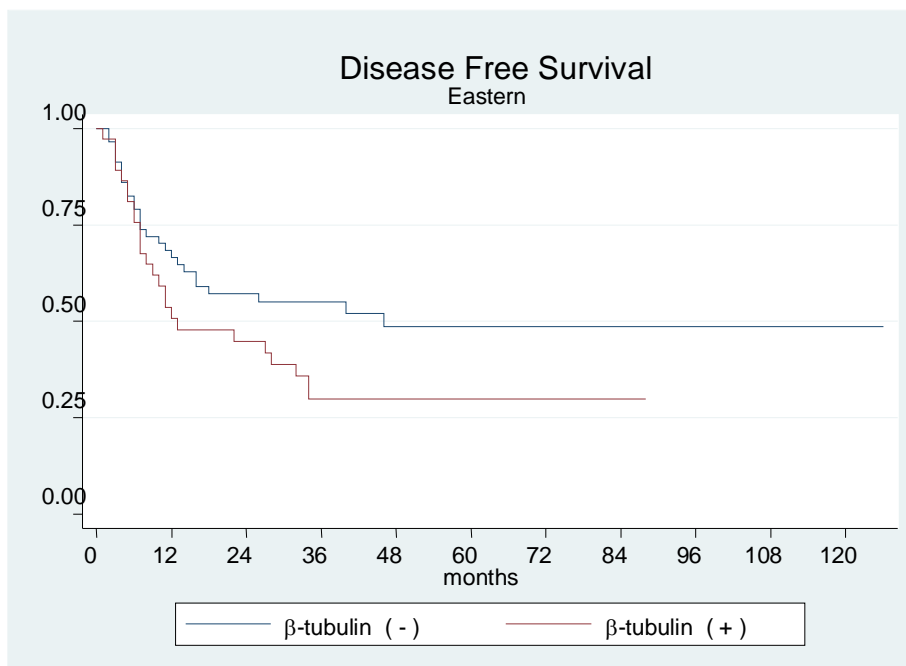
$\beta$ TUBULINA	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Negativi	Positivi		Negativi	Positivi	
N	73	25		73	43	
Età	66,3 $\pm$ 9,3	68,5 $\pm$ 5,9	-	53,7 $\pm$ 9,0	52,2 $\pm$ 10,4	-
Sesso (F)	13 (17,81%)	6 (24,00%)	-	16 (21,92%)	10 (23,26%)	-
Eziologia			-			-
Hbv	16 (21,92%)	6 (24,00%)		56 (82,35%)	36 (90,00%)	
Hcv	39 (53,42%)	17 (68,00%)		6 (8,82%)	1 (2,50%)	
Non virale	18 (24,66%)	2 (8,00%)		6 (8,82%)	3 (7,50%)	
Dim. nod. <3 cm.	29 (40,85%)	14 (56,00%)	-	14 (18,92%)	11 (24,44%)	-
Multinodularità	28 (38,36%)	10 (40,00%)	-	6 (8,00%)	4 (8,89%)	-
Metastasi intraepatica	15 (23,81%)	9 (37,50%)	-	12 (16,00%)	8 (17,78%)	-
Grado			0,045			-
G1	15 (20,55%)	1 (4,00%)		1 (1,33%)	0 (0,00%)	
G2	35 (47,95%)	10 (40,00%)		36 (48,00%)	17 (37,78%)	
G3	23 (31,51%)	14 (56,00%)		38 (50,67%)	28 (62,22%)	
T 3-4	13 (17,81%)	3 (12,00%)	-	9 (12,50%)	8 (18,60%)	-
Angioinvasività (micro)	19 (26,76%)	12 (48,00%)	0,080	44 (58,67%)	28 (62,00%)	-
Angioinvasività (macro)	15 (20,55%)	9 (36,00%)	-	8 (10,67%)	5 (11,11%)	-
Overall survival Mediana, range	26, 4 – 117	24, 1 - 59	-	32, 0 – 126	30, 5 – 88	-
Disease free survival Mediana, range	20, 3 – 69	11, 1 – 46	0,028	18, 0 – 126	12, 1 – 88	0,090

Figura 10a. Casistica occidentale:  $\beta$ -tubulina e DFS



p=0,028

Figura 10b. Casistica orientale:  $\beta$ -tubulina e DFS



p=0,090

#### 6.2.2.4 $\alpha + \beta$ -tubulina

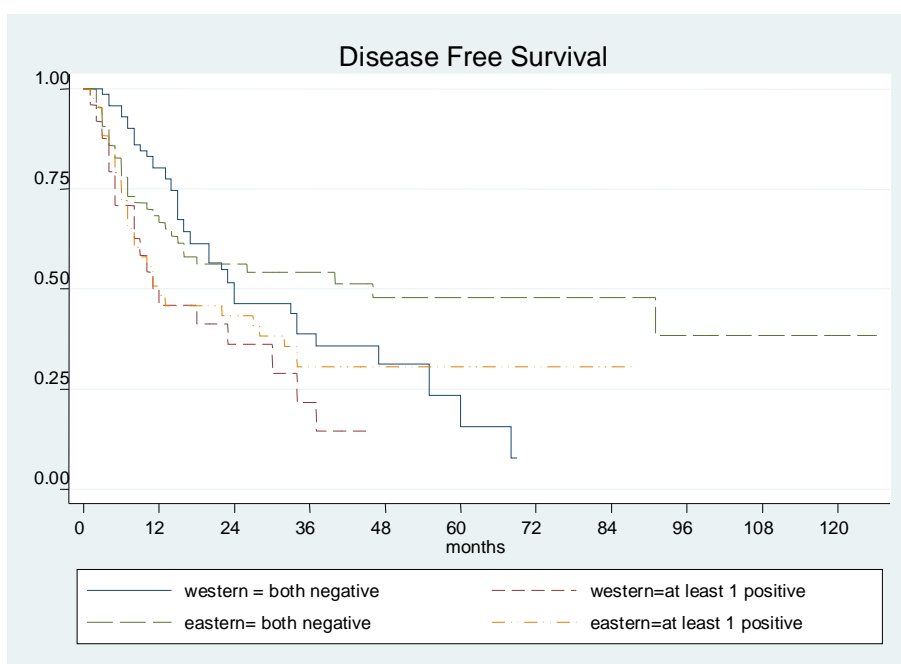
La Tabella 9 illustra come la combinazione di  $\alpha$ -tubulina e/o  $\beta$ -tubulina correli con i diversi parametri clinico-patologici delle due casistiche. In entrambe si è osservata una correlazione con la DFS ( $p=0,028$  e  $p=0,074$ ) mentre nella sola casistica occidentale si è dimostrata una correlazione statisticamente significativa con la dedifferenziazione tumorale ( $p=0,045$ ) e la presenza di angioinvasività microvascolare ( $p=0,051$ ).

**Tabella 9:** Combinazione di  $\alpha$ -tubulina e/o  $\beta$ -tubulina

$\alpha + \beta$	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Nessuno positivo	Almeno 1 positivo		Nessuno positivo	Almeno 1 positivo	
N	73	25		83	52	
Età	66,3 ± 9,3	68,5 ± 5,9	-	53,5 ± 8,7	52,3 ± 10,6	-
Sesso (F)	13 (17,81%)	6 (24,00%)	-	16 (20,00%)	11 (22,00%)	-
Eziologia			-			-
Hbv	16 (21,92%)	6 (24,00%)		63 (84,00%)	40 (86,96%)	
Hcv	39 (53,42%)	17 (68,00%)		6 (8,00%)	2 (4,35%)	
Non virale	18 (24,66%)	2 (4,00%)		6 (8,00%)	4 (8,70%)	
Dim. Nod. <3 cm.	29 (40,85%)	14 (56,00%)	-	13 (15,85%)	14 (26,92%)	-
Multinodularità	28 (38,36%)	10 (40,00%)	-	5 (6,02%)	5 (9,62%)	-
Metastasi intraepatica	15 (23,81%)	9 (37,50%)	-	12 (14,46%)	10 (19,23%)	-
Grado			0,045			-
G1	15 (20,55%)	1 (4,00%)		1 (1,20%)	0 (0,00%)	
G2	35 (47,95%)	10 (40,00%)		38 (45,78%)	18 (34,62%)	
G3	23 (31,51%)	14 (56,00%)		44 (53,01%)	34 (65,38%)	
T 3 – 4	13 (17,81%)	3 (12,00%)	-	11 (13,92%)	10 (20,00%)	-
M				1 (1,27%)	0 (0,00%)	-
Angioinvasività (micro)	19 (26,76%)	12 (48,00%)	0,051	49 (59,04%)	32 (61,54%)	-
Angioinvasività (macro)	15 (20,55%)	9 (36,00%)	-			
Overall survival Mediana, range	26, 4 – 117	24, 1 – 59	-	30,5, 0 – 126	27, 3 – 88	-
Disease free survival Mediana, range	20, 3 – 69	11, 1 – 46	0,028	16, 0 – 126	11, 1 – 88	0,074

Analizzando la Figura 11, si può constatare che i pazienti con HCC che esprimano almeno una delle due tubuline, tendono a ricadere più precocemente in confronto a quelli che non le esprimano.

Figura 11: Combinazione di  $\alpha$ - +/-  $\beta$ -tubulina e DFS



## 6.2.3 Marcatori di staminalità

### 6.2.3.1 Citocheratina 19

La CK19 è iperespressa nel 3,1% [casistica occidentale] e nel 11,7% [casistica orientale] degli HCC. Nei pochi casi immunoreattivi, si reperta un'intensa IR di membrana e citoplasmatica, come illustra la Figura 12a. Nel fegato non tumorale, gli epatociti sono negativi alla CK19, mentre, si osserva una intensa IR dei dotti biliari, utilizzati come controlli interni (Figura 12b).

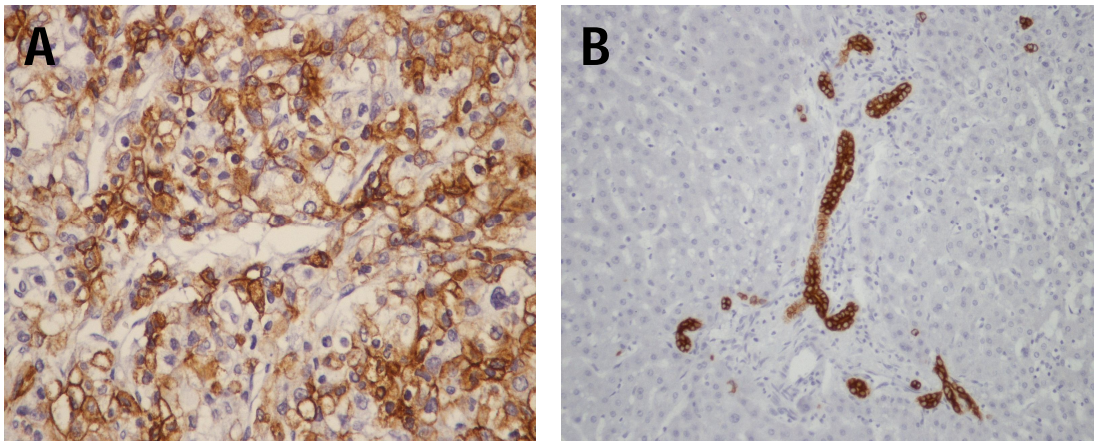


Figura 12. In (A), HCC, IR di membrana e citoplasma alla CK19 (40x); in (B), fegato non tumorale, dotti biliari positivi alla CK19 (20x).

La Tabella 10 illustra come l'iperpressione di CK19 correli con i diversi parametri clinico-patologici delle due casistiche. Nella casistica occidentale, si è osservata una correlazione con il sesso femminile ( $p=0,095$ ) e con la DFS ( $p=0,005$ ); mentre nella sola casistica orientale è stata messa in evidenza una correlazione con la presenza di metastasi intraepatiche ( $p=0,014$ ).

**Tabella 10:** Iperespressione di CK19

CK19	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Negativi	Positivi		Negativi	Positivi	
N	95	3		115	10	
Età	66,7 ± 8,7	72,7 ± 4,2	-	53,1 ± 9,6	55,6 ± 7,8	-
Sesso (F)	17 (17,89%)	2 (66,67%)	0,095	25 (21,74%)	2 (20,00%)	-
Eziologia			-			-
Hbv	21 (22,11%)	1 (33,33%)		86 (83,50%)	11 (100%)	
Hcv	54 (56,84%)	2 (66,67%)		8 (7,77%)	0 (0,00%)	
Non virale	20 (21,05%)	0 (0,00%)		9 (8,74%)	0 (0,00%)	
Dim. nod. <3 cm.	42 (45,16%)	1 (33,33%)	-	25 (21,55%)	2 (18,18%)	-
Multinodularità	37 (38,95%)	1 (33,33%)	-	8 (6,84%)	1 (9,09%)	-
Metastasi intraepatica	23 (27,38%)	1 (33,33%)	-	15 (12,82%)	5 (45,45%)	0,014
Grado			-			-
G1	16 (16,84%)	0 (0,00%)		1 (0,85%)	0 (0,00%)	
G2	44 (46,32%)	1 (33,33%)		45 (38,46%)	6 (54,55%)	
G3	35 (36,84%)	2 (66,67%)		71 (60,68%)	5 (45,45%)	
T 3-4	15 (15,79%)	1 (33,33%)	-	19 (16,67%)	2 (20,00%)	-
Angioinvasività (micro)	30 (32,26%)	1 (33,33%)	-	67 (57,26%)	8 (72,73%)	-
Angioinvasività (macro)	23 (24,21%)	1 (33,33%)	-	12 (10,62%)	3 (20,00%)	-
Overall survival Mediana, range	25, 1 – 117	15, 4 – 24	-	29, 1 – 123	52, 4 – 126	-
Disease free survival Mediana, range	20, 1 – 69	9, 4 – 14	0,006	13, 0 – 123	52, 2 – 126	-

### 6.2.3.2 Ep-CAM

Ep-CAM è iperespresso nel 9,3% [casistica occidentale] e nel 32,3% [casistica orientale] degli HCC. L'anticorpo mostra una IR di membrana (Figura 13a). Nel fegato non tumorale, gli epatociti sono normalmente negativi; mentre risultano positivi gli epatociti intermedi della zona perisetale (Figura 13b). Questo fenomeno è stato meglio osservato sull' *array* orientale, con spot di dimensioni maggiore. Si osserva inoltre una forte IR dei dotti biliari, strutture che abbiamo usato come controllo interno.

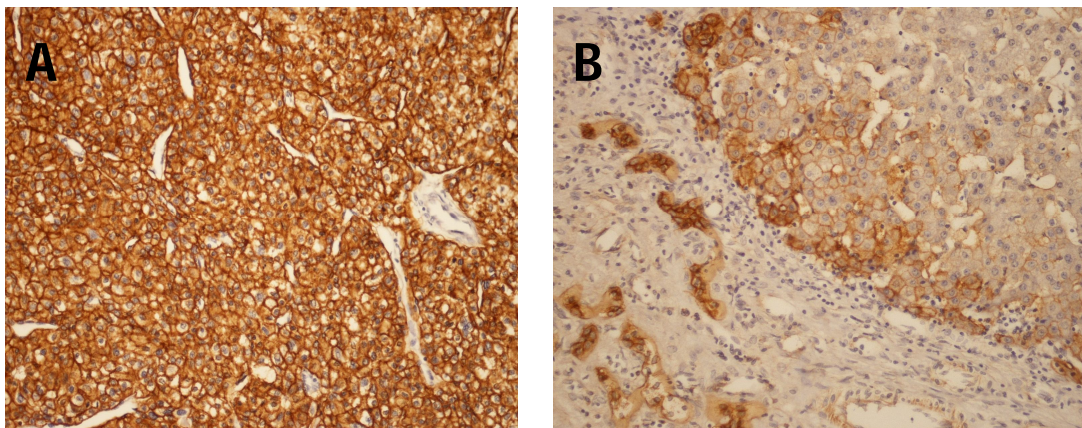


Figura 13. In (A), HCC EpCAM+, IR di membrana (20x); in (B), EpCAM, fegato non neoplastico (nodulo rigenerativo): si osserva positività dei dotti biliari e graduale perdita della positività all'Ep-CAM dalla periferia al centro della lesione (20x)

La Tabella 11 illustra come l'espressione di Ep-CAM correli esclusivamente con la DFS nella sola casistica occidentale ( $p=0,071$ ).



**Tabella 11: Iperespressione di Ep-CAM**

EPCAM	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Negativi	Positivi		Negativi	Positivi	
N	88	9		67	32	
Età	67,2 ± 8,9	64,5 ± 4,2	-	53,4 ± 8,8	52,2 ± 10,7	-
Sesso (F)	18 (20,45%)	1 (11,11%)	-	16 (24,24%)	5 (17,24%)	-
Eziologia			-			-
Hbv	19 (21,59%)	3 (33,33%)		53 (85,48%)	23 (85,19%)	
Hcv	50 (56,82%)	5 (55,56%)		4 (6,45%)	2 (7,41%)	
Non virale	19 (21,59%)	1 (11,11%)		5 (8,06%)	2 (7,41%)	
Dim. nod. <3 cm.	40 (45,98%)	2 (25,00%)	-	12 (18,18%)	9 (28,13%)	-
Multinodularità	34 (38,64%)	3 (33,33%)	-	5 (7,46%)	3 (9,38%)	-
Metastasi intraepatica	22 (28,21%)	1 (12,50%)	-	9 (13,43%)	7 (21,88%)	-
Grado			-			-
G1	14 (15,91%)	2 (22,22%)		1 (1,49%)	0 (0,00%)	
G2	41 (46,59%)	3 (33,33%)		28 (41,79%)	14 (43,75%)	
G3	33 (37,50%)	4 (44,44%)		38 (56,72%)	18 (56,25%)	
T 3 - 4	15 (17,05%)	0 (0,00%)	-	9 (13,64%)	4 (13,79%)	-
Angioinvasività (micro)	27 (31,40%)	3 (33,33%)	-	34 (50,75%)	22 (68,75%)	-
Angioinvasività (macro)	22 (25,00%)	1 (11,11%)	-	8 (11,94%)	3 (9,38%)	-
Overall survival Mediana, range	25, 1 – 117	25, 4 – 50	-	31, 0 – 126	24, 4 – 123	-
Disease free survival Mediana, range	17,5, 1 – 69	21, 4 – 50	0,071	12, 0 – 126	14,5, 1 – 123	-

### 6.2.3.3 Ep-CAM + CK19

La Tabella 12 illustra come la combinazione Ep-CAM e/o CK19 corredi esclusivamente nella casistica orientale con la presenza di metastasi intraepatiche ( $p=0,018$ ) e con l'angioinvasività ( $p=0,070$ ).

**Tabella 12:** Combinazione di Ep-CAM +/- CK19

CK19 + EPCAM	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Nessuno positivo	Almeno 1 positivo		Nessuno positivo	Almeno 1 positivo	
N	87	11		93	39	
Età	66,9 ± 8,9	66,4 ± 5,7	-	53,3 ± 9,2	53,0 ± 10,1	-
Sesso (F)	17 (19,54%)	2 (18,18%)	-	20 (21,51%)	7 (20,00%)	-
Eziologia			-			-
Hbv	19 (21,84%)	3 (27,27%)		70 (83,33%)	30 (88,24%)	
Hcv	49 (56,32%)	7 (63,64%)		6 (7,14%)	2 (5,88%)	
Non virale	19 (21,84%)	1 (9,09%)		8 (9,52%)	8 (5,88%)	
Dim. nod. <3 cm.	40 (46,51%)	3 (30,00%)	-	17 (18,48%)	10 (25,64%)	-
Multinodularità	34 (39,08%)	4 (36,36%)	-	6 (6,45%)	1 (10,26%)	-
Metastasi intraepatica	22 (28,57%)	2 (20,00%)	-	10 (10,75%)	11 (28,21%)	0,018
Grado			-			-
G1	14 (16,09%)	2 (18,18%)		1 (1,08%)	0 (0,00%)	
G2	41 (47,13%)	4 (36,36%)		36 (38,71%)	18 (46,15%)	
G3	32 (36,78%)	5 (45,45%)		56 (60,22%)	21 (53,85%)	
T 3 – 4	15 (17,24%)	1 (9,09%)	-	17 (18,48%)	4 (11,43%)	-
Angioinvasività (micro)	27 (31,76%)	4 (36,36%)	-	51 (54,84%)	28 (71,79%)	0,070
Angioinvasività (macro)	22 (25,29%)	2 (18,18%)	-			
Overall survival Mediana, range	25, 1 – 117	24, 4 – 50	-	30, 0 – 119	31, 4 – 126	-
Disease free survival Mediana, range	18, 1 – 69	20, 4 – 50	-	13, 0 – 119	18, 1 – 126	-

## 6.2.4 Altri marcatori

### 6.2.4.1 GS

GS è iperespressa nel 33,7% [casistica occidentale] e nel 18% [casistica orientale] degli HCC (Figura 14a e 14b). Come già osservato (Di Tommaso et al., 2007), gli epatociti pericentrali/perisettali mostrano una intensa immunoreattività (Figura 14 c, d).

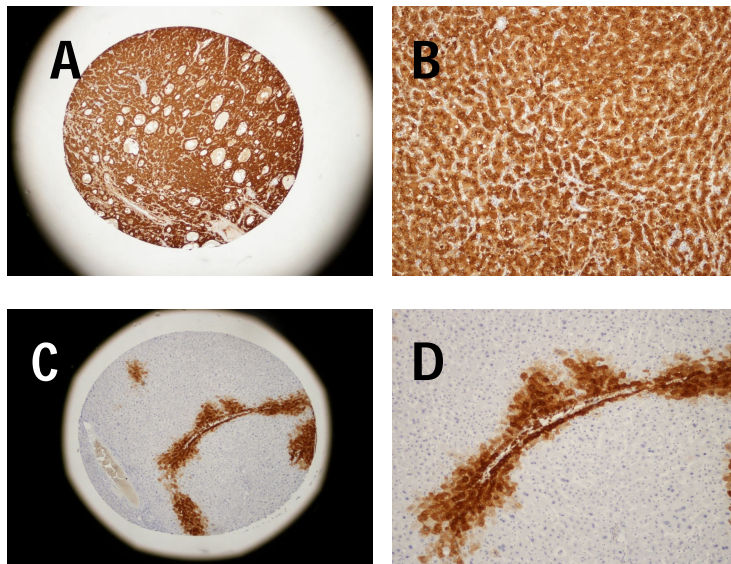


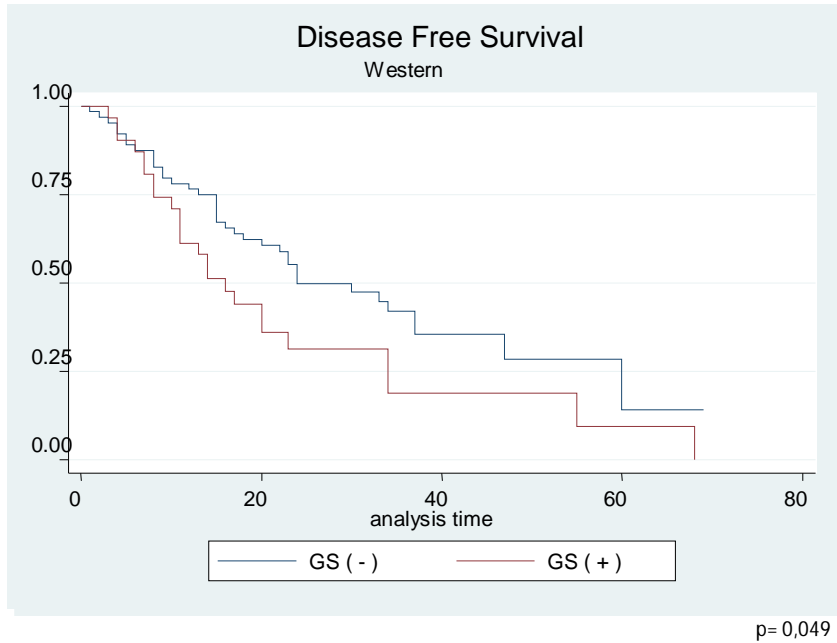
Figura 14. In (A) e (B), HCC, IR di GS, positività citoplasmatica omogenea e intensa (4x e 10x); in (C) e (D), fegato, non tumorale, positività citoplasmatica intensa degli epatociti peri-settali e pericentrali nel fegato (4x e 10x).

La Tabella 13 illustra come l'iperpressione di GS correli con i alcuni parametri clinico-patologici nelle due casistiche. Nella casistica occidentale, si è osservata una correlazione con la DFS ( $p=0,049$ ) (Figura 15); mentre nella casistica orientale, si è osservata una correlazione con l'eziologia da virus B ( $p=0,086$ ), con la differenziazione tumorale ( $p= 0,038$ ) e con una minore frequenza di angioinvasività microvascolare.

**Tabella 13:** Iperpressione della GS

GS	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Negativi	Positivi		Negativi	Positivi	
N	65	33		81	40	
Età	67,6 ± 7,2	65,4 ± 10,9	-	52,7 ± 9,9	54,0 ± 8,8	-
Sesso (F)	13 (20,00%)	6 (18,18%)	-	19 (24,05%)	7 (18,42%)	-
Eziologia			-			0,086
Hbv	14 (21,54%)	8 (24,24%)		64 (87,67%)	29 (80,56%)	
Hcv	36 (55,38%)	20 (60,61%)		2 (2,74%)	5 (13,89%)	
Non virale	15 (23,08%)	5 (15,15%)		7 (9,59%)	2 (5,59%)	
Dim. nod. <3 m.	29 (46,03%)	14 (42,42%)	-	17 (21,25%)	8 (20,00%)	-
Multinodularità	24 (36,92%)	14 (42,42%)	-	7 (8,64%)	3 (7,50%)	-
Metastasi intraepatica	15 (26,32%)	9 (30,00%)	-	15 (18,52%)	5 (12,50%)	-
Grado			-			0,038
G1	13 (20,00%)	3 (9,09%)		0 (0,00%)	1 (2,50%)	
G2	27 (41,54%)	18 (54,55%)		31 (38,27%)	22 (50,00%)	
G3	25 (38,46%)	12 (36,36%)		50 (61,73%)	17 (42,50%)	
T 3-4	11 (16,92%)	5 (15,15%)	-	12 (15,19%)	5 (13,51%)	-
Angioinvasività(micro)	20 (31,75%)	11 (33,33%)	-	54 (66,67%)	18 (45,00%)	0,022
Angioinvasività(macro)	15 (23,08%)	9 (27,27%)	-	11 (13,58%)	2 (5,00%)	0,216
Overall survival Mediana, range	25, 1 – 86	21,5, 4 – 117	-	38, 4 – 123	24, 0 – 126	-
Disease free survival Mediana, range	23, 1 – 69	14, 3 – 68	0,049	15, 1 – 123	16, 0 – 123	-

Figura 15. Casistica occidentale: GS e DFS



#### 6.2.4.2 GPC3

GPC3 è iperespresso nel 48% [casistica occidentale] e nel 75,4% [casistica orientale] degli HCC e mostra un'immunoreattività citoplasmatica e di membrana diffusa, come illustra la Figura 16. Nel fegato non tumorale, abbiamo riscontrato un'espressione nel 4,6% (casistica occidentale) e nel 1,7% (casistica orientale).

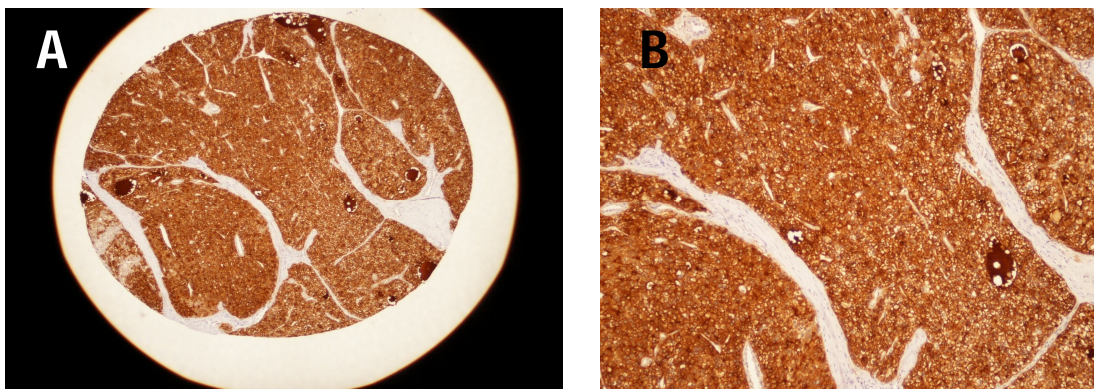


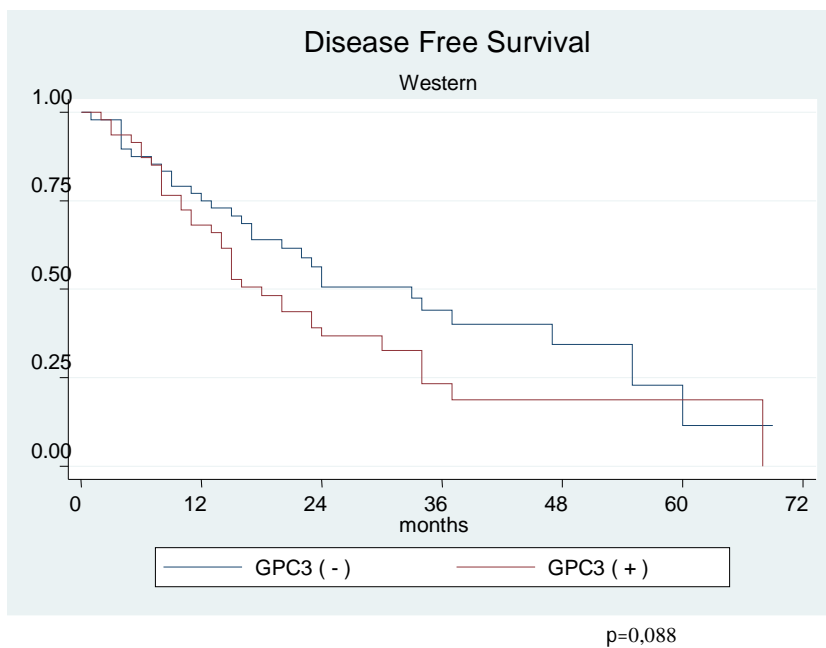
Figura 16. HCC, immunoreattività al GPC3, diffusa IR di membrana e citoplasma (4x, 10x).

La Tabella 14 illustra come l'iperpressione di GPC3 correli con alcuni parametri clinico-patologici delle due casistiche. In entrambe si osserva una correlazione con la dedifferenziazione tumorale ( $p=0,003$ ,  $p=0,021$ ); mentre nella sola casistica occidentale, si è osservata una correlazione con l'eziologia da virus C ( $p=0,032$ ) e la DFS ( $p=0,088$ ) (Figura 17) ed in quella orientale è stata messa in evidenza una correlazione con una minore tendenza alla multinodularità ( $p=0,014$ ).

**Tabella 14:** Iperpressione di GPC3

GPC3	OCCIDENTE		P	ORIENTE		P
	Negativi	Positivi		Negativi	Positivi	
N	50	48		30	92	
Età	66,3 ± 8,9	67,4	-	54,7 ± 9,3	52,6 ± 9,5	-
Sesso (F)	8 (16,00%)	11 (22,92%)	-	6 (21,43%)	20 (22,47%)	-
Eziologia			<b>0,032</b>			-
Hbv	<b>12 (24,00%)</b>	<b>10 (20,83%)</b>		23 (85,19%)	71 (85,54%)	
Hcv	<b>23 (46,00%)</b>	<b>33 (68,75%)</b>		2 (7,41%)	5 (6,02%)	
Non virale	<b>15 (30,00%)</b>	<b>5 (10,42%)</b>		2 (7,41%)	7 (8,43%)	
Dim. nod. <3 cm.	19 (39,58%)	24 (50,00%)	-	7 (23,33%)	18 (19,78%)	-
Multinodularità	20 (40,00%)	18 (37,50%)	-	<b>6 (20,00%)</b>	<b>4 (4,35%)</b>	<b>0,014</b>
Metastasi intraepatica	12 (26,67%)	12 (28,57%)	-	5 (16,67%)	15 (16,30%)	-
Grado			<b>0,003</b>			<b>0,021</b>
G1	<b>13 (26,00%)</b>	<b>3 (6,25%)</b>		<b>1 (3,33%)</b>	<b>0 (0,00%)</b>	
G2	<b>25 (50,00%)</b>	<b>20 (41,67%)</b>		<b>18 (60,00%)</b>	<b>37 (40,22%)</b>	
G3	<b>12 (24,00%)</b>	<b>25 (52,08%)</b>		<b>11 (36,67%)</b>	<b>55 (59,78%)</b>	
T 3-4	9 (18,00%)	7 (14,58%)	-	5 (17,86%)	12 (13,64%)	-
Angioinvasività (micro)	16 (32,65%)	15 (31,91%)	-	18 (60,00%)	55 (59,78%)	-
Angioinvasività (macro)	14 (28,00%)	10 (20,83%)	-	<b>1 (3,33%)</b>	12 (13,04%)	<b>0,183</b>
Overall survival Mediana, range	25, 2 – 86	24, 1 – 117	-	26, 0 – 119	32, 2 – 126	-
Disease free survival Mediana, range	<b>20,5, 1 – 69</b>	<b>15,5, 1 – 68</b>	<b>0,088</b>	11, 0 – 119	16, 1 – 126	-

Figura 17. Casistica occidentale: GPC3 e DFS



#### 6.2.4.3 HSP70

L'HSP70 è iperespresso nel 31,6% [casistica occidentale] e nel 39,2% [casistica orientale] degli HCC. L'anticorpo mostra una diffusa immunoreattività nucleo-citoplasmatica, come illustra la Figura 18a. Nel fegato non tumorale, gli epatociti sono generalmente negativi [4,6% (casistica occidentale); 0% (casistica orientale)], in contrasto, si osserva una positività dei dotti biliari e degli epatociti intermedi a distribuzione perissettale, elementi che abbiamo usato come controllo positivo (Figura 18b).

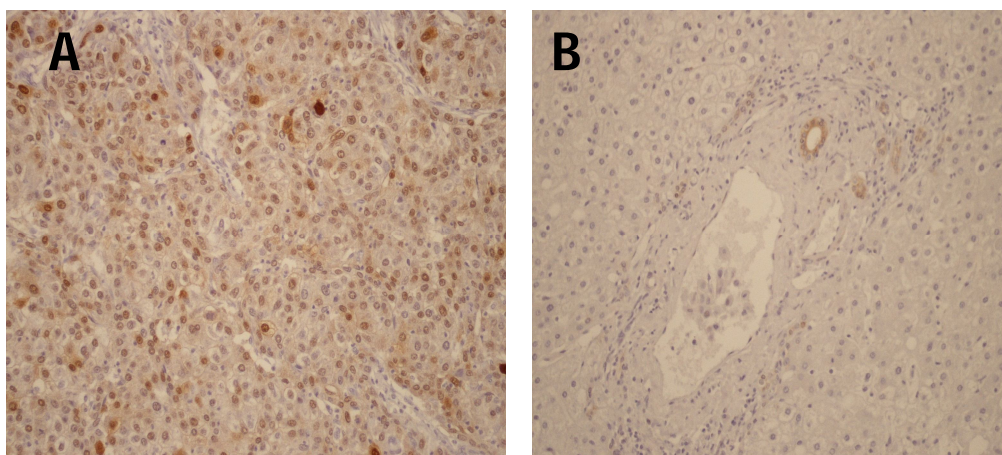


Figura 18. In (A), HCC, diffusa IR nucleo-citoplasmatica all'HSP70 (20x); in (B), fegato non tumorale, negativo, dotti biliari come controllo interno (20x).

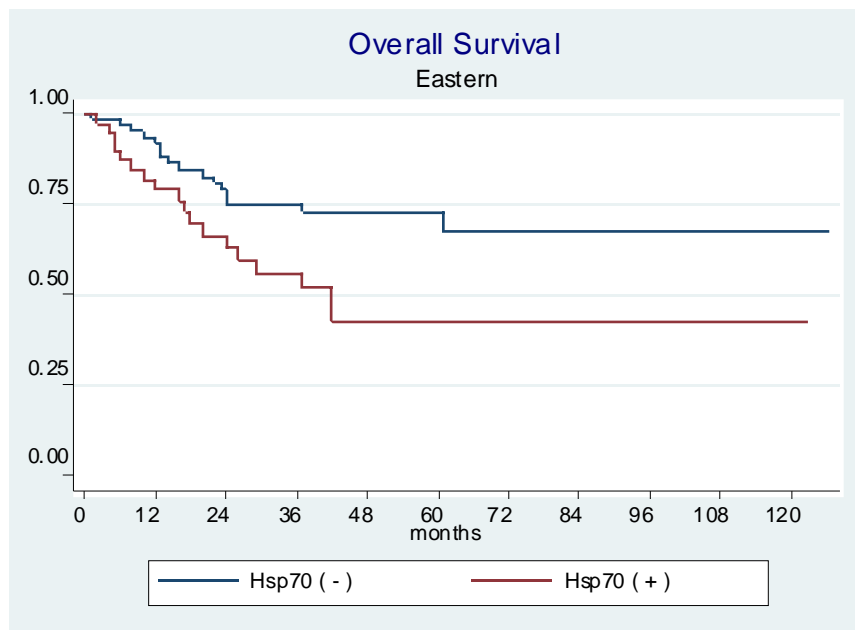
La Tabella 15 illustra come l'iperpressione di HSP70 correli con i diversi parametri clinico-patologici delle due casistiche. In entrambe si è osservata una correlazione con la dedifferenziazione tumorale ( $p=0,038$  e  $p=0,032$ ) mentre nella sola casistica orientale si è dimostrata una correlazione statisticamente significativa con lo stadio avanzato della malattia ( $p=0,033$ ), eziologia da virus B ( $p=0,032$ ), con l'OS ( $p=0,016$ ) e con la DFS ( $p=0,085$ ) (Figura 19a e 19b).



**Tabella 15: Iperespressione del HSP70**

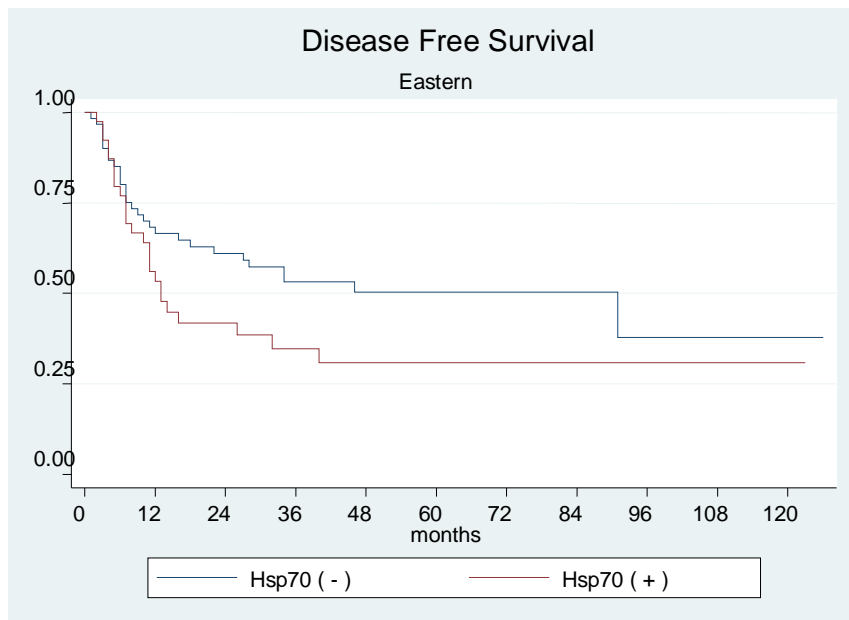
HSP70	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Negativi	Positivi		Negativi	Positivi	
N	67	31		76	49	
Età	66,7 ± 8,9	67,2 ± 8,0	-	53,9 ± 9,1	52,3 ± 9,9	-
Sesso (F)	13 (19,40%)	6 (19,35%)	-	19 (26,03%)	7 (14,58%)	-
Eziologia			-			0,032
Hbv	17 (25,37%)	5 (16,13%)		56 (82,35%)	39 (88,64%)	
Hcv	36 (53,73%)	20 (64,52%)		8 (11,76%)	0 (0,00%)	
Non virale	14 (20,90%)	6 (19,35%)		4 (5,88%)	5 (11,36%)	
Dim. nod. <3 cm.	29 (43,94%)	14 (46,67%)	-	17 (22,37%)	9 (18,75%)	-
Multinodularità	27 (40,30%)	11 (35,48%)	-	9 (9,47%)	3 (3,33%)	-
Metastasi intraepatica	16 (27,59%)	8 (27,59%)	-	13 (17,11%)	7 (14,29%)	-
Grado			0,038			0,032
G1	14 (20,90%)	2 (6,45%)		1 (1,32%)	0 (0,00%)	
G2	33 (49,25%)	12 (38,71%)		39 (51,32%)	15 (30,61%)	
G3	20 (29,85%)	17 (54,84%)		36 (47,37%)	34 (69,39%)	
T 3 – 4	13 (19,40%)	3 (9,78%)	-	6 (8,33%)	11 (22,92%)	0,033
Angioinvasività (micro)	19 (28,79%)	12 (40,00%)	-	42 (55,26%)	33 (67,35%)	-
Angioinvasività(macro)	16 (23,88%)	8 (25,81%)	-	6 (7,89%)	7 (14,29%)	0,368
Overall survival Mediana, range	24, 2 – 117	26, 1 – 72	-	38, 0 – 126	23, 2 – 123	0,016
Disease free survival Mediana, range	20, 1 - 69	17, 1 – 55	-	27, 0 – 126	12, 2 – 123	0,085

Figura 19a. Casistica orientale: HSP70 e OS



p=0,016

Figura 19b. Casistica orientale: HSP70 e DFS



p=0,085

#### 6.2.4.4 Hsp 70 + OPN

L'analisi combinata dell'Hsp70 e/o OPN non mostra correlazioni statisticamente significative nella casistica occidentale; mentre nella casistica orientale si è dimostrata una correlazione significativa con il sesso ( $p=0,051$ ), lo stadio tumorale avanzato ( $p=0,058$ ) e OS ( $p=0,009$ ).

#### 6.2.4.5 Pak1 + OPN

La Tabella 16 illustra come la combinazione di Pak1 e/o osteopontina correlino con alcuni parametri clinico-patologici nella sola casistica orientale, dove si è dimostrata una correlazione statisticamente significativa con l'età ( $p=0,042$ ), lo stadio avanzato della malattia ( $p=0,051$ ), l'eziologia da virus C ( $p=0,048$ ) e OS ( $p=0,021$ ) (Figura 20).

Figura 20. Casistica orientale: Pak1 +/- OPN e OS

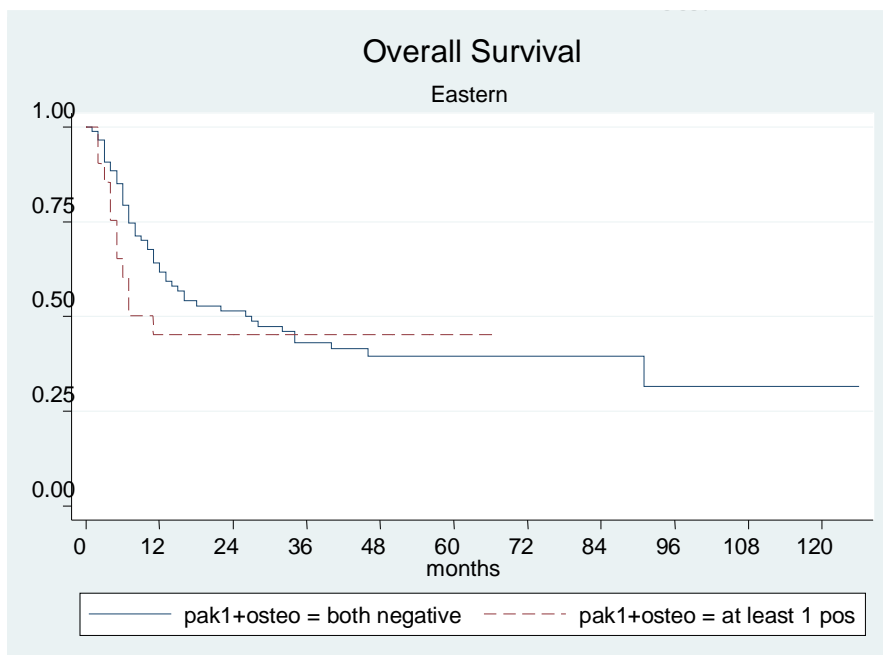


Tabella 16: Combinazione di Pak1 +/- OPN

PAK1 + OSTEO	OCCIDENTE		p	ORIENTE		p
	Nessuno positivo	Almeno 1 positivo		Nessuno positivo	Almeno 1 positivo	
N	70	27		103	33	
Età	67,3 ± 8,3	65,9 ± 9,6	-	52,0 ± 9,3	55,9 ± 9,4	0,042
Sesso (F)	11 (15,71%)	8 (29,63)	-	22 (22,45%)	5 (15,15%)	-
eziologia			-			0,048
HBV	16 (22,86%)	5 (18,52%)		81 (88,04%)	23 (76,67%)	
HCV	37 (52,86%)	19 (70,37%)		3 (3,26%)	5 (16,67%)	
Non virale	17 (24,29%)	3 (11,11%)		8 (8,70%)	2 (6,67%)	
Dim. nod. <3 cm.	31 (45,59%)	12 (44,44%)	-	19 (18,63%)	8 (24,24%)	-
Multinodularità	31 (44,29%)	7 (25,93%)	-	7 (6,80%)	3 (9,09%)	-
Metastasi intraepatica	19 (31,15%)	5 (20,00%)	-	18 (17,48%)	4 (12,12%)	-
Grado			-			-
G1	14 (20,00%)	2 (7,41%)		1 (0,97%)	0 (0,00%)	
G2	33 (47,14%)	11 (40,74%)		43 (41,75%)	14 (42,42%)	
G3	23 (32,86%)	14 (51,85%)		59 (57,28%)	19 (57,58%)	
T 3 – 4	14 (20,00%)	2 (7,41%)	-	12 (12,24%)	9 (28,13%)	0,051
Angioinvasività (micro)	21 (30,43%)	10 (38,46%)	-	64 (62,14%)	18 (54,55%)	-
Angioinvasività (macro)	16 (22,86%)	8 (29,63%)	-			
Overall survival Mediana, range	26, 5 – 117	23, 1 – 86	-	35, 5, 0 – 126	20, 1 – 67	0,021
Disease free survival Mediana, range	20, 2 – 69	16, 1 – 60	-	15, 0 – 126	7, 1 – 67	-

## 7. Discussione

Ai fini della discussione vengono riportate due tabelle sinottiche riassuntive che illustrano l'associazione dei biomarcatori (o loro combinazioni) con i parametri patologici (Tabella 17) e di sopravvivenza (Tabella 18).

**Tabella 17: Biomarcatori e loro associazione con parametri morfologici quali grado, stadio e angioinvasione**

Biomarcatori	Grado		Stadio		Angio. micro		Angio. macro	
	Occidente	Oriente	Occidente	Oriente	Occidente	Oriente	Occidente	Oriente
$\alpha$ -tubulina	0,051	0,048	-	-	0,083	-	0,078	-
$\beta$ -tubulina	0,045	-	-	-	0,080	-	-	-
Hsp70	0,038	0,032	-	0,033	-	-	-	-
Pak1	0,012	-	-	-	-	-	-	0,034
OPN	-	-	-	0,045	-	-	-	-
CK19	-	-	-	-	-	-	-	-
Ep-CAM	-	-	-	-	-	-	-	-
GS	-	0,038	-	-	-	-	-	-
GPC3	-	0,021	-	-	-	-	-	-
LAMA3	-	-	-	-	-	-	-	-

Un primo aspetto da sottolineare è rappresentato dal fatto che alcuni marcatori risultino associati a parametri patologici universalmente accettati come significativi nella valutazione della storia naturale e del trattamento dell'epatocarcinoma, quali il grado di differenziazione, lo stadio della malattia e l'angioinvasione (micro e macroscopica). Tuttavia si osserva anche come pochi fra questi mantengano un significato statisticamente valido in entrambe le serie (come ad esempio risulta per la associazione  $\alpha$  tubulina e HSP70 con il grado di differenziazione tumorale). Al contrario emerge una differente distribuzione e significatività dei biomarcatori nelle due casistiche: infatti alcune molecole risultano più efficaci nella casistica occidentale e inefficaci in quella orientale e viceversa. Questo fenomeno è, a nostro giudizio, da mettersi in relazione alla specificità intrinseca (epidemiologica) di

ciascuno dei due campioni oggetto dello studio. Questa considerazione appare ampiamente corroborata dalle notevoli differenze che contraddistinguono la casistica occidentale da quella orientale, particolarmente in ordine ad eziologia della malattia, età del paziente, dimensione e numero dei noduli. A fronte di queste differenze epidemiologiche, tuttavia, la malattia tumorale mostra un decorso simile, come sottolineato dalla sostanziale sovrapposizione delle curve di sopravvivenza complessiva e libera da malattia nelle due serie.

Dal nostro studio emergono dati robusti che suggeriscono come il dosaggio immunocitochimico di alcune molecole, singolarmente usate o in combinazione, possa fornire su campioni biotici informazioni a significato prognostico-predittivo, aggiuntive a quelle correntemente disponibili. Come si evince dalla Tabella 18, questo è il caso del dosaggio di  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina principalmente nella casistica occidentale e di PAK-1, HSP70 e OPN in quella orientale, la cui iperespressione appare in grado di discriminare le neoplasie dotate di maggiore aggressività.

**Tabella 18: Biomarcatori e loro associazioni con sopravvivenza libera da malattia (DFS) e complessiva (OS) nella due serie occidentale e orientale**

Biomarcatori	Casistica Occidentale		Casistica Orientale	
	DFS	OS	DFS	OS
a-tubulina	0,032	0,052	-	-
b-tubulina	0,028	-	0,090	-
a- e/o b- tubulina	0,028	-	0,074	-
Hsp70	-	-	0,085	0,016
Pak1	-	-	0,066	0,003
OPN	-	-	-	0,096
Pak1 e/o OPN	-	-	-	0,02
Hsp70e/o Pak1	-	-	0,028	0,001
Hsp70 e/o OPN	-	-	-	0,009
Hsp70+Pak1+OPN	-	-	-	0,003

Come abbiamo già osservato, peraltro, l'iperpressione di  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina correla anche con il grado di sdifferenziazione tumorale e l'angioinvasione che sono tra i parametri patologici che maggiormente influenzano la prognosi dei pazienti affetti da HCC. Pertanto non stupisce che, prese singolarmente o in combinazione, le stesse molecole abbiano un impatto su DFS e OS. Particolarmente interessante appare l'influenza sulla sopravvivenza libera da malattia in quanto questo parametro risente maggiormente delle caratteristiche intrinseche della neoplasia mentre il dato di sopravvivenza complessiva è senz'altro influenzato anche dalla malattia epatica cronica non tumorale, che, almeno in parte, è alla base della sopravvivenza complessiva di questi pazienti.

Ancorché sia necessaria la validazione longitudinale del potere predittivo di  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina, sulla base dei nostri dati è ipotizzabile che la valutazione immunohistochimica delle tubuline su agobiopsia epatica possa risultare utile per predire in fase di pretrattamento, la evoluzione della malattia tumorale. Questo potenziale prognostico sembra più robusto e significativo nei casi di HCC con caratteristiche epidemiologiche di tipo occidentale. Tuttavia va anche sottolineato che, ad una analisi multivariata, tali marcatori non risultano indipendenti; pertanto è verosimile che la loro potenza diagnostica sia dovuta anche alla correlazione con il grado di differenziazione e all'attitudine angioinvasiva dell'epatocarcinoma.

Non vi sono in letteratura dati sufficientemente solidi che consentano di definire con sicurezza il ruolo biologico svolto dalla iperpressione delle tubuline nel processo di progressione tumorale, né il nostro studio si è finalizzato ad approfondire questo aspetto. E' noto tuttavia che  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina sono costituenti essenziali dei microtubuli e si ritiene che questi ultimi svolgano una funzione importante nel processo di migrazione cellulare e di invasione vascolare (Vasiliev, 2004; Tian et al, 2005). Anche se il meccanismo che sottende tale azione è di là dall'essere compreso, nella pratica clinica farmaci antitumorali come il paclitaxel, che interferiscono con i processi dinamici dei microtubuli cellulari, hanno un ruolo consolidato nel trattamento di diverse patologie tumorali.

Nell'ambito della casistica orientale la molecola con efficacia predittiva più comparabile a quella di  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina è HSP70. Questa molecola infatti correla con l'eziologia da virus B, la sdifferenziazione tumorale, lo stadio avanzato della malattia, nonché con DSF e la OS. Tra i pochi dati disponibili in letteratura va segnalato che Joo et al. (2005), in uno studio sull'espressione di HSP70 e HSP27, hanno dimostrato una correlazione di HSP70 con proliferazione cellulare, dimensioni tumorali, presenza di invasione della vena porta e stadio avanzato di malattia, ipotizzando che HSP70 eserciti un ruolo induttivo sulla proliferazione del tumore. E' interessante rilevare che Boyault et al. (2007), in un importante contributo di expression profiling, hanno segnalato che uno dei gruppi di HCC a prognosi più sfavorevole (gruppo G3), era caratterizzato da una maggior coinvolgimento di molecole implicate nella proliferazione cellulare. Zhang et al. (2005) hanno inoltre dimostrato che Hbx, una proteina trascrizionale del virus B dell'epatite implicata nell'oncogenesi virus-mediata, si lega a HSP70 mitocondriale di cellule dell'*E. coli* e di umani formando un complesso proteico. Ciò potrebbe spiegare la correlazione tra iperespressione di HSP70 e infezione da virus B. I nostri risultati sembrano confermare che HSP70 sia coinvolta nella progressione di HCC cosicché il dosaggio tissutale di questa proteina potrebbe fornire informazioni predittive soprattutto in corso di HCC insorti in cirrosi da virus B.

Una molecola che i nostri dati evidenziano come marcatore di interesse nella serie orientale, è Pak1 (*p21 activated kinase 1*). Questa correla sia con DSF che con OS. I nostri dati confermano dunque quanto recentemente riportato da Ching et al (2007). In questo lavoro si è osservato che gli HCC Pak1+ erano meno differenziati e più angiogenici e, conseguentemente, correlati ad un fenotipo metastagenico e con maggior tendenza alla recidiva precoce. In studi di tipo funzionale è stato suggerito che PAK1 sia implicata nei processi di polarizzazione del citoscheletro, agendo in maniera particolare su actina (Carter et al., 2004). Analogamente Ching et al (2007) hanno suggerito che l'espressione di Pak1 sia indotta dalla attivazione della via del JNK (*c Jun NH2 terminal kinase*) e della fosforilazione della paxilina e, come risultato finale, induca un aumento della motilità cellulare. Si può quindi suggerire che la valutazione immunohistochimica di Pak1 rappresenti un utile strumento per identificare, su biopsia, gli HCC con comportamento sfavorevole,



specie ove sussistano caratteristiche epidemiologiche sovrapponibili a quelle della casistica orientale del presente studio.

Un terzo marcatore che i nostri risultati nella serie orientale suggeriscono implicato nella progressione del carcinoma epatico è osteopontina (OPN). La iperespressione di osteopontina risulta infatti in associazione con una ridotta sopravvivenza complessiva, coerentemente con quanto già segnalato in letteratura. Infatti, in prevalenza sempre su casistiche orientali, è stato segnalato che tale biomarcatore correla con una maggior tendenza alla metastatizzazione (Ye et al., Takafuji et al., 2007), con l'invasione vascolare (Korita et al., 2008; Xie et al., 2007; Yuan et al., 2006) e dunque una prognosi rapidamente infausta (Pan et al., 2003 e Zhang et al., 2006). Zhang et al (2006) hanno suggerito che l'espressione di OPN sia in qualche modo da in relazione con la via di Akt (un downstream effector comune a molti pathway tirosinchinasici). Alla luce di questo dato appare interessante l'osservazione che HBx a sua volta sia in grado di determinare upregolazione di Akt (Lee et al., 2001). Questo dato, unitamente a quello analogo di HSP70, renderebbe ragione del significativo effetto predittivo di questi 2 biomarcatori selettivamente nella serie orientale in cui l'infezione da virus B gioca un ruolo preminente di tipo oncogeno.

Nella casistica occidentale la pertinenza dell'utilizzo dei biomarcatori  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina in combinazione, è suggerita dal comune ruolo biologico svolto nella dimerizzazione del microtubulo. E' interessante rilevare che nella serie orientale l'utilizzo combinato di HSP70, Osteopontina e Pak1 troverebbe una sua giustificazione nella capacità dei marcatori in associazione di potenziare l'abilità predittiva dei singoli. Infatti, come risulta dalla Tabella 21, l'utilizzo combinato di questi 3 biomarcatori e le stesse combinazioni Pak1/OPN e HSP70/OPN correlano con la sopravvivenza complessiva mentre la combinazione HSP70/Pak1 mostra una correlazione sia con la sopravvivenza complessiva che con quella libera da malattia. Quest'ultima combinazione dunque appare la più interessante non soltanto in quanto l'azione dei singoli risulta potenziata impattando anche sulla sopravvivenza libera da malattia, che è parametro come già sottolineato, direttamente riconducibile alla biologia tumorale, anche ma per la verosimile complementarità dell'azione biologica delle due molecole. Si avrebbero infatti a disposizione biomarcatori che,

nella epatocarcinogenesis da virus B, sono in qualche maniera collegati l'uno alla proliferazione cellulare (HSP70) e l'altro alla motilità cellulare (PAK 1).

Noi riconosciamo che le considerazioni di cui sopra e le considerazioni pratiche che si possono trarre da questo studio debbono essere verificate in studi longitudinali in cui si valuti prospetticamente l'impatto dei singoli o loro combinazioni. Certamente questo studio documenta come alcuni biomarcatori siano di potenziale interesse prognostico e utilizzo clinico, in relazione a specifiche caratteristiche epidemiologiche, tra le quali l'eziologia della epatite cronica di base e la sede geografica della popolazione in esame svolgono un ruolo preminente. Un altro elemento che emerge da questo studio è la forza predittiva e indipendente da altre variabili, di alcuni parametri morfologici tradizionali nell'anticipare il decorso della malattia epatica tumorale tra i quali segnaliamo in particolare il grado di differenziazione tumorale. Cio' implica che, nel carcinoma epatocellulare, la capacità predittiva di nuovi biomarcatori non dovrebbe mai prescindere dal confronto con il grading tumorale.

In conclusione, il nostro studio ha documentato che nell'epatocarcinoma:

A) l'iperespressione di alcuni biomarcatori quali alfa e beta tubulina in serie occidentali e HSP79 e PAK1 in serie orientali, singolarmente o in combinazione, correla con una maggiore aggressività della neoplasia documentata da ridotta sopravvivenza libera da malattia e complessiva;

B) il loro significato clinico non appare universale in quanto correlato con specifici parametri epidemiologici, tra i quali rilevanti appaiono la collocazione geografica e l'eziologia;

C) il grado di differenziazione tumorale rimane parametro morfologico forte contro il quale va testato il significato clinico di nuovi biomarcatori.

---

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Allal AS, Kahne T, Reverdin AK, Lippert H, Schlegel W, Reymond MA. Radioresistance-related proteins in rectal cancer. *Proteomics*. 2004 Aug;4(8):2261-9.
2. Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med*. 1999 Oct;77(10):699-712.
3. Bedell VM, Yeo SY, Park KW, Chung J, Seth P, Shivalingappa V, Zhao J, Obara T, Sukhatme VP, Drummond IA, Li DY, Ramchandran R. Roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 3;102(18):6373-8.
4. Bernard-Marty C, Treilleux I, Dumontet C, Cardoso F, Fellous A, Gancberg D, Bissery MC, Paesmans M, Larsimont D, Piccart MJ, Di Leo A. Microtubule-associated parameters as predictive markers of docetaxel activity in advanced breast cancer patients: results of a pilot study. *Clin Breast Cancer*. 2002 Dec;3(5):341-5.
5. Bolondi L, Gaiani S, Celli N, Golfieri R, Grigioni WF, Leoni S, Venturi AM, Piscaglia F. Characterization of small nodules in cirrhosis by assessment of vascularity: the problem of hypovascular hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005 Jul;42(1):27-34.
6. Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:743-81
7. Bokoch GM. PAK'n it in: identification of a selective PAK inhibitor. *Chem Biol*. 2008 Apr;15(4):305-6.

8. Boyault S, Rickman DS, de Reyniès A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Hérault A, Saric J, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007 Jan;45(1):42-52.
9. Bruix J, Hessheimer AJ, Forner A, Boix L, Vilana R, Llovet JM. New aspects of diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2006 Jun 26;25(27):3848-56.
10. Brunner A, Prelog M, Verdorfer I, Tzankov A, Mikuz G, Ensinger C. EpCAM is predominantly expressed in high grade and advanced stage urothelial carcinoma of the bladder. *J. Clin. Pathol.* 2008;61;307-310.
11. Brunner A, Schaefer G, Veits L, Brunner B, Prelog M, Ensinger C. EpCAM overexpression is associated with high-grade urothelial carcinoma in the renal pelvis. *Anticancer Res*. 2008 Jan-Feb;28(1A):125-8.
12. Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, Colligan BM, Bhatt TR, Pemberton JO, Konicek S, Hom J, Marshall M, Graff JR. Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis. *Clin Cancer Res*. 2004 May 15;10(10):3448-56.
13. Chaparro M, González Moreno L, Trapero-Marugán M, Medina J, Moreno-Otero R. Review article: pharmacological therapy of hepatocellular carcinoma with sorafenib and other oral agents. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Sep 20.
14. Ching YP, Leong VY, Lee MF, Xu HT, Jin DY, Ng IO. P21-activated protein kinase is overexpressed in hepatocellular carcinoma and enhances cancer metastasis involving c-Jun NH2-terminal kinase activation and paxillin phosphorylation. *Cancer Res*. 2007 Apr 15;67(8):3601-8.
15. Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohiki M, Asaka M, et al. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003;37:198-207.

16. Chuma M, Saeki N, Yamamoto Y, Ohta T, Asaka M, Hirohashi S, Sakamoto M. Expression profiling in hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis: identification of high-mobility group (Y) protein as a molecular marker of hepatocellular carcinoma metastasis. *Keio J Med* 2004; 53 (2): 90-97.
17. Ding SJ, Li Y, Tan YX, Jiang MR, Tian B, Liu YK, Shao XX, Ye SL, Wu JR, Zeng R, Wang HY, Tang ZY, Xia QC. From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Jan;3(1):73-81.
18. De Boer CJ, Van Krieken JHJM, Janssen-Van Rhijn CM, Litinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 1999; 188: 201-206.
19. Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, Fiamengo B, Destro A, Morengi E, Montorsi M, Torzilli G, Tommasini M, Terracciano L, Tornillo L, Vecchione R, Roncalli M. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology*. 2007 Mar;45(3):725-34.
20. Dumontet C, Isaac S, Souquet PJ, Bejui-Thivolet F, Pacheco Y, Peloux N, Frankfurter A, Luduena R, Perol M. Expression of class III  $\beta$  tubulin in non-small cell lung cancer is correlated with resistance to taxane chemotherapy. *Bull Cancer*. 2005 Feb;92(2):E25-30.
21. Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, Lesaffre E, Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology*. 2006 Aug;49(2):138-51.
22. Ensinger C, Kremser R, Prommegger R, Spizzo G, Schmidy KW. EpCAM Overexpression in thyroid carcinomas: a histopathological study of 121 cases. *J Immunother* 2006;29:569–573).

23. Ferrandina G, Zannoni GF, Martinelli E, Paglia A, Gallotta V, Mozzetti S, Scambia G, Ferlini C. Class III  $\beta$ -tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2006 May 1;12(9):2774-9.
24. Fiammengo B. Studio immunofenotipico della sequenza cirrosi-epatocarcinoma su microarray tissutale. Tesi di specialità. Università degli Studi di Milano.
25. Forner A, Hessheimer AJ, Isabel Real M, Bruix J. Treatment of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006 Nov;60(2):89-98.
26. Fujiwara M, Ghazizadeh M, Kawanami O. Potential role of the Slit/Robo signal pathway in angiogenesis. *Vasc Med.* 2006 May;11(2):115-21.
27. Gianelli G, Franvea E, Bergamini C, Marinosci F, antonaci S. Laminin-5 chains are expressed differentially in metastatic and nonmetastatic hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research. Vol. 9, 3684–3691, September 1, 2003.*
28. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinom: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2008; 14(27): 4300-4308
29. Gosens MJ, van Kempen LC, van de Velde CJ, van Krieken JH, Nagtegaal ID. Loss of membranous Ep-CAM colorectal carcinoma cells. *Modern Pathology* (2007) 20, 221–232.
30. Huminiecki L, Gorn M, Suchting S, Poulosom R, Bicknell R. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics.* 2002 Apr;79(4):547-52.

31. Iso Y, Sawada T, Okada T, Kubota K. Loss of E-cadherin mRNA and gain of osteopontin mRNA are useful markers for detecting early recurrence of HCV-related hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol*. 2005 Dec 15;92(4):304-11.
32. Ito H, Funahashi S, Yamauchi N, Shibahara J, Midorikawa Y, Kawai S, Kinoshita Y, Watanabe A, Hippo Y, Ohtomo T, Iwanari H, Nakajima A, Makuuchi M, Fukayama M, Hirata Y, Hamakubo T, Kodama T, Tsuchiya M, Aburatani H. Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target. *Clin Cancer Res*. 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3257-64.
33. Joo M, Chi JG, Lee H. Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 829-34.
34. Jordan VC. Pak up your breast tumor--and grow! *J Natl Cancer Inst*. 2006 May 17;98(10):657-9.
35. Katoh H, Ojima H, Kokubu A, Saito S, Kondo T, Kosuge T, Hosoda F, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T. Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma: putative therapeutic targets. *Gastroenterology* 2007;133:1475–1486.
36. Kim J, Ki SS, Lee SD, Han CJ, Kim YC, Park SH, Cho SY, Hong YJ, Park HY, Lee M, Jung HH, Lee KH, Jeong SH. Elevated plasma osteopontin levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2006 Sep;101(9):2051-9.
37. Komuta M. et al. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology*. 2008 May;47(5):1544-56
38. Korb T, Schluter K, Enns A, Spiegel HU, Senninger N, Nicolson GL, Haier J. Integrity of actin fibers and microtubules influences metastatic tumor cell adhesion. *Exp Cell Res*. 2004 Sep 10;299(1):236-47.

39. Korita PV, Wakai T, Shirai Y, Matsuda Y, Sakata J, cui X, Ajioka Y, Hatakeyama K. Overexpression of osteopontin independently correlates with vascular invasion and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*. 2008 Aug 11.
40. Libbrecht L. Hepatic progenitor cells in human liver tumor development. *World J Gastroenterol*. 2006 Oct 21;12(39):6261-5.
41. Lim SO, Park SG, Yoo JH, Park YM, Kim HJ, Jang KT, Cho JW, Yoo BC, Jung GH, Park CK. Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, mGRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related Hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J Gastroenterol* 2005;11(14):2072-2079.
42. Litvinov SV, Velders ME Bakker HA, et al. Ep-CAM: A human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 125:437-446, 1994
43. Llovet JM, Schwartz M, Fuster J, Bruix J. Expanded criteria for hepatocellular carcinoma through down-staging prior to liver transplantation: not yet there. *Semin Liver Dis*. 2006 Aug;26(3):248-53.
44. Lopez LJ, Marrero JA. Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol*. 2004 May;20(3):248-53.
45. Mann CD, Neal CP, Garcea G, Manson MM, Dennison AR, Berry DP. Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer*. 2007 Apr;43(6):979-92.
46. Mazzaferro V, Regalia E, Montalto F, Pulvirenti A, Brunetto MR, Bonino F, Lerut J, Gennari L. Risk of HBV reinfection after liver transplantation in HBsAg-positive cirrhosis. Primary hepatocellular carcinoma is not a predictor for HBV recurrence. The European Cooperative Study Group on Liver Cancer and Transplantation. *Liver*. 1996 Apr;16(2):117-22.



47. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996 Mar 14;334(11):693-9.
48. Mizuno H, Ogura M, Saito Y, Sekine W, Sano R, Gotou T, Oku T, Itoh S, Katabami K, Tsuji T. Changes in adhesive and migratory characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC) cells induced by expression of  $\alpha 3\beta 1$  integrin, *Biochim. Biophys. Acta* (2007).
49. Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A, Castagnetta LA. Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **963**: 13-20.
50. Osada T, Sakamoto M, Nagawa H, Yamamoto J, Matsuno Y, Iwamatsu A, et al. Acquisition of glutamine synthetase expression in human hepatocarcinogenesis: relation to disease recurrence and possible regulation by ubiquitin-dependent proteolysis. *Cancer* 1999;85:819-831.
51. Pan HW, Ou YH, Peng SY, Liu SH, Lai PL, Lee PH, Sheu JC, Chen CL, Hsu HC. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2003 Jul 1;98(1):119-27.
52. Parekh P, Rao KV. Overexpression of cyclin D1 is associated with elevated levels of MAP kinases, Akt and Pak1 during diethylnitrosamine-induced progressive liver carcinogenesis. *Cell Bio Int.* 2007 Jan;31(1):35-43.
53. Park KW, Morrison CM, Sorensen LK, Jones CA, Rao Y, Chien CB, Wu JY, Urness LD, Li DY. Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev Biol.* 2003 Sep 1;261(1):251-67.
54. Parfitt JR, Marotta P, Alghamdi M, Wall W, Khakhar A, Suskin NG, Quan D, McAllister V, Ghent C, Levstik M, McLean C, Chakrabarti S, Garcia B, Driman DK.

Recurrent hepatocellular carcinoma after transplantation: use of a pathological score on explanted livers to predict recurrence. *Liver Transpl.* 2007 Apr;13 (4):543-51.

55. Poon TC, Wong N, Lai PB, Rattray M, Johnson PJ, Sung JJ. A tumor progression model for hepatocellular carcinoma: bioinformatic analysis of genomic data. *Gastroenterology.* 2006 Oct;131(4):1262-70.

56. Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2002 Jun;8(3):385-92.

57. Qin LX, Tang Z. Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 2004 Sep;130(9):497-513.

58. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2006 Feb;16(2):79-87.

59. Rayala SK, Kumar R. Sliding p21-activated kinase 1 to nucleus impacts tamoxifen sensitivity *Biomedicine and pharmacotherapy* 61 (2007), 408-411.

60. Ruck P, Wichert G, Handgretinger R, Kaiserling E. Ep-CAM in malignant liver tumours. *J Pathol* 2000; 191: 102-103.

61. Schmelzer E, Reid LM. EpCAM expression in normal, non-pathological tissues. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:3096-100.

62. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and screening. *Semin Liver Dis.* 2005;25:143-154.

63. Sell S. Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Seminars in cell and developmental biology*, Vol. 13, 2002: pp. 419–424.

64. Seth P, Lin Y, Hanai J, Shivalingappa V, Duyao MP, Sukhatme VP. Magic roundabout, a tumor endothelial marker: expression and signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jul 1;332(2):533-41.
65. Suchting S, Heal P, Tahtis K, Stewart LM, Bicknell R. Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration. *FASEB J.* 2005 Jan;19(1):121-3.
66. Sun B, Wu J, Zhang T, Wang C. High-resolution analysis of genomic profiles of hepatocellular carcinoma cells with differential osteopontin expression. *Cancer Biol Ther.* 2008 Mar;7(3):387-91.
67. Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, et al. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2003;94:259-262.
68. Takafuji V, Forgues M, Unsworth E, Goldsmith P, Wang XW. An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2007 Apr 23.
69. Tian B et al. Basement proteins play an active role in the invasive process of human hepatocellular carcinoma cells with high metastasis potential. *J Cancer Res Clin Oncol* 131, 80-6 (2005)
70. Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T, Shuto T, Ogawa M, Tanaka H, Tanaka S, Kaneda K, Hirohashi K. Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. *Cancer Sci.* 2003 Oct;94(10):851-7.
71. Varela M, Forner A, Bruix J. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma prior to transplantation: expertise or failure. *Liver Transpl.* 2006 Oct;12(10):1445-7.
72. Vasiliev JM. Cytoskeletal mechanisms responsible for invasive migration of neoplastic cells. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):425-39.

73. Wang B, Xiao Y, Ding BB *et al.* Induction of tumor angiogenesis by Slit–Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 2003; 4: 19–29.
74. Westerlund A, Hujanen E, Hoyhtya M, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T. Ovarian cancer cell invasion is inhibited by paclitaxel. *Clin Exp Metastasis*. 1997 May;15(3):318-28.
75. Xie H, Song J, Du R, Liu K, Wang J, Tang H, Bai F, Liang J, Lin T, Liu J, Fan D. Prognostic significance of osteopontin in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2007 Feb;39(2):167-72.
76. Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, Budhu A, Zanetti KA, Chen Y, Qin LX, Tang ZY, Wang XW. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: (5). March 1, 2008.
77. Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Iwamoto T, Hirata K, Mizuno A. Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy. *Oral Oncology* (2007) 43, 869– 877.
78. Yao DF, Dong ZZ, Yao M. Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007 Jun;6(3):241-7.
79. Ye QH, Qin LX, Forgues M, et al.: Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2003;4: 416–423.
80. Yuan RH, Jeng YM, Chen HL, Lai PL, Pan HW, Hsieh FJ, Lin CY, Lee PH, Hsu HC. Stathmin overexpression cooperates with p53 mutation and osteopontin overexpression, and is associated with tumour progression, early recurrence, and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol*. 2006 Aug;209(4):549-58.

81. Zekri AR, Hafez MM, Bahnassy AA, Hassan ZK, Mansour T, Kamal MM, Khaled HM. Genetic profile of Egyptian hepatocellular-carcinoma associated with hepatitis C virus Genotype 4 by 15 K cDNA microarray: Preliminary study. *BMC Res Notes*. 2008 Oct 29;1(1):106.
82. Zhang H, Ye QH, Ren N, Zhao L, Wang YF, Wu X, Sun HC, Wang L, Zhang BH, Liu YK, Tang ZY, Qin LX. The prognostic significance of preoperative plasma levels of osteopontin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006 Nov;132(11):709-17.
83. Zhang SM, Sun DC, Lou S, Bo XC, Lu Z, Qian XH, Wang SQ. HBx protein of hepatitis B virus (HBV) can form complex with mitochondrial HSP60 and HSP70. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 829-34.
84. Zhu ZW, Friess H, Wang L, Abou-Shady M, Zimmermann A, Lander AD, et al. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of Hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut* 2001;48: 558-564.

