



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA QUALITÀ, PROGRAMMAZIONE E SUPPORTO STRATEGICO
SETTORE STRATEGIA PER LA RICERCA
U.O. DOTTORATI

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA
MOLECOLARE E CLINICA

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (DIBIMIS)
Settore Scientifico Disciplinare MED/08 - ANATOMIA PATOLOGICA

**Analisi molecolare di carcinomi epatocellulari
istologicamente caratterizzati e correlazioni
eziopatogenetiche**

IL DOTTORE

ELETTRA UNTI

IL TUTOR

**CH.MA PROF.SSA
DANIELA CABIBI**

IL COORDINATORE

**CH.MO PROF.
ANTONINO TUTTOLOMONDO**

CICLO XXXV

A.A. 2022/2023

INDICE

1. OBIETTIVI	3
2. INTRODUZIONE	5
2.1. NAFLD e HCC.....	5
2.2. Classificazione molecolare degli HCC.....	8
2.3. Patogenesi dello HCC correlato a NAFLD.....	11
2.4. Il Ras/Raf/MEK/ERK pathway nello HCC.....	12
2.5. <i>Molecular drivers</i> e possibili target di Medicina di Precisione.....	13
2.6. Anatomia Patologica dell'epatocarcinoma.....	14
2.6.1. Aspetti macroscopici.....	14
2.6.2. Aspetti microscopici.....	14
3. MATERIALI E METODI	16
3.1. Collezione dei casi	16
3.2. Analisi anatomopatologica.....	17
3.3. Analisi molecolare.....	19
3.3.1. Idoneità ed arricchimento.....	19
3.3.2. Estrazione del DNA genomico.....	19
3.3.3. Analisi mutazionale.....	20
3.4. Analisi statistica.....	23
4. RISULTATI	24
4.1. Dati anatomo-clinici.....	24
4.2. Analisi anatomopatologica.....	25
4.3. Analisi molecolare.....	27
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	30
6. BIBLIOGRAFIA	37

1. OBIETTIVI

Il carcinoma epatocellulare (HCC) si caratterizza per una predominante resistenza alla chemioterapia sistemica e, per tale ragione, per diversi anni non ha avuto specifiche opzioni terapeutiche, conducendo ad una prognosi molto scarsa.^{1 2} Dal 2006, una piccola molecola, Sorafenib, ha rivoluzionato il trattamento di questa neoplasia, producendo uno sviluppo di resistenza più tardivo. Tramite l'interazione con diversi *pathway* cellulari, tra cui quelli legati a FGFR, VEGFR, PDGFR, c-KIT e RAF, essa produce l'inibizione della proliferazione cellulare e dell'angiogenesi, nonché l'attivazione dell'apoptosi, nelle cellule neoplastiche.³ Tale inibitore multichinasico è in grado di targhettare oltre quaranta chinasi e tra queste la serina/treonina-chinasi BRAF, afferente alla cascata delle *proteine-chinasi mitogeno-attivate* (MAPK), che rappresenta probabilmente la via di *signalling* intracellulare più studiata nell'ambito dei meccanismi di insorgenza e progressione delle neoplasie umane, specie alla luce dello sviluppo di terapie a *target* molecolare. Anche nell'epatocarcinoma, uno dei *signalling pathway* più studiati e farmacologicamente targhettati è quello RAS/RAF/MEK/ERK (*rat sarcoma virus/ rapidly accelerated fibrosarcoma/ mitogen-activated protein kinase kinase/ extracellular signal-regulated kinase*). Numerose indagini, infatti, hanno mostrato come la cascata chinasica RAS/RAF/MEK/ERK risulti iperattivata e rappresenti uno dei meccanismi di trasduzione del segnale intracellulare maggiormente coinvolti nell'insorgenza e nella progressione del carcinoma epatocellulare.^{4 5 6 7 8} Nonostante la suddetta iperattivazione chinasica (a livello proteico), determinata da iperespressione genica o da meccanismi post-trascrizionali, viene generalmente ritenuto che le mutazioni somatiche (attivanti) dei suddetti oncogeni siano eventi rari nello HCC e che quindi esse non svolgano un ruolo chiave durante l'epatocarcinogenesi e la progressione di malattia.

Per quanto riguarda più in particolare BRAF, inizialmente, le ricerche, principalmente giapponesi e cinesi, evidenziarono una scarsa partecipazione delle mutazioni di questo gene nella eziopatogenesi di questa neoplasia.^{7 9 10}

Successivamente (2017), una indagine di *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA), che includeva n. 363 carcinomi epatocellulari, riportò una prevalenza delle mutazioni di BRAF di solo lo 0.3%.¹¹ In un altro manoscritto, del 2019, usando la tecnologia NGS, su n. 127 HCC sono stati riscontrati soltanto n. 2 casi con alterazione di BRAF (una amplificazione ed una mutazione non-V600), cioè in circa 1.6% dei campioni.¹² Dall'analisi di questi dati ne seguirebbe la riflessione che le alterazioni geniche di BRAF non hanno un ruolo chiave nel processo di epatocarcinogenesi. Ciononostante, alquanto recentemente, alcuni altri studi hanno dimostrato che BRAF gioca invece un ruolo centrale: alcuni Autori, infatti, hanno riportato una prevalenza non trascurabile delle mutazioni di BRAF nello HCC, in grado di determinare iperattivazione della cascata Ras/Raf/MEK/ERK.¹³ Tra questi, Colombino *et al.* hanno evidenziato come l'attivazione mutazionale di BRAF e PIK3CA sia relativamente frequente nella popolazione del Sud Italia affetta da HCC.¹⁴ Da qui, l'ipotesi che probabilmente esistono differenze significative nella distribuzione delle mutazioni di BRAF e quindi nel suo ruolo nella eziopatogenesi dello HCC, verosimilmente legate alle origini geografiche o a motivi razziali.

Ciò premesso, con il presente studio ci si prefigge l'obiettivo di ampliare le conoscenze sull'epidemiologia delle mutazioni somatiche di RAS/RAF nella popolazione del Sud Italia affetta da epatocarcinoma, ed in particolare nel gruppo degli HCC correlati a NAFLD, la cui incidenza è ad oggi in progressiva espansione. La conferma di una non-trascurabile prevalenza di mutazioni in tale gruppo di pazienti nell'area geografica in esame potrebbe infatti avere risvolti traslazionali, in termini di *screening*, di prognosi e di terapie a bersaglio molecolare.

La ricerca di seguito illustrata ha altresì permesso di indagare le caratteristiche anatomopatologiche degli HCC associati a steatopatia non-alcolica (*non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD*) nell'area geografica esplorata, ancora una volta con implicazioni prognostico-terapeutiche a nostro avviso interessanti, arricchendo il panorama delle ricerche scientifiche in tema di NAFLD.^{15 16}

2. INTRODUZIONE

2.1 NAFLD e HCC

Evidenze ormai acclarate mostrano che la steatopatia non alcolica sta rapidamente diventando la principale causa di HCC in Occidente.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) è una dizione “ad ombrello” che copre un ampio spettro di condizioni, tutte caratterizzate da steatosi epatica non secondaria, ovvero insorta in assenza di cause secondarie di “fegato grasso”, tra cui l’abuso alcolico (>30 g/die e >20 g/die rispettivamente per i soggetti di genere maschile e femminile), l’uso prolungato di farmaci steatogenici (corticosteroidi, tamoxifene, ecc), e disordini ereditari (malattia di Wilson, lipodistrofia, ecc).^{17 18} Sebbene un gruppo di esperti internazionali abbia suggerito in anni recenti di aggiornarne la denominazione in *Metabolic Dysfunction Associated Fatty Liver Disease* (MAFLD) per descrivere le patologie epatiche associate a note disfunzioni metaboliche, nella presente trattazione verrà usata la classica designazione di NAFLD.^{19 20} Essa è considerata la manifestazione epatica della sindrome metabolica (MeS); nella maggior parte dei pazienti si osserva l’associazione tra NAFLD e comorbidità metaboliche quali obesità, insulino-resistenza o diabete di tipo 2, dislipidemia e ipertensione. La *Non-alcoholic fatty liver* (NAFL), definita come la sola presenza di almeno il 5% di steatosi epatica, rappresenta la forma non complicata di NAFLD, mentre per *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) si intende la compresenza di almeno il 5% di steatosi e di danno/infiammazione del tessuto epatico, ed essa più spesso si associa a progressione di malattia, con sviluppo di cirrosi e/o di epatocarcinoma.²¹ Più in particolare, NASH è il sottotipo di NAFLD istologicamente definito dalla associazione di steatosi epatica, infiammazione lobulare e *ballooning* epatocellulare.²² Tali aspetti istologici sono simili a quelli riscontrati nella steatoepatite alcolica (ASH) e, come questa, possono progredire in cirrosi o altre complicanze.¹⁸

La prima evidenza in Letteratura dell'associazione tra NAFLD e HCC risale al 1990.²³ L'osservazione iniziale che tale correlazione può talora prescindere dalla presenza di cirrosi è stata formulata da Paradis *et al.* nel 2009, mediante uno studio su n. 128 pazienti sottoposti a resezione epatica per epatocarcinoma.²⁴ La **Tabella 1** riporta gli studi internazionali più importanti condotti da allora, secondo un *paper* del 2021, sul tasso di epatocarcinomi attribuibili a NAFLD e di epatocarcinomi che originano in assenza di cirrosi, in relazione a diverse aree geografiche.²⁵ Secondo una metanalisi condotta ancora più recentemente dal gruppo italiano di F. Petrelli, pubblicata a Maggio 2022, solamente n. 43 *papers* hanno valutato il rischio di HCC in pazienti con steatosi/NASH con o senza cirrosi, la maggior parte dei quali condotti in Asia.²⁶

HCC Cases Attributable to NAFLD				
Region	Investigated Population	Year/Period	Prevalence (%)	Reference
North America Europe Asia-Pacific Africa	Multicentric study with 42 sites included in 14 countries across the world involving 18,031 patients diagnosed with HCC.	2012–2015	12 10 1–6 12–22	[20]
United States	4406 HCC patients identified within a healthcare claims database covering 18 million lives yearly and all US census regions.	2002–2008	58	[19]
United States	26,121 transplanted or waitlisted patients with HCC identified from the Scientific Registry of Transplant Recipients.	2002 2017	2.1 16.2	[21]
United Kingdom	632 HCC patients consecutively presented at the multidisciplinary team covering North East England, Cumbria and North Yorkshire.	2000 2010	<8 34.8	
France	323 consecutive patients who underwent liver resection due to HCC at two tertiary centers in Paris over a 20-year period.	1995–1999 2010–2014	2.6 19.5	[22] [23]
HCC Arising in the Absence of Cirrhosis				
Germany	Systematic review with meta-analysis: 19 studies with 168 571 participants and available data about the presence of HCC among patients with/without cirrhosis; 13,345 patients had NAFLD; overall prevalence of HCC in non-cirrhotic NAFLD was 38%.	2007–2008	41.7	
United States		2000–2010	26.9	
Japan		2006–2009	38	[24]
Germany		1994–2013	13.9	
South Korea		2005–2012	34.3	

Tab.1. Studi condotti sul tasso di epatocarcinomi attribuibili a NAFLD e di quelli che originano in assenza di cirrosi, in relazione a diverse aree geografiche.

A questo punto, sembra utile riportare qualche dato epidemiologico.

Il tasso di incidenza del carcinoma epatocellulare è cresciuto nelle ultime tre decadi e ci si attende un *trend* simile almeno sino al 2030, in parallelo alla diffusione della “pandemia silente” dell’obesità.²⁷ L’organizzazione Mondiale della Sanità (*World*

Health Organization, WHO) ha dichiarato nel 2015 che l'HCC rappresentava la quinta causa di morte per cancro.²⁸ L'*Osservatorio Globale sul Cancro* nel 2018 ha riportato il carcinoma epatico come il sesto più comune cancro nel mondo e la quarta causa di morte cancro-relata.²⁹ Il più alto tasso di incidenza si osserva in Africa, Cina e Sud Est Asiatico.⁶⁶

Oltre il 90% dei casi di HCC occorre in un *setting* di epatopatia cronica o di esposizione cronica a sostanze esogene, e la cirrosi, da qualsiasi eziologia, è il maggiore fattore di rischio.^{30 31} Gli altri più frequenti fattori di rischio di HCC sono l'infezione cronica da HBV o HCV, alcool e NAFL/NASH. Grazie alla diffusione dei vaccini e delle terapie antivirali, il rischio di HCC legato ai virus epatitici si è ridotto negli ultimi anni, sebbene l'infezione da HCV rimanga la principale causa di epatocarcinoma negli USA (50% degli HCC) ed in altri paesi.³²

NAFL/NASH hanno una prevalenza globale del 24%, con il tasso più elevato in Sud America e nel Medio Oriente (30-35%).³³ E' stato stimato che sino al 25% delle NAFLD può progredire in NASH e che sino al 20% dei pazienti affetti da NASH progrediscono in cirrosi ed altre complicanze, quali il carcinoma epatico.^{34 35} La cirrosi come conseguenza di NAFLD sta divenendo la principale causa di trapianto di fegato in molte aree del mondo.^{18 36} La frequenza dei casi di HCC correlati a NASH è rapidamente aumentata, rappresentando correntemente il 15-20% dei casi in Occidente ed attestandosi così al quarto posto tra le cause di HCC.^{37 38} Al 2030, ci si aspetta un ulteriore incremento di incidenza e prevalenza di HCC NAFLD-associato, del 44-122% e 47-120% rispettivamente.³⁹

Molteplici ricerche hanno dimostrato che circa un terzo degli HCC NASH-associati occorre in assenza di cirrosi, sebbene tale percentuale vari nei diversi studi scientifici, anche in relazione all'area geografica, con i più alti valori riportati in un lavoro americano ed in uno cinese (rispettivamente 58% e 69.8%).^{17 40 41 103}

In un prossimo futuro probabilmente NAFLD diventerà la prima causa nel mondo di cirrosi e HCC. La razza, l'età avanzata, il diabete e l'obesità rappresentano i principali fattori di rischio di progressione da NAFLD a HCC, e ciò può occorrere in una significativa proporzione di pazienti, anche in assenza di cirrosi.⁴⁰ Di conseguenza, per meglio stratificare il rischio di HCC in questi soggetti,

specialmente se non cirrotici, è importante comprendere la patogenesi ed identificare i fattori di rischio associati alla progressione di malattia.

2.2 Classificazione molecolare degli HCC

Analisi comprendenti profilazioni genomiche, trascrittomiche e/o epigenetiche hanno condotto alla formulazione di svariate classificazioni molecolari del carcinoma epatocellulare, che sono state variamente integrate con dati istologici, immunologici e clinici. Le distinte classi molecolari riflettono un *background* biologico differente con potenziali implicazioni prognostiche e terapeutiche per i pazienti. Prescindendo dalla nomenclatura utilizzata, le suddette classificazioni sono in genere accomunate dalla distinzione degli HCC in due classi principali.^{11 40 42 43}

La *classe non-proliferativa* è caratterizzata geneticamente da stabilità cromosomica e tasso più elevato di mutazioni del promotore di TERT. Essa corrisponde a *iCluster2* della classificazione di *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*. Tale classe molecolare può essere ulteriormente divisa in due sottoclassi: la prima sottoclasse è legata all'attivazione del canonico *pathway* di *WNT*, spesso dovuta a mutazione di *CTNNB1*, che codifica per la β -catenina. La seconda sottoclasse si caratterizza per l'iperattivazione del *signalling pathway* IL6-JAK-STAT (*IFN α signaling*). Più in generale, la classe non-proliferativa mostra clinicamente una minore aggressività, documentata anche a livello istologico: elevato o medio grado di differenziazione ed invasioni vascolari meno frequenti; a ciò si aggiungono inoltre i bassi livelli sierici di alfafetoproteina (AFP) generalmente osservati. Dal punto di vista eziologico, questi HCC sono correlati ad infezione da HCV od a steatoepatite alcolica o non-alcolica.

La *classe proliferativa* è caratterizzata geneticamente da alta instabilità cromosomica, frequenti mutazioni inattivanti di TP53 e overespressione di geni del ciclo cellulare. Dal punto di vista delle cascate di segnale intracellulare, si caratterizza per l'attivazione di RAS-MAPK, MET, PI3K-AKT-mTOR, e IGF. Anche questo gruppo può essere sottoclassificato: il sottogruppo *S1* (che corrisponde a *iCluster3* della classificazione di *TCGA*) vede l'attivazione non canonica di *Wnt (Wnt-TGF β)*;

il sottogruppo *S2* (che corrisponde a *iCluster 1* della classificazione di *TCGA*) mostra un fenotipo di *gene expression* molto simile alle cellule progenitrici, evidenziato da un'iper-espressione dei marcatori di staminalità CK19, AFP ed EPCAM. Più in generale, la classe proliferativa comprende HCC più aggressivi, sia clinicamente che istologicamente, per la presenza di scarso grado di differenziazione, frequenti invasioni vascolari e maggiori livelli di AFP. Infine, dal punto di vista eziologico, si ha frequentemente l'associazione con HBV.

Un'ulteriore classificazione molecolare, che si basa sullo stato immunitario del microambiente tumorale, tramite l'analisi di profili di espressione genica infiammatori, dell'infiltrato infiammatorio e delle molecole regolatorie, prevede la classificazione degli HCC in due gruppi. La *classe immune* è caratterizzata da elevati livelli di infiltrazione ad opera di cellule della flogosi, espressione dell'asse PD1/PD-L1, attivazione del *signalling* dello IFN γ e marcata attività citolitica. Essa comprende una *sottoclasse immuno-attiva* ed una *sottoclasse immuno-esausta*. Nella prima si osserva un ricco infiltrato infiammatorio di linfociti T Helper (CD4+) e citotossici (CD8+), con una risposta adattativa T-cellulare efficace e con responsività agli immunoterapici; nella seconda, invece, il TGF β media l'immunosoppressione, mediante "esaurimento funzionale" dei linfociti T/CD8+, per cui si osserva un infiltrato infiammatorio povero in linfociti T/CD4+, ricco in linfociti T/CD8+ PD1+ esausti ed in macrofagi M2. L'altra categoria principale di HCC è poi quella c.d. *immuno-esclusa*, in cui si osserva la "esclusione" dei linfociti T effettori, con un infiltrato infiammatorio T-cellulare scarso. E' stato proposto che quest'ultima classe sia primariamente resistente agli immunoterapici.⁴⁴ Per precisione, è bene ricordare il ruolo immunosoppressivo dei linfociti T-regolatori (T_{reg}), spesso presenti in alcune delle classi immunologiche di HCC descritte, essendo essi responsabili dello esaurimento funzionale dei linfociti T/CD8+ citotossici (mediante la secrezione di TGF β) nel gruppo immuno-esausto e di mancati proliferazione e reclutamento degli stessi nel gruppo immuno-escluso.

Volendo sovrapporre le classificazioni fin qui illustrate, si può affermare che la *sottoclasse immuno-esausta* per lo più corrisponde alla *sottoclasse S1 (iCluster3)* del gruppo *proliferativo*; la *classe immuno-esclusa* si sovrappone con la *sottoclasse*

CTNNB1-mutata del gruppo *non-proliferativo*; infine, la *classe immuno-attiva* coincide in genere con la *sottoclasse dell'IFN signaling* del gruppo *non-proliferativo*. La **Figura 1** riassume e schematizza le classificazioni sin qui esposte, integrando i dati genetici, molecolari, cellulari ed anatomo-clinici.

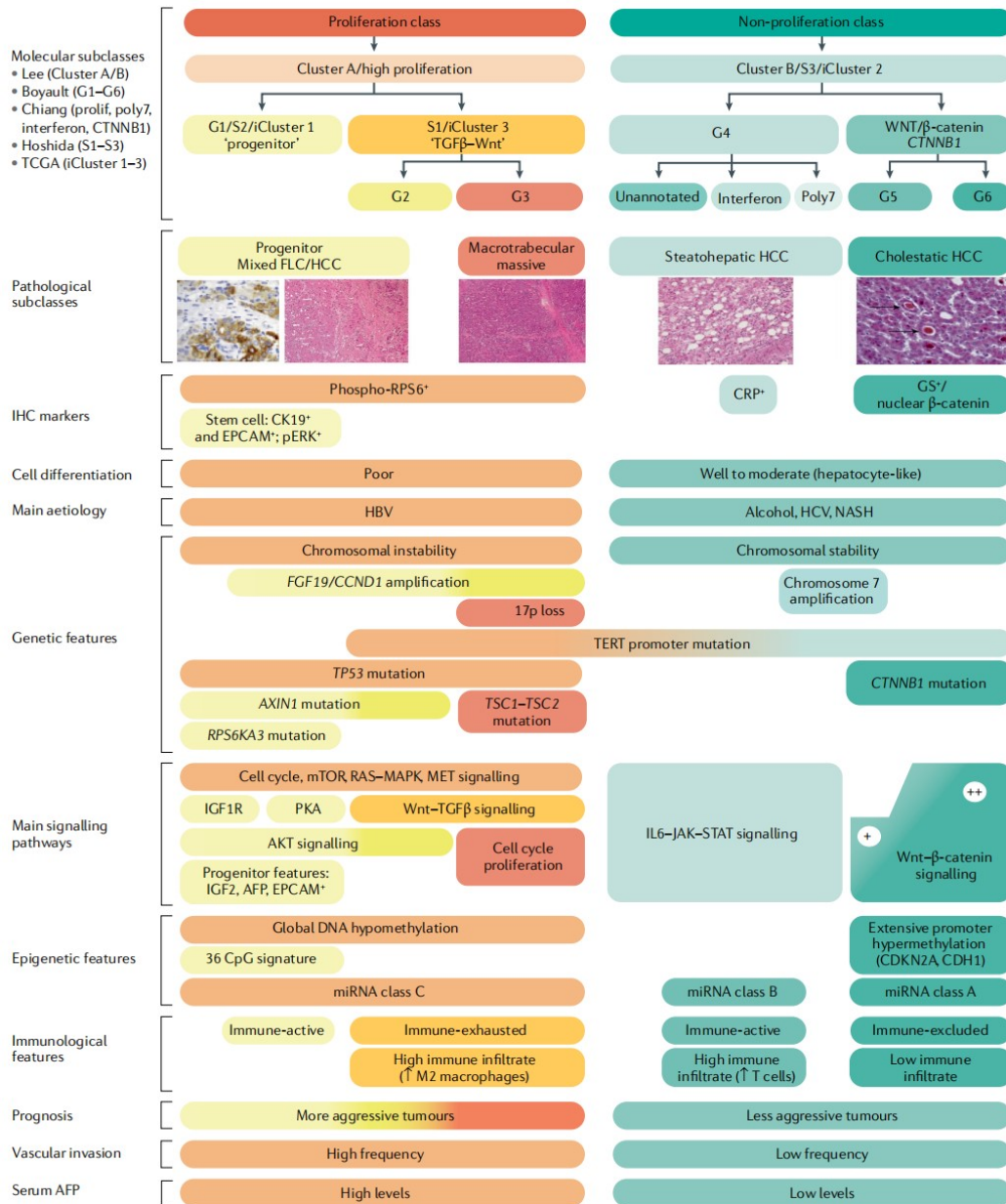


Fig.1. Classificazione molecolare dello HCC: lo schema illustra la correlazione tra classi molecolari e caratteristiche genomiche, morfologiche e cliniche.⁴⁰

2.3 Patogenesi dello HCC correlato a NAFLD

Il carcinoma epatocellulare origina principalmente dalla trasformazione maligna di noduli preneoplastici/displastici, in un processo *multistep*. Tuttavia, la carcinogenesi epatica legata a NAFLD è in qualche modo peculiare, in quanto, come accennato sopra, il carcinoma può occorrere in assenza di una sottostante cirrosi, sebbene rimanga salda l'evidenza di una chiara associazione tra la severità della epatopatia e l'insorgenza di HCC.⁴⁵ Sebbene i meccanismi coinvolti nell'eziopatogenesi del cancro NAFLD-correlato non siano del tutto conosciuti, è ben noto che essi si vanno via via sommando durante il decorso dell'epatopatia cronica. Tra questi, in breve, lo stato di infiammazione cronica di basso livello, insieme alla sindrome metabolica, e specialmente all'obesità, giocano un ruolo chiave nello sviluppo di insulino-resistenza, attraverso il rilascio di citochine pro-infiammatorie (tra le altre: TNF-alfa, IL6) e l'attivazione di specifiche vie di segnale intracellulare (JNK, JAK2/STAT3 e PI3K/Akt).⁴⁶ La riprogrammazione metabolica epatica che ne consegue, unita ad un siffatto ambiente infiammatorio cronico, inducono stress ossidativo negli epatociti, con conseguente danno del DNA, che sta alla base dell'oncogenesi.¹⁰⁸

Va poi fatto un accenno al substrato genetico germinale che predispone allo sviluppo di HCC nella popolazione affetta da NAFLD, con riferimento ai polimorfismi di geni che codificano per proteine coinvolte nella regolazione del metabolismo lipidico epatico (PNPLA3, TM6SF2, ecc.) o nell'immunità (IFNL3/4, ecc.).⁴⁷ ¹⁰⁸ Sulla base dei genotipi, sono stati creati vari sistemi di predizione del rischio di progressione delle NAFLD a epatocarcinoma, talvolta integrati da variabili cliniche (età, genere, ecc.), ma questo argomento esula dagli scopi della presente tesi.

C'è infine una componente genetica somatica nei NAFLD-HCC, relativa ad alterazioni del genoma che sono conseguenza di processi mutazionali che hanno luogo nei soli epatociti neoplastici. Una media di 40-60 alterazioni genetiche somatiche sono presenti nella sequenza codificante di ciascun genoma di HCC e spesso con una distribuzione correlata alla eziopatogenesi.¹⁰⁸ Pochi dati sono ancor oggi disponibili circa il profilo genomico dell'epatocarcinoma umano correlato a

NAFLD. Alcuni dati di sequenziamento sull'intero genoma non hanno rilevato uno specifico *pattern* genomico nei NAFLD-HCC, sebbene un recente studio ha mostrato come il profilo mutazionale e trascrittomico dei NASH-HCC sembri essere simile agli HCC alcool-relati.⁴⁸

2.4 II RAS/RAF/MEK/ERK pathway nello HCC

La cascata delle MAP-chinasi consiste in un'attivazione a catena di serina/treonina-chinasi, in grado di convertire molecole extracellulari, quali fattori di crescita, ormoni e simili, in segnali intracellulari, che attraverso il citoplasma giungono al nucleo, dove regolano proliferazione, differenziazione e sopravvivenza della cellula.^{49 50} Sono quattro le proteine *core* nella cascata delle MAPK: RAS/RAF/MERK/ERK. Esse appartengono a famiglie multigeniche. Tra queste, RAS comprende tre membri (Ki-Ras, N-Ras e Ha-Ras); RAF altrettanti (A-Raf, B-Raf e Raf-1); MEK cinque (MEK1, MEK2, MEK3, MEK4 and MEK5); ERK quattro (JNK1/2/3, ERK1/2, ERK5 e p38 MAPK). L'attivazione del *pathway* di segnale Ras/Raf/MEK/ERK è iniziata dal legame del dominio extracellulare del recettore tirosino-chinasico al proprio ligando, evento che scatena una serie di reazioni, che in ultimo portano all'attivazione, per fosforilazione, della proteina RAS.⁵¹ Questa recluta sulla membrana RAF, che, attivandosi, fosforila MEK, che a sua volta fosforila ERK1/2. ERK diventa così in grado di generare una serie di effetti che si traducono nella regolazione della trascrizione genica a livello nucleare, con conseguente modulazione dell'espressione di proteine coinvolte nei processi di crescita e differenziazione cellulari. I membri della famiglia ERK sono in grado altresì di retroagire, fosforilando le proteine-chinasi a monte, regolandone così, in incremento o in riduzione, l'attività.⁸⁸

Una grossa quantità di studi dimostrano che il *pathway* delle MAPK è iperattivato o iperespresso nell'epatocarcinoma. Il meccanismo che si trova alla base di tale iperattivazione/iperepressione non è del tutto chiarito, sebbene sia ormai acclarato che l'attivazione costituzionale del recettore tirosino-chinasico è un evento chiave,

come suggerito dal frequente riscontro nello HCC di incrementati livelli di espressione dei recettori EGFR, FGFR, PDGF, IGFR, VEGFR e c-Met.⁸⁸

2.5 Molecular driver e possibili target di Medicina di Precisione nello HCC

Diverse caratterizzazioni molecolari hanno portato alla luce le alterazioni genetiche somatiche più frequenti durante l'epatocarcinogenesi, tra cui mutazioni *drivers* (promotore di TERT, TP53 e CTNNB1), aberrazioni cromosomiche (perdita di 1q e 8p e *high-level gains* di 11q13 e 6p21) e *pathway* deregolati (RAS–MAPK, WNT, mTOR, o IGF2 *signalling*, tra gli altri).^{40 52 53 54} Il resto delle alterazioni genomiche somatiche occorrono con più bassa frequenza e coinvolgono oncogeni ed oncosoppressori quali EGFR, MYC, APC, ATM, CDK6, ERBB2, RAF1, BRCA1, FGFR1, IGFR, VEGFR, ALK, PIK3CA/PTEN, KRAS e BRAF.⁵⁵ Molti di questi geni sono potenzialmente targhettabili. Tuttavia, gli avanzamenti fatti fino ad oggi nella comprensione dei suddetti meccanismi molecolari non sono ancora stati traslati in terapie “di precisione”, che siano cioè guidate da biomarcatori predittivi di risposta terapeutica. Tralasciando la possibilità di arruolamento in *trial* clinici e il ruolo della alfafetoproteina come marcatore predittivo di risposta ad alcuni farmaci, infatti, l'impiego di inibitori multi-chinasici o di immunoterapici nella *routine* clinica non prevede test predittivi molecolari.^{40 56} Così, sussiste l'urgente necessità di implementare per il carcinoma epatocellulare le terapie basate sul genoma. Sfortunatamente, a differenza di numerosi altri tumori per i quali la “medicina di precisione” è pratica consolidata, nell'epatocarcinoma solo il 25% circa delle alterazioni genomiche, considerate nel complesso, risultano essere potenzialmente targhettabili, e di conseguenza sono pochi i *trial* con *driver* molecolari come marcatori di risposta terapeutica.^{43 53 57 58} Tra questi, appare utile annoverare gli studi di fase 2 con il MEK-inibitore refametinib, o con refametinib più sorafenib, in pazienti con epatocarcinoma RAS-mutato in stadio avanzato, e lo studio di fase 3 su una seconda linea di trattamento in HCC MET-high.^{40 59 60 61}

2.6 Anatomia Patologica dell'epatocarcinoma

2.6.1 Aspetti macroscopici

Fino in un 30% dei casi, gli HCC possono presentarsi con tumori multipli, chiaramente separati. Altre volte, invece, si hanno noduli satelliti, che rappresentano una forma di diffusione locale della neoplasia, per lo più attraverso le venule portali. Essi sono variamente definiti in Letteratura, sebbene generalmente vengano considerati tali i piccoli noduli in stretta prossimità (<2 cm) alla massa principale.⁴² Singole masse di HCC possono presentarsi sottoforma di cinque distinti *pattern* macroscopici: vagamente nodulare (lesione con margini indistinti); nodulare espansivo (nodulo rotondo con margini ben distinti); multinodulare confluyente (cluster di piccoli noduli confluenti); nodulare con estensione perinodulare (crescita extranodulare per <50% della circonferenza); infiltrativo (crescita extranodulare per >50% della circonferenza).⁶²

2.6.2 Aspetti microscopici

La tipizzazione istologica degli epatocarcinomi si basa sulla valutazione dei *pattern* di crescita architetturale, che comprendono il tipo (micro-)trabecolare, macrotrabecolare, pseudoghiandolare (pseudoacinare) e compatto (solido). In oltre il 50% dei casi si osserva comunque una crescita mista, usualmente trabecolare più uno o due ulteriori *pattern*.⁶⁶

Qualsiasi *pattern* microscopico di crescita può essere osservato nell'ambito di ciascuna specifica eziologia di HCC e non è ritenuto necessario che essi vengano descritti nella diagnosi istopatologica.⁶⁶

Anche gli aspetti citologici spesso coesistono all'interno di una stessa lesione tumorale. Essi includono cellule chiare, *fatty change*, colestasi, cellule pleomorfe, ecc.

La differenziazione istologica può essere graduata secondo diversi sistemi: i più usati sono i quattro gradi di *Edmondson e Steiner* ed i tre gradi *WHO*.⁶⁶

Stando alla *Classificazione WHO 2019*, circa il 35% di tutti gli HCC può essere distinto in specifici sottotipi istologici (steatoepatitico, scirroso, cellule chiare, fibrolamellare e così via), che rappresentano specifiche entità clinico-patologiche e molecolari. Tra questi, la forma steatoepatitica (HCC-steatoepatitico) è frequentemente riscontrata in un contesto di NASH e sindrome metabolica, sebbene si possa osservare in associazione ad altre eziologie.¹⁰⁸ Tale variante si distingue per la presenza di diffuso infiltrato infiammatorio, *ballooning* epatocitario, fibrosi pericellulare e corpi di Mallory-Denk.⁶³ A livello molecolare, è caratterizzata da un importante coinvolgimento dello *IL-6/AKT/STAT signaling pathway* coinvolto altresì nella transizione da NAFL a NASH.¹⁰⁸ Lo HCC-steatoepatitico mostra un profilo di espressione genica simile a quello del fegato non-tumorale e, a livello morfologico, è spesso ben differenziato.⁶⁴ Anche macroscopicamente, infine, si possono delineare tratti tipici in questa variante di carcinoma epatocellulare: generalmente, infatti, se comparata agli altri sottotipi, è più spesso nodulare, singola, ben circoscritta e giallastra (in relazione alla steatosi).⁶⁵ La **Figura 3** e la **Figura 4**, a pagina 26, mostrano rispettivamente una foto macroscopica e microscopica di un caso di HCC-steatoepatitico della nostra serie.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Collezione dei casi

Mediante la consultazione dei *database* della U.O.C. di Anatomia Patologica dell'A.R.N.A.S. Civico di Palermo, centro ad alto volume per la chirurgia epatica, sono stati retrospettivamente selezionati soggetti adulti sottoposti a chirurgia resettiva per epatocarcinoma che fossero altresì in possesso del dato anamnestico (clinicamente riferito o presente nello stesso archivio della U.O.C. di Anatomia Patologica) della coesistenza di NAFLD (NAFL o NASH), con o senza cirrosi. La diagnosi di NAFL/NASH si basava: sull'evidenza di steatosi epatica documentata all'*imaging* o istologicamente; su un'eventuale assunzione di alcool <30g/die o <20g/die, rispettivamente per i soggetti di genere maschile e femminile; sull'appropriata esclusione di altre malattie epatiche (HBV, HCV, ecc.). La diagnosi di cirrosi è stata prodotta istologicamente o clinicamente, al momento della diagnosi di HCC o in tempi pregressi.

Si è proceduto con la revisione dei vetrini di ciascun caso, già allestiti in fase di diagnostica, colorati in ematossilina-eosina, analizzandone gli aspetti morfologici in dettaglio, secondo criteri *WHO 2019*.⁶⁶ Si sono selezionati n. 15 casi-paziente, anche in base alla adeguata disponibilità di tessuto paraffinato presente in archivio.

Si è passati poi ad arruolare altrettanti (n. 15) soggetti portatori di HCC-non NAFLD associato, insorto su epatopatia cronica non correlata a NAFLD, anche in questo caso con o senza cirrosi epatica.

Si sono esclusi dallo studio i casi di HCC di tipo criptogenetico, poichè, come è ormai risaputo, tali casi sono spesso forme misconosciute di epatocarcinoma NAFLD-correlato e le cirrosi criptogenetiche oggi sono per la gran parte considerate forme "burned out" di NAFLD.⁶⁷

Volendo dettagliare le caratteristiche clinico-patologiche della coorte di pazienti arruolati (n. 30), la **Tabella 2** riporta i criteri di inclusione ed esclusione.

Tutti i campioni sono stati resi anonimi, mediante l'assegnazione di un codice identificativo.

Criteri di inclusione	✓ Età >18 anni
	✓ Origine autoctona
	✓ Diagnosi istopatologica di carcinoma epatocellulare sec. WHO 2019.
	✓ Diagnosi di NAFL o di NASH, con o senza cirrosi (gruppo NAFLD-HCC)
	✓ Altre epatopatie croniche, con o senza cirrosi (gruppo non-NAFLD-HCC)
Criteri di esclusione	✓ HCC criptogenetico
	✓ Altre tipologie di cancro epatico primitivo (colangiocarcinoma intraepatico, epato-colangiocarcinoma, carcinoma indifferenziato) o metastasi.
	✓ HCC fibrolamellare
	✓ Altra neoplasia epatica sincrona (primitiva o metastasia)
	✓ Circostanze speciali note, quali MICI, altre neoplasie a distanza, ecc.
	✓ Assenza dei criteri di inclusione

Tab.2. Criteri di inclusione ed esclusione dello studio.

3.2 Analisi anatomopatologica

Sono stati retrospettivamente analizzati un totale di $n=30$ resecati chirurgici relativi a carcinomi epatocellulari, insorti ($n=15$) o meno ($n=15$) su NAFLD.

Per ogni caso, sono stati rivalutati, ed istologicamente confermati, i preparati già allestiti in fase di diagnostica, comprendenti sezioni di circa 4 micrometri di spessore allestite a partire da inclusioni in paraffina di tessuto neoplastico, relative ai resecati chirurgici epatici, dopo adeguata fissazione in formalina. La revisione microscopica

delle suddette sezioni, colorate con ematossilina-eosina, tricromica di Masson, reticolo o con eventuale immunocolorazione, ha permesso di selezionare i campioni più rappresentativi.

Le valutazioni istologiche sono state effettuate con il microscopio ottico Leica DM2000 (obiettivi: PLAN 4X/0.65, PLAN 10X/0.10, HI PLAN 20X/0.40, HI PLAN 40X/0.65, HI PLAN 63X/0.75 e PL FLUOTAR 100X/1.30). Le microfotografie digitali sono state acquisite con il dispositivo MC120 HD (Leica Microsystems).

Per ciascun resecato sono state valutate le seguenti caratteristiche tumorali: taglia della neoplasia, numero di lesioni neoplastiche, grado di differenziazione, invasioni microvascolari, necrosi, conta mitotica e mitosi atipiche.

La taglia della neoplasia si basava sulla massima dimensione del tumore riportata nella descrizione macroscopica. Nel caso in cui fossero presenti due o più lesioni tumorali, si è considerata la massima dimensione del nodulo maggiore. Si sono considerate lesioni multiple i noduli discreti, chiaramente separati tra loro, escludendo eventuali noduli satelliti.

Il grado di differenziazione della neoplasia (grado istologico tumorale) è stato calcolato secondo criteri *WHO 2019*, suddiviso in 3 gradi e basato sul rapporto nucleo-citoplasmatico, sulla eosinofilia/basofilia del citoplasma e sul pleomorfismo nucleare. Qualora fosse presente più di un grado istologico, è stato considerato quello peggiore.

La presenza/assenza di invasioni microvascolari è stata definita sulla base del riscontro microscopico di emboli tumorali negli spazi vascolari delimitati da endotelio, identificati nei setti fibrosi capsulari o non-capsulari o nel parenchima circostante il tumore (vena centrale, vena portale, ecc).

La necrosi è stata categorizzata come presente /assente.

La conta mitotica, manuale, è stata effettuata selezionando la sezione tissutale migliore per ciascun caso (per esempio, che contenesse almeno 1000 cellule tumorali valutabili) e, nell'ambito di questa, escludendo le aree di tessuto epatico normale ed osservando dieci campi ad alto ingrandimento (HPF) a distribuzione *random*, al fine

di ottenere un valore che fosse rappresentativo dell'intera sezione. L'indice mitotico è stato categorizzato in *alto*= >10/10HPF o *basso*= <10/10HPF.

Le mitosi atipiche sono state categorizzate come *presenti/assenti*.

La diagnosi istopatologica di NASH si basa sulla presenza di steatosi (superiore al 5%), infiammazione lobulare e degenerazione epatocitaria del tipo *balloning* con una prevalente distribuzione nella zona 3. Altri aspetti morfologici possono associarsi (infiammazione portale, corpi di Mallory-Denk, megamitocondri, ecc.), ma essi non sono ritenuti necessari a stabilire la diagnosi di NASH.

3.3 Analisi molecolare

3.3.1 Idoneità ed arricchimento

Per l'analisi mutazionale è stato isolato il DNA genomico da campioni di tessuto tumorale fissati in formalina ed inclusi in paraffina (*formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE*). Durante la valutazione dell'idoneità per l'analisi molecolare di ciascun campione, sono state scelte inclusioni con una cellularità neoplastica minima del 50%, indagata microscopicamente su sezioni di ematossilina-eosina.

Selezionato per ciascun resecato epatico il campione più idoneo di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina, si sono allestite n. 4 sezioni in bianco dello spessore di circa 10 micrometri. Si è proceduto quindi allo "arricchimento" dei campioni, mediante macrodissezione delle aree neoplastiche più idonee all'analisi molecolare, scartando, per esempio, le aree necrotiche o quelle colestasiche.

3.3.2 Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto mediante il *QIAamp DNA FFPE Tissue kit* (*Qiagen GmbH, Hilden, Germany*), come da manuale d'uso.

Il DNA estratto è stato quantificato utilizzando lo spettrofotometro *QIAXpert System* (*Qiagen GmbH, Hilden, Germany*), in grado di quantificare acidi nucleici e DNA.

3.3.3 Analisi mutazionale

L'analisi mutazionale dei geni KRAS ed NRAS è stata effettuata mediante tecnologia *Pyrosequencing* (sistema *PyroMark Q24*) tramite *Therascreen KRAS Pyro Kit* e *RAS Extension Pyro Kit* (*QIAGEN GmbH, Hilden*), utili per la rilevazione quantitativa delle seguenti mutazioni:

KRAS esone 2 (codone 12/13); esone 3 (codone 59/61); esone 4 (codone 117/146);
NRAS esone 2 (codone 12/13); esone 3 (codone 59/61); esone 4 (codone 117/146).

L'analisi mutazionale del gene BRAF è stata effettuata mediante tecnologia *Real-Time PCR* (Sistema *QIAGEN Rotor-Gene Q*) tramite *Therascreen BRAF RGQ PCR Kit* (*QIAGEN GmbH, Hilden*), utile per la valutazione qualitativa delle mutazioni del codone 600 del gene.

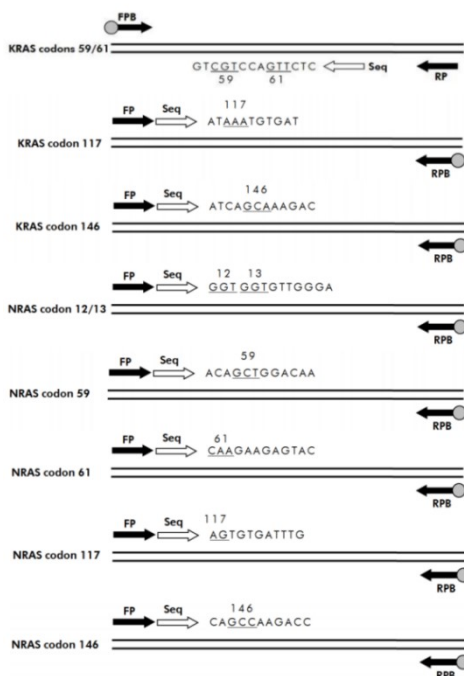


Fig.2. Assay del Kit *Therascreen RAS Extension Pyro*.⁶⁸

Come mostra la **Figura 2**, i kit *Therascreen RAS e RAS Extension Pyro* permettono di amplificare le regioni dei geni di interesse separatamente, tramite PCR, e di sequenziarle lungo tutta la regione predefinita. Il sistema comprende una miscela di *primer* per PCR e un *primer* di sequenziamento per ogni *assay*. Dopo l'esecuzione della PCR, i *primer* vengono indirizzati sulla regione di interesse e gli ampliconi vengono immobilizzati sui grani di streptavidina (*Streptavidin Sepharose® High Performance*). Dopo preparazione di DNA a filamento singolo, si assiste all'*annealing* dei *primer* di sequenziamento con il DNA. I codoni 12, 13, 117 e 146 del gene KRAS e i codoni 12/13, 59, 61, 117 e 146 del gene NRAS vengono sequenziati nella direzione *forward*, mentre l'*assay* per il codone 59/61 del gene KRAS avviene nella direzione inversa (*reverse*). A questo punto, i campioni vengono analizzati sul sistema PyroMark Q24. Le mutazioni nella regione di interesse, qualora presenti, generano *pattern* distinti su un pirogramma, che vengono confrontati, per ciascun codone, con tracciati-modello ottenuti da campioni *wild-type* e mutati. La **Tabella 3** riporta alcune delle mutazioni rilevate dal *Therascreen RAS Extension Pyro Kit*, con le relative sequenze di analisi dei codoni indagati.

Nucleic acid substitution	Amino acid substitution	Sequence to analyze	Cosmic ID (V70)*
KRAS codon 59 (GCA)			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
KRAS codon 61 (CAA)			
183A>C	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTCTHGACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTCTHGACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTT S ACCTGCTGT	550
KRAS codon 117 (AAA)			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519
KRAS codon 146 (GCA)			
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAGBAAAGA	19900

* From the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, available online at the Sanger Institute at www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Tab.3. Comuni mutazioni del gene umano KRAS rilevate dal *Therascreen RAS Extension Pyro Kit* con le rispettive sequenze di analisi e *Cosmic ID*.

Grazie all'uso delle tecnologie ARMS® (*Amplification Refractory Mutation System*, sistema di mutazioni refrattarie all'amplificazione) e Scorpions®, il *Kit Therascreen BRAF RGQ PCR* consente di individuare nel codone 600 dell'oncogene BRAF le mutazioni riportate in **Tabella 4**, in un fondo di DNA genomico *wild-type*, tramite PCR Real-time. Il *kit* include cinque saggi:

- ✓ un saggio di controllo (miscela della reazione di controllo: CTRL);
- ✓ quattro saggi di mutazione (V600E/Ec, V600D, V600K, V600R).

Il saggio V600E/Ec rileva entrambe le mutazioni V600E e V600Ec pur senza distinguerle. Mediante tecnologia ARMS®, che si serve della Taq DNA polimerasi (*Taq*), viene eseguita un'amplificazione selettiva di specifiche sequenze mutate, anche nei campioni in cui prevalgono le sequenze non mutate. Quando il *primer* è

perfettamente appaiato, l'amplificazione procede con la massima efficienza; quando la base in 3' presenta un appaiamento errato, si osserva, invece, soltanto un'amplificazione di basso livello (**Figura 7**). La tecnologia Scorpions® consente di rilevare il risultato dell'amplificazione: una sonda fluorescente legata al *primer* possiede un fluoroforo associato a un *quencher* che riduce la fluorescenza. Durante la PCR, con il legame della sonda all'amplicone, il fluoroforo ed il *quencher* si separano e si ha un aumento misurabile dell'emissione della fluorescenza.

Mutazione	Cambiamento delle basi	ID COSMIC
V600E	GTG>GAG	476
V600E complessa	GTG>GAA	475
V600D	GTG>GAT	473
V600K	GTG>AAG	474
V600R	GTG>AGG	477

* La fonte degli ID COSMIC è il Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

Tab.4. Comuni mutazioni del gene umano BRAF rilevate dal *Therascreen BRAF RGQ PCR Kit* con le rispettive sequenze di analisi e *Cosmic ID*.

3.4 Analisi statistica

L'analisi dei dati (clinici, macroscopici, morfologici e di biologia molecolare) raccolti è stata effettuata con l'ausilio del *software* Microsoft Excel, per la tabellazione dei dati.

La comparazione statistica dei dati, al fine di valutare la possibile associazione tra caratteristiche cliniche, patologiche e molecolari, è stata effettuata mediante *software* SPSS, servendosi del *Test di Mann-Whitney* e del *Test di Spearman*.

I risultati dei test sono stati considerati statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Dati anatomico-clinici

La coorte retrospettiva in studio comprendeva i campioni istologici di HCC appartenenti a trenta soggetti autoctoni i cui riferimenti erano stati estrapolati, mediante sistema gestionale, dall'Archivio della U.O.C. di Anatomia Patologica dell'A.R.N.A.S. Civico di Palermo, dopo selezione della casistica alla luce dei criteri esposti nella sezione "Materiali e Metodi".

Le caratteristiche anatomico-cliniche salienti della popolazione in studio, con rispettivi *p-value*, sono riportate nella **Tabella 5**.

I pazienti del gruppo HCC NAFL/NASH-associato (NAFLD-HCC) erano più anziani al momento della diagnosi dei soggetti afferenti al gruppo degli HCC-non NAFL/NASH correlati: età media rispettivamente di anni 70 (SD 9) e 58 (SD 14).

Nel gruppo degli HCC NAFLD-associati si è osservata una maggiore rappresentanza del genere maschile, con valori percentuali che si attestavano allo 80% ($n=12$), rispetto al 60% ($n=9$) del gruppo degli HCC-non NAFLD associati.

I casi di HCC insorti su cirrosi rappresentavano il 60% ($n=9$) per i NAFLD-HCC. Tale valore risultava essere inferiore rispetto agli HCC da altra eziologia (93.3%, $n=14$).

I risultati relativi alle restanti variabili indagate, più specificatamente anatomico-patologiche, verrà descritto nella sezione successiva.

Tab.5. Risultati dell'analisi dei dati anatomo-clinici.

	HCC NAFLD- ASSOCIATO	HCC-NON NAFLD ASSOCIATO
Pazienti, <i>n</i>	15 ^B	15 ^B
Età, <i>media (SD)</i>	70 (9) ^A	58 (14) ^A
Genere maschile, <i>n (%)</i>	12 (80) ^A	9 (60) ^A
Grado istologico tumorale 1 o 2, <i>n (%)</i>	11 (73.3) ^A	6 (40) ^A
Taglia tumorale >50 mm, <i>n (%)</i>	6 (40) ^A	1 (6,7) ^A
>1 nodulo di HCC, <i>n (%)</i>	2 (13.3) ^A	6 (40) ^A
Presenza di invasioni microvascolari, <i>n (%)</i>	7 (46.7) ^C	6 (40) ^C
Cirrosi, <i>n (%)</i>	9 (60%) ^A	14 (93.3%) ^A

^A *p-value* <0.05^B 1 (*matched*)^C NS= statisticamente non significativo

4.2 Analisi anatomopatologica

Nel gruppo NAFLD-HCC, due pazienti (13.3%) possedevano più di un nodulo, contro i sei pazienti (40%) affetti da HCC non associato a NAFLD.

La taglia media della neoplasia nel primo gruppo era maggiore di quella degli HCC non associati a NAFLD: *n*=6 >50 mm (40%), *versus* *n*=1 >50 mm (6.7%).

Il tumore era più spesso maggiormente differenziato nel gruppo NAFLD-HCC: grado istologico tumorale 1 o 2 in *n*=11 NAFLD-HCC (73.3%) *versus* i *n*=6 (40%) non-NAFLD-HCC.

Non abbiamo rilevato differenze statisticamente significative tra i due gruppi per le restanti caratteristiche anatomo-patologiche analizzate e cioè la presenza di invasioni vascolari, la presenza di necrosi, la conta mitotica e la presenza di mitosi atipiche.

Per quanto riguarda, in particolare le invasioni microvascolari, esse si sono osservate nel 46.7% dei casi NAFLD-associati ($n=7$) e nel 40% di quelli NAFLD-non associati ($n=6$). La **Figura 3** e la **Figura 4** mostrano rispettivamente una foto macroscopica e microscopica di un caso di HCC-steatoepatitico della nostra serie.

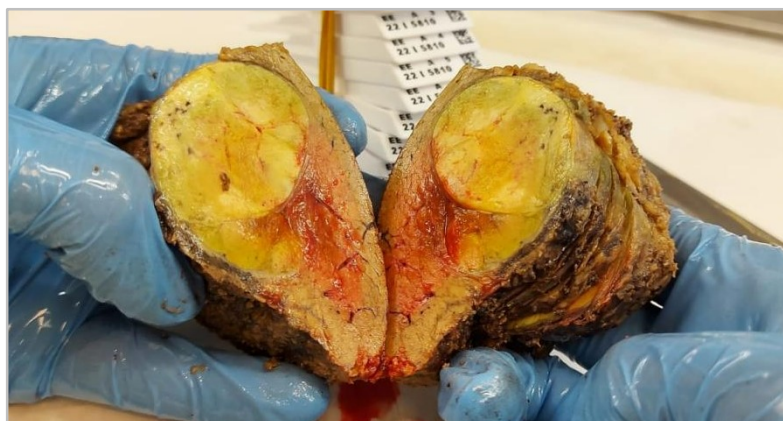


Fig.3. Resecato epatico comprendente, al taglio, nodulo di HCC-steatosico.

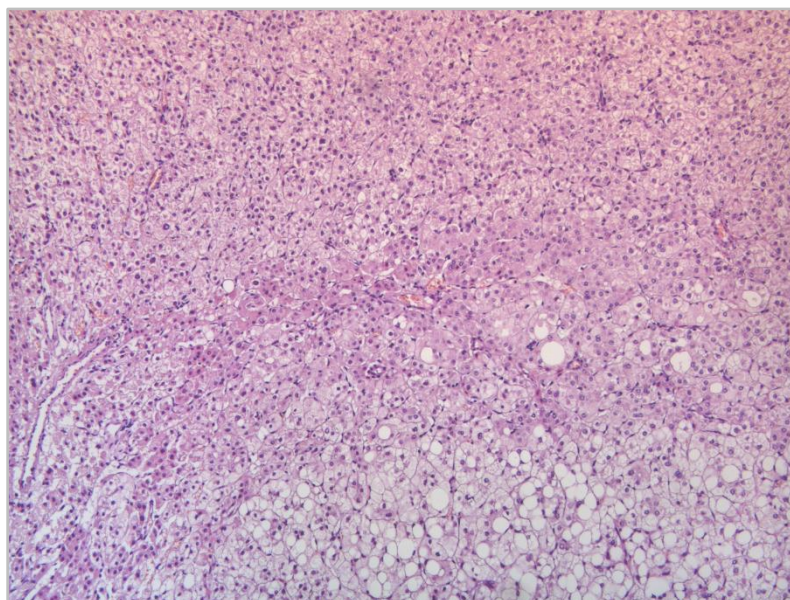


Fig.4. Stesso campione della Fig.3, in cui si osservano modificazioni di tipo steatosico e cellule chiare.

4.3 Analisi molecolare

Il DNA genomico dei n.30 campioni di HCC fissati formalina ed inclusi in paraffina, appartenenti ad altrettanti pazienti, è stato *screenato* per la presenza di mutazioni somatiche nei geni BRAF, KRAS ed NRAS.

L'analisi mutazionale dei geni KRAS ed NRAS è stata effettuata mediante tecnologia Pyrosequencing (sistema PyroMark Q24), in grado di fornire una rilevazione quantitativa delle mutazioni di KRAS ed NRAS eventualmente presenti. L'analisi mutazionale del gene BRAF è stata effettuata mediante tecnologia Real-Time PCR (Sistema QIAGEN Rotor-Gene Q), utile per la valutazione qualitativa delle eventuali mutazioni del codone 600 del gene.

Non sono state riscontrate mutazioni somatiche nei geni KRAS ed NRAS, mentre è stata rilevata mutazione di BRAF (V600E) in due campioni, cioè nel 6,7% (**Figure 5-8**). Tale mutazione interessa l'esone 15 e consiste nella sostituzione aminoacidica da valina ad ad acido glutammico in posizione 600.

La presenza della suddetta mutazione a livello germinale è stata esclusa testando, tramite la medesima metodica molecolare, il tessuto non neoplastico, proveniente dallo stesso resecato chirurgico del paziente.

La mutazione di BRAF è stata correlata a diverse variabili, note per essere marcatori di progressione tumorale: cirrosi, taglia tumorale, numero di noduli tumorali, grado istologico, numero di mitosi e invasioni microvascolari.

I soggetti con mutazione somatica di BRAF erano entrambi maschi, ultra-settantenni, non cirrotici, la cui neoplasia si caratterizzava per la presenza di voluminosi noduli tumorali, con grado istopatologico scarsamente differenziato ed alto indice mitotico. Numerose erano anche le invasioni microvascolari. Dal punto di vista istologico, si trattava quindi di neoplasie particolarmente aggressive, tendenti alla progressione.

Entrambi i soggetti, inoltre, appartenevano alla categoria dei NAFLD-HCC.

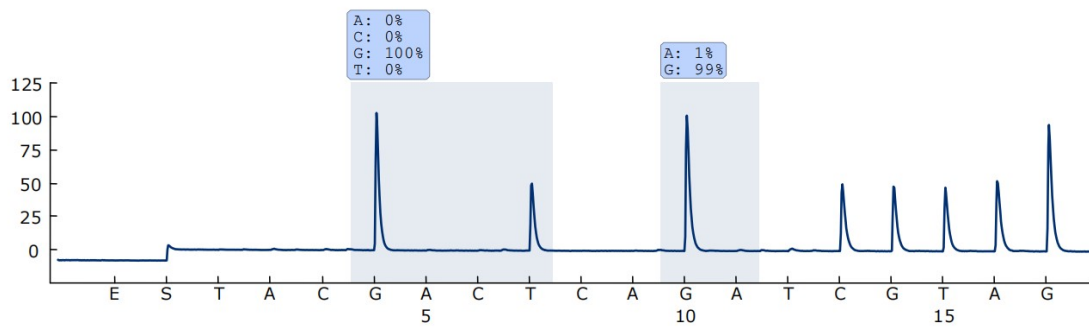


Fig.5. Pirogramma ottenuto dall'analisi di un campione con genotipo *wild-type* nei codoni 12 e 13 di KRAS.

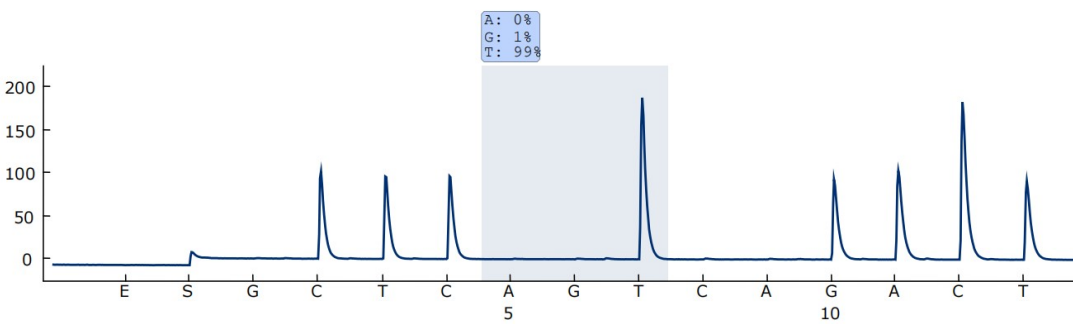


Fig.6. Pirogramma ottenuto dall'analisi di un campione con genotipo *wild-type* nel codone 61 di KRAS.

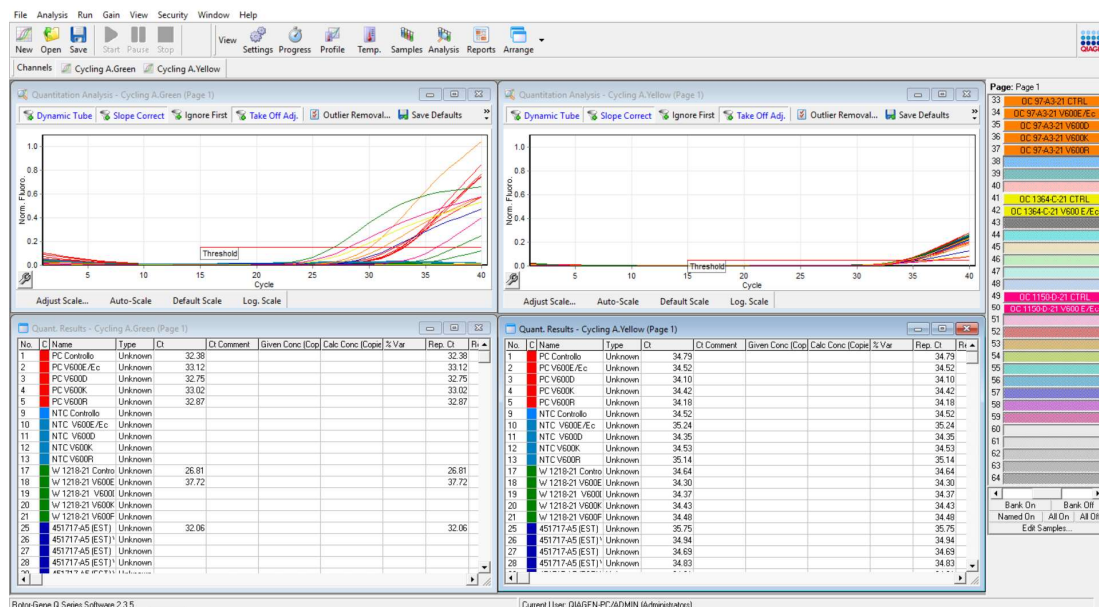


Fig.7. Rotor-Gene Q Software: corsa *Real-Time* di alcuni campioni testati per BRAF, con i relativi controlli.

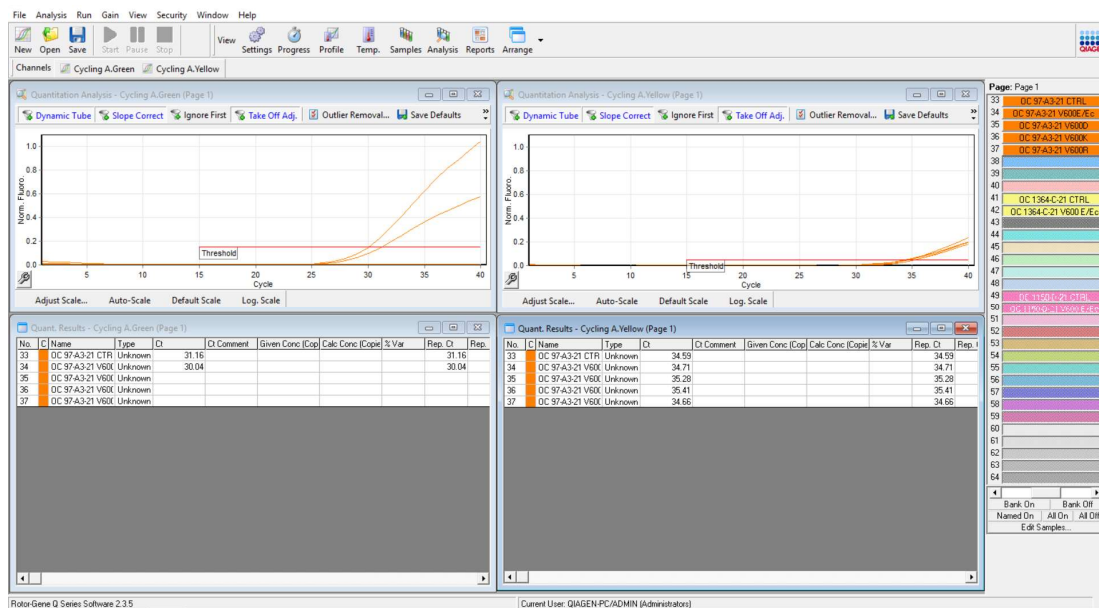


Fig.8. Rotor-Gene Q Software: corsa Real-Time di campione positivo per la mutazione V600E/EC di BRAF.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente studio si è analizzata la frequenza di mutazioni puntiformi attivanti, a livello somatico, nei geni BRAF, KRAS e NRAS, afferenti alla cascata di *signalling* cellulare delle *proteine-chinasi mitogeno-attivate* (MAPK), in una serie di n. 30 campioni di carcinoma epatocellulare relativi a soggetti autoctoni, originari del Sud Italia.

Tale cascata di *signalling* cellulare è coinvolta nella proliferazione, nella differenziazione, nella sopravvivenza, nell'angiogenesi e nella migrazione cellulari in risposta a segnali di crescita ed è stata dimostrata essere una delle principali cascate di segnale oncogenicamente attivate in numerose neoplasie solide. Si basti pensare che KRAS, il primo oncogene ad essere scoperto, è mutato in circa il 30% dei tumori umani.⁶⁹ Nel carcinoma epatocellulare, numerose ricerche hanno dimostrato l'iperattivazione del *pathway* RAF/RAS in oltre il 50% degli HCC-*early* e in quasi il 100% di quelli in stadio avanzato, a prescindere dalla eziologia e pur in assenza (quasi sempre) di mutazioni somatiche dei relativi geni.^{70 71} Tale iperattivazione rientra, almeno in parte, in quella condizione di squilibrio tra segnali pro-apoptotici ed anti-apoptotici legata a meccanismi di ipermetilazione, con silenziamento dei relativi geni.^{72 73 74 75} Nonostante tale ben documentata iperattivazione di RAS/BRAF nell'HCC umano, le mutazioni somatiche (attivanti) dei suddetti oncogeni sono generalmente classificate come eventi rari durante l'epatocarcinogenesi dalla Letteratura Internazionale.^{76 77 78} La **Tabella 6** riporta alcuni di questi lavori, con la relativa distribuzione geografica.

Author (ref)	Population	No. of patients	Codon 12	Codon 13	Codon 61	Frequency (%)
Zuo <i>et al</i> (36)	Chinese	64	2	1	NA	4.7
Huang <i>et al</i> (31)	Chinese	10	0	0	0	0.0
Taketomi <i>et al</i> (33)	Japanese	61	0	1	0	1.6
Tsuda <i>et al</i> (43)	Japanese	30	1	0	0	3.3
Taniguchi <i>et al</i> (44)	Japanese	15	0	0	NA	0.0
Fujimoto <i>et al</i> (29)	Japanese	27	0	0	0	0.0
Tada <i>et al</i> (45)	Japanese	12	0	0	0	0.0
Bose <i>et al</i> (46)	Indian	30	2	0	0	6.7
Tannapfel <i>et al</i> (27)	German	25	0	0	NA	0.0
Weihrauch <i>et al</i> (47)	German	20	3	0	NA	15.0
Challen <i>et al</i> (32)	British	19	0	NA	1	5.3
Guichard <i>et al</i> (30)	French	149	1	0	1	1.3
Colombino <i>et al</i> (37)	Italian	65	1	0	0	1.5

NA, not available.

Tab. 6. Mutazioni puntiformi riportate in KRAS nel carcinoma epatocellulare e relativa frequenza.⁹

Nonostante la variabilità della prevalenza delle mutazioni somatiche di BRAF, KRAS e NRAS descritta in Letteratura, essa viene riportata come bassa o nulla nella maggior parte dei *paper*, attestandosi rispettivamente intorno a 0-1.6%, 0-2% e 0% in base alle casistiche.^{10 79 80 81 82 83} Purtroppo, una chiara definizione della frequenza delle suddette mutazioni non è stata ancora elaborata e possono esistere differenze legate all'origine geografica dei pazienti ed ai fattori eziologici coinvolti nella carcinogenesi epatocellulare.

Alla luce delle considerazioni sin qui esposte, nella presente serie di casi si è indagato lo stato dei geni RAS/RAF al fine di vagliarne il profilo mutazionale somatico, potenzialmente correlato allo stato di iperattività delle relative proteine-chinasi.

Nei trenta campioni analizzati non sono state riscontrate mutazioni di KRAS o di NRAS, in linea con la maggior parte dei *paper* della Letteratura Internazionale. Tale infrequenza indica che l'insorgenza dei suddetti eventi mutazionali probabilmente non rappresenta un evento chiave nella tumorigenesi epatocellulare.

All'opposto, invece, si è rilevata la presenza di mutazione nel gene BRAF in n. 2/30 (6.7%) pazienti della nostra coorte. Alla luce di quanto sopra esposto, circa l'infrequenza di questa mutazione nello HCC stando a quanto riportato da buona

parte della Letteratura, tale riscontro appare essere particolarmente interessante ed in linea con un importante studio effettuato da Colombino *et al.* su pazienti originari del Sud Italia.¹⁴ Il gruppo italiano, infatti, dimostra che le mutazioni somatiche attivanti di BRAF siano relativamente frequenti (n.15/65, 23%) in un campione di pazienti affetti da HCC originari del Sud Italia.

La variante mutazionale da noi rilevata, inoltre, rispecchia quella riscontrata in tutti casi BRAF-mutati di Colombino *et al.*, e si identifica nella sostituzione di una valina con un acido glutammico nella posizione 600 (V600E) dell'esone 15.

Lo studio di Colombino *et al.*, risalente al 2012, è stato seguito da alcune altre ricerche, su scala nazionale ed internazionale, che hanno confermato ed approfondito il ruolo di BRAF nella genesi e/o nella progressione dell'epatocarcinoma.^{4 84}

All'opposto di quanto detto per RAS, quindi, si può ritenere che l'attivazione mutazionale somatica del gene BRAF partecipi all'epatocarcinogenesi.

Le osservazioni fin qui fatte, sebbene limitate dalla piccola numerosità della popolazione da noi esaminata, appaiono tuttavia condivisibili, anche alla luce della concordanza con i dati riportati di parte della Letteratura Scientifica sopra esposti. Uno *screening* più estensivo della popolazione italiana, ed in particolare di quella del Meridione d'Italia, è evidentemente auspicabile, per confermare un coinvolgimento, sottoforma di mutazioni somatiche, dei geni correlati al *pathway* RAS–BRAFF–MEK–ERK più importante, in termini di prevalenza, di quello che si è generalmente ritenuto fino ad oggi.

La convalida, mediante indagini su più larga scala, di una frequenza non trascurabile delle mutazioni del gene BRAF negli epatocarcinomi di soggetti appartenenti a specifiche aree geografiche appare di particolare rilevanza, in quanto, oltre ad accrescere le nostre conoscenze nella patogenesi molecolare di questa neoplasia, avrebbe anche un importante potenziale terapeutico. Un tale riscontro, infatti, se avvalorato da *trials* clinici che confermino la maggiore efficacia di farmaci anti-BRAF in presenza di mutazioni del gene, permetterebbe di arricchire le opzioni di cura sistemica dei pazienti con HCC, ad oggi alquanto limitate. Gli inibitori multi-chinasici (sorafenib, lenvatinib, regorafenib, ecc.), infatti, sebbene abbiano migliorato la sopravvivenza dei pazienti con epatocarcinoma in fase avanzata, ancora

oggi producono un prolungamento della sopravvivenza di soli pochi mesi, in relazione allo sviluppo di meccanismi di resistenza legati all'attivazione di multipli *pathway* cellulari. Molti degli anti-TKI utilizzati nel trattamento dell'epatocarcinoma vedono in BRAF una delle chinasi *target*, ma non è stata ad oggi dimostrata una correlazione tra la risposta terapeutica e la presenza di mutazioni del gene. Appare lecito, quindi, pensare che l'introduzione nel trattamento sequenziale dell'epatocarcinoma di altri inibitori tirosino-chinasici possa contribuire a limitare la progressione di questa neoplasia "camaleontica". In Letteratura sono presenti *paper* abbastanza recenti sull'uso di inibitori di BRAF o di MEK, talora mutazione-specifici, in linee cellulari di HCC o già in fase di sperimentazione clinica, singolarmente o in associazione ad altre sostanze, talvolta di origine naturale.^{85 86 87}
⁸⁸ La verifica dell'efficacia di tali molecole e la traslazione del loro impiego in pratica clinica potrebbe rispecchiare quella che è già *routine* in altre neoplasie solide: si pensi ad esempio all'impiego di inibitori di BRAF in pazienti affetti da melanoma in stadio IV portatori della mutazione somatica.

L'analisi delle coorti da noi indagate risulta ulteriormente informativa nella qualità di caratterizzazione istologica di HCC insorti su NAFLD ed alla luce dei fattori prognostici, clinici ed istopatologici valutati come variabili di analisi.

Nella coorte di HCC associati a NAFLD, le neoplasie erano insorte in maschi di età più avanzata e risultavano essere singole, larghe e di grado istopatologico moderatamente o ben differenziato più frequentemente rispetto ai casi di HCC da altra eziologia. Tale correlazione tra variabili anatomo-cliniche nell'ambito dei NAFLD-HCC è stata osservata anche in diversi lavori scientifici.^{89 90} I nostri risultati avvalorano l'ipotesi che la maggior parte delle neoplasie che insorgono nel contesto di NAFLD spesso interessino soggetti di genere maschile e di età più avanzata e rimangano singole e ben differenziate nonostante la grande taglia.

Questi attributi non sono necessariamente specifici di NAFLD, ma possono piuttosto riflettere lo sviluppo di HCC in assenza di fibrosi avanzata e/o di cirrosi, evenienza non rara nei casi di NAFLD.^{91 92 93 94} Infatti, numerosi ed autorevoli studi hanno

mostrato come, nei casi di NAFLD o di Sindrome Metabolica senza fibrosi avanzata o cirrosi, rispetto agli epatocarcinomi originanti in fegato fortemente fibrotico o cirrotico di analogo o differente eziologia, la neoplasia venisse diagnosticata in soggetti di età più avanzata e più frequentemente di sesso maschile e che essa risultasse più spesso singola e voluminosa ma meglio differenziata.^{24 95 96} I nostri risultati sono in linea con i suddetti dati. Appare condivisibile l'ipotesi che la grande taglia di HCC insorti in soggetti con NAFLD senza fibrosi/cirrosi sia da correlare alla spesso tardiva epoca della diagnosi, legata alla mancanza di programmi di stretto *follow-up* universalmente raccomandati per questo gruppo di pazienti. Ciò che, invece, in qualche misura stupisce è il maggior grado di differenziazione di queste neoplasie, poichè è comunemente accettato che il grado istopatologico peggiori con l'aumento dimensionale della lesione.^{97 98} Le differenze sin qui descritte tra il gruppo di HCC-NAFLD ed il gruppo di HCC legati ad altra eziologia possono trovare spiegazione nella tesi che l'epatocarcinoma insorto su fegato non fibrotico/cirrotico rappresenti un'entità distinta rispetto a quello insorto su fegato fibrotico/cirrotico, sia in termini di patogenesi che di evoluzione. I nostri risultati contribuiscono a suggerire che il ben noto meccanismo di progressione *multi-step* di fibrosi-cirrosi-HCC non rappresenti il principale percorso di cancerogenesi in un contesto di NAFLD, come avviene invece per le altre eziologie. In una coorte multicentrica italiana di n. 756 pazienti con HCC, il gruppo italiano di Piscaglia e colleghi riportarono che il 46.2% degli HCC NAFLD-associati insorgeva in un *background* non-cirrotico, in contrasto con il 97.2% degli HCC HCV-associati insorgenti in fegato cirrotico.⁹⁹ Simili risultati sono stati illustrati in studi tedeschi e giapponesi, nei quali rispettivamente il 42% ed il 49% dei casi NAFLD-associati originavano su fegato non-cirrotico.^{100 101} Un altro studio, americano, su pazienti con HCC sottoposti a trattamento curativo, ha mostrato che solo il 73% circa dei n. 52 pazienti con NAFLD-HCC soffriva di cirrosi.¹⁰² Le più alte percentuali di HCC NASH-associati occorsi in assenza di cirrosi, comunque, si attestano intorno al 58% ed al 69.8%, come affermato, rispettivamente, in un paper americano ed in uno cinese.⁴¹
¹⁰³ La nostra ricerca va quindi ad arricchire i riscontri dei progressi *paper* sin qui riportati, sottolineando che la sequenza steatosi-steatoepatite-cirrosi-HCC può non

essere lineare in una sostanziale proporzione di pazienti con NAFLD-HCC. Da questi dati, infatti, pare che l'incrementato rischio di HCC in questi soggetti sia talvolta legato al potenziale oncogenico correlato alla NAFLD di per sè, più che alla progressione attraverso la cirrosi. I meccanismi di insorgenza dell'epatocarcinoma in tali casi potrebbero essere correlati all'instabilità genomica legata all'insulinoresistenza, all'aberrante metabolismo lipidico ed alla necroinfiammazione, indipendentemente dalla presenza di cirrosi. In tal modo si spiegherebbe perchè NAFLD, obesità e diabete mellito di tipo 2 siano fattori di rischio indipendenti per HCC.^{104 105 106 107} Queste riflessioni si riallacciano ad importanti dibattimenti clinici, oggi molto diffusi, relativi alla tempistica del *follow-up* in questi soggetti a rischio non cirrotici, oggi purtroppo molto numerosi.

Per completezza, va infine ricordato che una quota parte di HCC NAFLD-correlati può originare dalla trasformazione maligna di un pre-esistente adenoma epatocellulare, lesione che è stata talora associata alla compresenza di sindrome metabolica e, in particolare, di obesità.^{24 108} In nessuno dei campioni da noi studiati, comunque, si è osservata la pre-esistenza di un adenoma epatocellulare.

La presente ricerca risulta essere, al meglio delle nostre conoscenze, una delle poche analisi condotte a livello di *molecular drivers* in ambito di NAFLD-HCC.

Inoltre, il coinvolgimento mutazionale somatico in fase precoce del *pathway* delle MAPK osservato nella nostra casistica con il ritrovamento della mutazione di BRAF in pazienti con epatocarcinoma NAFLD-associato non ancora progredito potrebbe indicarne l'appartenenza alla classe *proliferativa* della classificazione molecolare degli HCC. Un tale inquadramento potrebbe spiegare i caratteri istologici di maggiore aggressività mostrati da queste neoplasie (scarsa differenziazione, elevato indice mitotico, ecc.). A supporto di tale ipotesi, anche Colombino *et al.* dimostrarono una correlazione statisticamente significativa tra la distribuzione di BRAF-mutato e la presenza di taluni caratteri anatomopatologici di aggressività, quali la multinodularità.¹⁴

L'attivazione costitutiva della cascata delle proteine chinasi mitogeno-attivate (MAPK) legata a mutazione di BRAF potrebbe inoltre motivare lo stato di immunosoppressione osservato in alcuni HCC, specie di quelli appartenenti proprio alla classe *proliferativa* della classificazione molecolare, in maniera simile a quanto avviene per il melanoma, dove le mutazioni V600 di tipo *gain-of-function*, inducono uno stato immunosoppressivo del microambiente tumorale.^{40 109}

In conclusione, i nostri risultati, sebbene limitati dalla piccola numerosità della popolazione in esame, rafforzano l'ipotesi, condivisa da parte della Letteratura Internazionale, che gli HCC che originano da NAFLD seguano una via eziopatogenetica e di progressione a se stante, ancor oggi in gran parte poco conosciuta, ma che merita di essere studiata più approfonditamente, anche alla luce della sempre maggiore diffusione di queste malattie nel panorama demografico internazionale, con importanti risvolti traslazionali, in termini di *screening*, prognosi e terapia.

6. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Gnoni A, Licchetta A, Memeo R, et al. Role of BRAF in Hepatocellular Carcinoma: A Rationale for Future Targeted Cancer Therapies. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(12):754. Published 2019 Nov 21. doi:10.3390/medicina55120754
- ² Knudsen ES, Gopal P, Singal AG. The changing landscape of hepatocellular carcinoma: etiology, genetics, and therapy. *Am J Pathol*. 2014;184(3):574-583. doi:10.1016/j.ajpath.2013.10.028
- ³ Wang Y, Nie H, Zhao X, Qin Y, Gong X. Bicyclol induces cell cycle arrest and autophagy in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/AKT and Ras/Raf/MEK/ERK pathways. *BMC Cancer*. 2016;16(1):742. Published 2016 Sep 21. doi:10.1186/s12885-016-2767-2
- ⁴ Li J, Wang J, Zhou W, Zhang S, Le Y, He R. Downregulation of BRAF-activated non-coding RNA suppresses the proliferation, migration and invasion, and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2017;14(4):4751-4757. doi:10.3892/ol.2017.6770
- ⁵ Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1998;27(4):951-958. doi:10.1002/hep.510270409
- ⁶ Hoffmann K, Shibo L, Xiao Z, Longerich T, Büchler MW, Schemmer P. Correlation of gene expression of ATP-binding cassette protein and tyrosine kinase signaling pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2011;31(11):3883-3890.
- ⁷ Zuo Q, Huang H, Shi M, et al. Multivariate analysis of several molecular markers and clinicopathological features in postoperative prognosis of hepatocellular carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)*. 2012;295(3):423-431. doi:10.1002/ar.21531
- ⁸ Liu L, Cao Y, Chen C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*. 2006;66(24):11851-11858. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1377
- ⁹ Hou W, Liu J, Chen P, Wang H, Ye BC, Qiang F. Mutation analysis of key genes in RAS/RAF and PI3K/PTEN pathways in Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2014;8(3):1249-1254. doi:10.3892/ol.2014.2253
- ¹⁰ Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2003;52(5):706-712. doi:10.1136/gut.52.5.706

- ¹¹ Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: wheeler@bcm.edu; Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2017;169(7):1327-1341.e23. doi:10.1016/j.cell.2017.05.046
- ¹² Harding JJ, Nandakumar S, Armenia J, et al. Prospective Genotyping of Hepatocellular Carcinoma: Clinical Implications of Next-Generation Sequencing for Matching Patients to Targeted and Immune Therapies. *Clin Cancer Res*. 2019;25(7):2116-2126. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2293
- ¹³ Gnoni A, Licchetta A, Memeo R, et al. Role of BRAF in Hepatocellular Carcinoma: A Rationale for Future Targeted Cancer Therapies. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(12):754. Published 2019 Nov 21. doi:10.3390/medicina55120754
- ¹⁴ Colombino M, Sperlongano P, Izzo F, et al. BRAF and PIK3CA genes are somatically mutated in hepatocellular carcinoma among patients from South Italy. *Cell Death Dis*. 2012;3(1):e259. Published 2012 Jan 19. doi:10.1038/cddis.2011.136
- ¹⁵ Tuttolomondo A, Petta S, Casuccio A, et al. Reactive hyperemia index (RHI) and cognitive performance indexes are associated with histologic markers of liver disease in subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a case control study. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1):28. Published 2018 Feb 16. doi:10.1186/s12933-018-0670-7
- ¹⁶ Corrao S, Rinollo C, Scaglione R. Non-alcoholic fatty liver disease: severity of fibrosis and its relationships with clinical and biological variables. *J Hepatol*. 2015;62(5):1212-1213. doi:10.1016/j.jhep.2015.01.010
- ¹⁷ Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF), Società Italiana di Diabetologia (SID) and Società Italiana dell'Obesità (SIO); Members of the guidelines panel; Coordinator; Non-alcoholic fatty liver disease in adults 2021: A clinical practice guideline of the Italian Association for the Study of the Liver (AISF), the Italian Society of Diabetology (SID) and the Italian Society of Obesity (SIO). *Dig Liver Dis*. 2022;54(2):170-182. doi:10.1016/j.dld.2021.04.029
- ¹⁸ Younossi ZM, Marchesini G, Pinto-Cortez H, Petta S. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Implications for Liver Transplantation. *Transplantation*. 2019;103(1):22-27. doi:10.1097/TP.0000000000002484
- ¹⁹ Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol*. 2020;73(1):202-209. doi:10.1016/j.jhep.2020.03.039

- ²⁰ Eslam M, Sanyal AJ, George J; International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1999-2014.e1. doi:10.1053/j.gastro.2019.11.312
- ²¹ Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-357. doi:10.1002/hep.29367
- ²² Cataldo I, Sarcognato S, Sacchi D, et al. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Pathologica*. 2021;113(3):194-202. doi:10.32074/1591-951X-242
- ²³ Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. 1990;11(1):74-80. doi:10.1002/hep.1840110114
- ²⁴ Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology*. 2009;49(3):851-859. doi:10.1002/hep.22734
- ²⁵ Grgurevic I, Bozin T, Mikus M, Kukla M, O'Beirne J. Hepatocellular Carcinoma in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Epidemiology to Diagnostic Approach. *Cancers (Basel)*. 2021;13(22):5844. Published 2021 Nov 21. doi:10.3390/cancers13225844
- ²⁶ Petrelli F, Manara M, Colombo S, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis: HCC and Steatosis or Steatohepatitis. *Neoplasia*. 2022;30:100809. doi:10.1016/j.neo.2022.100809
- ²⁷ Petrick JL, Kelly SP, Altekruse SF, McGlynn KA, Rosenberg PS. Future of Hepatocellular Carcinoma Incidence in the United States Forecast Through 2030. *J Clin Oncol*. 2016;34(15):1787-1794. doi:10.1200/JCO.2015.64.7412
- ²⁸ World Health Organization. Global Hepatitis Report 2017. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2017.
- ²⁹ International Agency for Research on Cancer. GLOBO-CAN 2018. IARC [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=11&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=pearth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D\(2020\)](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=11&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=pearth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D(2020))
- ³⁰ European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma [published correction

appears in J Hepatol. 2019 Apr;70(4):817]. J Hepatol. 2018;69(1):182-236.
doi:10.1016/j.jhep.2018.03.019

³¹ Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, et al. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;68(2):723-750. doi:10.1002/hep.29913

³² Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006;45(4):529-538. doi:10.1016/j.jhep.2006.05.013

³³ Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11-20. doi:10.1038/nrgastro.2017.109

³⁴ Perumpail RB, Wong RJ, Ahmed A, Harrison SA. Hepatocellular Carcinoma in the Setting of Non-cirrhotic Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Metabolic Syndrome: US Experience. *Dig Dis Sci*. 2015;60(10):3142-3148. doi:10.1007/s10620-015-3821-7

³⁵ Khan FZ, Perumpail RB, Wong RJ, Ahmed A. Advances in hepatocellular carcinoma: Nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2015;7(18):2155-2161. doi:10.4254/wjh.v7.i18.2155

³⁶ Vasavada B. "Nonalcoholic Steatohepatitis: A Rapidly Increasing Indication for Liver Transplantation in India". *J Clin Exp Hepatol*. 2022;12(3):1023-1024. doi:10.1016/j.jceh.2021.11.002

³⁷ Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2018;67(1):123-133. doi:10.1002/hep.29466

³⁸ Park JW, Chen M, Colombo M, et al. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver Int*. 2015;35(9):2155-2166. doi:10.1111/liv.12818

³⁹ Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol*. 2018;69(4):896-904. doi:10.1016/j.jhep.2018.05.036

⁴⁰ Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):6. Published 2021 Jan 21. doi:10.1038/s41572-020-00240-3

- ⁴¹ Yang T, Hu LY, Li ZL, et al. Liver Resection for Hepatocellular Carcinoma in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: a Multicenter Propensity Matching Analysis with HBV-HCC. *J Gastrointest Surg.* 2020;24(2):320-329. doi:10.1007/s11605-018-04071-2
- ⁴² Renne SL, Sarcognato S, Sacchi D, et al. Hepatocellular carcinoma: a clinical and pathological overview. *Pathologica.* 2021;113(3):203-217. doi:10.32074/1591-951X-295
- ⁴³ Llovet JM, Montal R, Sia D, Finn RS. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(10):599-616. doi:10.1038/s41571-018-0073-4
- ⁴⁴ Ruiz de Galarreta M, Bresnahan E, Molina-Sánchez P, et al. β -Catenin Activation Promotes Immune Escape and Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Discov.* 2019;9(8):1124-1141. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0074
- ⁴⁵ Kim G, Jang SY, Nam CM, Kang ES. Statin use and the risk of hepatocellular carcinoma in patients at high risk: A nationwide nested case-control study. *J Hepatol.* 2018;68(3):476-484. doi:10.1016/j.jhep.2017.10.018
- ⁴⁶ Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002;420(6913):333-336. doi:10.1038/nature01137
- ⁴⁷ Petta S, Valenti L, Tuttolomondo A, et al. Interferon lambda 4 rs368234815 TT> δ G variant is associated with liver damage in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2017;66(6):1885-1893. doi:10.1002/hep.29395
- ⁴⁸ Nault JC, Martin Y, Caruso S, et al. Clinical Impact of Genomic Diversity From Early to Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* 2020;71(1):164-182. doi:10.1002/hep.30811
- ⁴⁹ Jiang M, Wen F, Cao J, Li P, She J, Chu Z. Genome-wide exploration of the molecular evolution and regulatory network of mitogen-activated protein kinase cascades upon multiple stresses in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics.* 2015;16(1):228. Published 2015 Mar 24. doi:10.1186/s12864-015-1452-1
- ⁵⁰ Ward AF, Braun BS, Shannon KM. Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. *Blood.* 2012;120(17):3397-3406. doi:10.1182/blood-2012-05-378596
- ⁵¹ Knight T, Irving JA. Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. *Front Oncol.* 2014;4:160. Published 2014 Jun 24. doi:10.3389/fonc.2014.00160

- ⁵² Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1226-1239.e4. doi:10.1053/j.gastro.2015.05.061
- ⁵³ Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*. 2015;47(5):505-511. doi:10.1038/ng.3252
- ⁵⁴ Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*. 2014;46(12):1267-1273. doi:10.1038/ng.3126
- ⁵⁵ Ikeda S, Lim JS, Kurzrock R. Analysis of Tissue and Circulating Tumor DNA by Next-Generation Sequencing of Hepatocellular Carcinoma: Implications for Targeted Therapeutics. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(5):1114-1122. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0604
- ⁵⁶ Galle PR, Foerster F, Kudo M, et al. Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2019;39(12):2214-2229. doi:10.1111/liv.14223
- ⁵⁷ Hyman DM, Taylor BS, Baselga J. Implementing Genome-Driven Oncology. *Cell*. 2017;168(4):584-599. doi:10.1016/j.cell.2016.12.015
- ⁵⁸ Teufel M, Seidel H, Köchert K, et al. Biomarkers Associated With Response to Regorafenib in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2019;156(6):1731-1741. doi:10.1053/j.gastro.2019.01.261
- ⁵⁹ Lim HY, Merle P, Weiss KH, et al. Phase II Studies with Refametinib or Refametinib plus Sorafenib in Patients with RAS-Mutated Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24(19):4650-4661. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3588
- ⁶⁰ Lim HY, Heo J, Choi HJ, et al. A phase II study of the efficacy and safety of the combination therapy of the MEK inhibitor refametinib (BAY 86-9766) plus sorafenib for Asian patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(23):5976-5985. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3445
- ⁶¹ Rimassa L, Assenat E, Peck-Radosavljevic M, et al. Tivantinib for second-line treatment of MET-high, advanced hepatocellular carcinoma (METIV-HCC): a final analysis of a phase 3, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Oncol*. 2018;19(5):682-693. doi:10.1016/S1470-2045(18)30146-3
- ⁶² Jang JY, Lee JS, Kim HJ, et al. The General Rules for the Study of Primary Liver Cancer. *Journal of Liver Cancer* 2017;17:19-44. <https://doi.org/10.17998/jlc.17.1.19>

- ⁶³ Salomao M, Yu WM, Brown RS Jr, Emond JC, Lefkowitz JH. Steatohepatic hepatocellular carcinoma (SH-HCC): a distinctive histological variant of HCC in hepatitis C virus-related cirrhosis with associated NAFLD/NASH. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(11):1630-1636. doi:10.1097/PAS.0b013e3181f31caa
- ⁶⁴ Calderaro J, Ziol M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *J Hepatol*. 2019;71(3):616-630. doi:10.1016/j.jhep.2019.06.001
- ⁶⁵ Salomao M, Remotti H, Vaughan R, Siegel AB, Lefkowitz JH, Moreira RK. The steatohepatic variant of hepatocellular carcinoma and its association with underlying steatohepatitis. *Hum Pathol*. 2012;43(5):737-746. doi:10.1016/j.humpath.2011.07.005
- ⁶⁶ WHO classification of Tumours Editorial Board. Digestive system tumours. 5th ed, vol. 1. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2019.
- ⁶⁷ Caldwell SH, Lee VD, Kleiner DE, et al. NASH and cryptogenic cirrhosis: a histological analysis. *Ann Hepatol*. 2009;8(4):346-352.
- ⁶⁸ Therascreen RAS Extension Pyro Kit Handbook, Version 1, QIAGEN GmbH, Hilden.
- ⁶⁹ Mazzoccoli G, Miele L, Oben J, Grieco A, Vinciguerra M. Biology, Epidemiology, Clinical Aspects of Hepatocellular Carcinoma and the Role of Sorafenib. *Curr Drug Targets*. 2016;17(7):783-799. doi:10.2174/1389450117666151209120831
- ⁷⁰ Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1117-1128. doi:10.1053/j.gastro.2006.01.006
- ⁷¹ Newell P, Toffanin S, Villanueva A, et al. Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo. *J Hepatol*. 2009;51(4):725-733. doi:10.1016/j.jhep.2009.03.028
- ⁷² Lachenmayer A, Alsinet C, Chang CY, Llovet JM. Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2010;42 Suppl 3(0 3):S264-S272. doi:10.1016/S1590-8658(10)60515-4
- ⁷³ Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 2007;27(1):55-76.
- ⁷⁴ Vacchelli E, Pol J, Bloy N, et al. Trial watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies for oncological indications. *Oncoimmunology*. 2015;4(1):e985940. Published 2015 Feb 3. doi:10.4161/2162402X.2014.985940

- ⁷⁵ Perini MV, Starkey G, Fink MA, et al. From minimal to maximal surgery in the treatment of hepatocarcinoma: A review. *World J Hepatol.* 2015;7(1):93-100. doi:10.4254/wjh.v7.i1.93
- ⁷⁶ Hou W, Liu J, Chen P, Wang H, Ye BC, Qiang F. Mutation analysis of key genes in RAS/RAF and PI3K/PTEN pathways in Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2014;8(3):1249-1254. doi:10.3892/ol.2014.2253
- ⁷⁷ Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2003;52(5):706-712. doi:10.1136/gut.52.5.706
- ⁷⁸ Taketomi A, Shirabe K, Muto J, et al. A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma. *Surg Today.* 2013;43(3):289-292. doi:10.1007/s00595-012-0462-8
- ⁷⁹ Teufel A, Staib F, Kanzler S, Weinmann A, Schulze-Bergkamen H, Galle PR. Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2007;13(16):2271-2282. doi:10.3748/wjg.v13.i16.2271
- ⁸⁰ Challen C, Guo K, Collier JD, Cavanagh D, Bassendine MF. Infrequent point mutations in codons 12 and 61 of ras oncogenes in human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol.* 1992;14(2-3):342-346. doi:10.1016/0168-8278(92)90181-n
- ⁸¹ Rudalska R, Dauch D, Longerich T, et al. In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer. *Nat Med.* 2014;20(10):1138-1146. doi:10.1038/nm.3679
- ⁸² Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359(4):378-390. doi:10.1056/NEJMoa0708857
- ⁸³ Boyault S, Rickman DS, de Reyniès A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology.* 2007;45(1):42-52. doi:10.1002/hep.21467
- ⁸⁴ Garcia PP, Albuquerque RM, Osório FMF, Couto CA, Lima AS, Vidigal PVT. B-RAF PROTEIN IMMUNOEXPRESSION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA DUE TO HEPATITIS C VIRUS RELATED CIRRHOSIS. *Arq Gastroenterol.* 2021;58(4):419-423. doi:10.1590/S0004-2803.202100000-76
- ⁸⁵ Wang W, Xiao Y, Li S, et al. Synergistic activity of magnolin combined with B-RAF inhibitor SB590885 in hepatocellular carcinoma cells via targeting PI3K-AKT/mTOR and ERK MAPK pathway. *Am J Transl Res.* 2019;11(6):3816-3824. Published 2019 Jun 15.

- ⁸⁶ Xiao Y, Gong Q, Wang W, et al. The combination of Biochanin A and SB590885 potentiates the inhibition of tumour progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int.* 2020;20:371. Published 2020 Aug 5. doi:10.1186/s12935-020-01463-w
- ⁸⁷ Abd El Maksoud AI, Taher RF, Gaara AH, et al. Selective Regulation of B-Raf Dependent K-Ras/Mitogen-Activated Protein by Natural Occurring Multi-kinase Inhibitors in Cancer Cells. *Front Oncol.* 2019;9:1220. Published 2019 Nov 12. doi:10.3389/fonc.2019.01220
- ⁸⁸ Yang S, Liu G. Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;13(3):1041-1047. doi:10.3892/ol.2017.5557
- ⁸⁹ Regimbeau JM, Colombat M, Mognol P, et al. Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2004;10(2 Suppl 1):S69-S73. doi:10.1002/lt.20033
- ⁹⁰ Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2002;123(1):134-140. doi:10.1053/gast.2002.34168
- ⁹¹ Iannaccone R, Piacentini F, Murakami T, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease: helical CT and MR imaging findings with clinical-pathologic comparison. *Radiology.* 2007;243(2):422-430. doi:10.1148/radiol.2432051244
- ⁹² Dyson J, Jaques B, Chattopadhyay D, et al. Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J Hepatol.* 2014;60(1):110-117. doi:10.1016/j.jhep.2013.08.011
- ⁹³ Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(1):124-31.e1. doi:10.1016/j.cgh.2015.07.019
- ⁹⁴ Tokushige K, Hashimoto E, Horie Y, Tani M, Higuchi S. Hepatocellular carcinoma in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease, alcoholic liver disease, and chronic liver disease of unknown etiology: report of the nationwide survey. *J Gastroenterol.* 2011;46(10):1230-1237. doi:10.1007/s00535-011-0431-9
- ⁹⁵ Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology.* 2002;36(6):1349-1354. doi:10.1053/jhep.2002.36939
- ⁹⁶ Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005;365(9468):1415-1428. doi:10.1016/S0140-6736(05)66378-7

- ⁹⁷ Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, et al. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2005;11(9):1086-1092. doi:10.1002/lt.20472
- ⁹⁸ Kojiro M. *Pathology of Hepatocellular Carcinoma.* Oxford, England: Blackwell Publishing; 2006:82.
- ⁹⁹ Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, et al. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology.* 2016;63(3):827-838. doi:10.1002/hep.28368
- ¹⁰⁰ Ertle J, Dechêne A, Sowa JP, et al. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer.* 2011;128(10):2436-2443. doi:10.1002/ijc.25797
- ¹⁰¹ Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, et al. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(5):428-e50. doi:10.1016/j.cgh.2011.01.023
- ¹⁰² Reddy SK, Steel JL, Chen HW, et al. Outcomes of curative treatment for hepatocellular cancer in nonalcoholic steatohepatitis versus hepatitis C and alcoholic liver disease. *Hepatology.* 2012;55(6):1809-1819. doi:10.1002/hep.25536
- ¹⁰³ Sanyal A, Poklepovic A, Moyneur E, Barghout V. Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. *Curr Med Res Opin.* 2010;26(9):2183-2191. doi:10.1185/03007995.2010.506375
- ¹⁰⁴ Reeves HL, Zaki MY, Day CP. Hepatocellular Carcinoma in Obesity, Type 2 Diabetes, and NAFLD. *Dig Dis Sci.* 2016;61(5):1234-1245. doi:10.1007/s10620-016-4085-6
- ¹⁰⁵ Baffy G. Hepatocellular Carcinoma in Obesity: Finding a Needle in the Haystack?. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1061:63-77. doi:10.1007/978-981-10-8684-7_6
- ¹⁰⁶ Mantovani A, Targher G. Type 2 diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: spotlight on nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Transl Med.* 2017;5(13):270. doi:10.21037/atm.2017.04.41
- ¹⁰⁷ Margini C, Dufour JF. The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment. *Liver Int.* 2016;36(3):317-324. doi:10.1111/liv.13031
- ¹⁰⁸ Nahon P, Allaire M, Nault JC, Paradis V. Characterizing the mechanism behind the progression of NAFLD to hepatocellular carcinoma. *Hepat Oncol.* 2020;7(4):HEP36. Published 2020 Dec 29. doi:10.2217/hep-2020-0017

¹⁰⁹ Nishida N, Kudo M. Oncogenic Signal and Tumor Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma. *Oncology*. 2017;93 Suppl 1:160-164. doi:10.1159/000481246