

# Screening e diagnosi di laboratorio dei tumori epatici

E. Esposito<sup>a</sup>, R.M. Dorizzi<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio di Patologia Clinica, A.R.N.A.S. Civico e Benfratelli, Palermo

<sup>b</sup>Laboratorio Unico di AvR, Pievesestina di Cesena (FC)

## Riassunto

L'uso di marcatori tumorali è ormai consolidato nella pratica clinica come supporto a diagnosi e monitoraggio e per ottenere informazioni di tipo prognostico e predittivo. Molti studi clinici primari e secondari hanno fornito prove di evidenza per linee guida e raccomandazioni rivolte a clinici e professionisti di medicina di laboratorio con indicazioni per la gestione dei pazienti con HCC, il cancro epatico più frequente, in cui è stata documentata l'utilità dei marcatori tumorali, sia in fase diagnostica che di screening di popolazione a rischio. Rimane, tuttavia, aperto il dibattito sull'efficacia di un tale screening in termini di sopravvivenza e di rapporto costo/beneficio, non essendo ancora disponibili risultati di trial prospettici randomizzati di grosse dimensioni che confrontino l'outcome dei pazienti sottoposti a screening con quello dei controlli. I marcatori tumorali sierici utili per l'identificazione dell'HCC sono rappresentati da: *antigeni oncofetali e glicoproteici, enzimi e isoenzimi, marcatori genici circolanti e citochine*. Fra i biomarcatori sierici introdotti nella pratica clinica e misurabili con metodi automatici, sono

da segnalare: AFP, AFP-L3 e DCP. L'AFP è una glicoproteina di 70 KD sintetizzata nel periodo embrionale dall'endoderma del sacco vitellino e dal fegato fetale, la cui concentrazione si mantiene elevata per 3-4 settimane dopo la nascita, per poi calare fino ai valori presenti nell'adulto sano, che può presentare concentrazioni elevate in presenza di processi di rigenerazione epatica. L'AFP è indicata in tutte le linee guida come marcatore di elezione per lo screening di pazienti a rischio di HCC. AFP-L3, la glicofoma di AFP con più elevata affinità di legame per l'agglutinina Lens Culinaris, ha un notevole valore prognostico riguardo all'aggressività di HCC ed è usata in Asia, in associazione ad AFP, come test di screening.

La DCP (nota anche come proteina indotta da assenza di vitamina K o *PIVKA II*), rappresenta il prodotto anomalo di un disturbo di carbosilazione riscontrato nei pazienti con epatocarcinoma ed agisce come mitogeno autologo in linee cellulari di HCC. Possiede una maggiore capacità discriminante rispetto ad AFP nei confronti di neoplasie di piccole dimensioni.

## Summary

### Screening and laboratory diagnosis of liver cancer

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the commonest cancers in the world and its incidence is increasing. Many serum markers have been proposed for detecting HCC and some are routinely used in clinical practice for monitoring response to therapy and detecting cancer recurrence. Serum Tumor Markers (TM) for detecting HCC can be divided into 4 categories: oncofetal and glycoprotein antigens; enzymes and isoenzymes; gene products and cytokines. AFP is the most widely used in early detection of HCC and the commonest method of screening cou-

pled to imaging, as indicated in several guidelines. However, it has been reported that AFP-L3 and DCP are better than AFP in differentiating HCC from non malignant liver disease and in detecting small HCC. The appropriate combination of these markers may improve the effectiveness in screening HCC patients. The value of other recently developed (genomic and proteomic) markers remains to be determined. It is important to have an evidence-based answer to the question of whether or not such screening does diminish HCC specific mortality.

*Key-words:* Tumor markers, Hepatocellular carcinoma, HCC, AFP, AFP-L3, DCP.

## Introduzione

L'utilità di un esame di laboratorio deriva, secondo i criteri della Evidence Based Laboratory medicine (EBLM), dall'outcome clinico che produce; un esame è richiesto se, interpretato in un contesto clinico, aggiunge informazioni utili per il paziente. Il risultato di un esame di laboratorio, spesso utilizzato come surrogato di un esito clinico, nel processo decisionale serve per escludere o confermare una diagnosi in una malattia clinicamente manifesta o per monitorare l'efficacia di una terapia. Lo screening consente la diagnosi di una patologia target in pazienti asintomatici ed ha l'obiettivo di migliorarne gli outcome clinici. Nella pratica clinica l'uso di Marcatori Tumorali (MT) è ormai consolidato come "strumenti che consentono al clinico di trovare una risposta ad un quesito clinicamente rilevante relativo ad una patologia tumorale"<sup>1</sup>. I MT sono misurati routinariamente, con sistemi diagnostici ad elevata automazione e metodiche di nuova generazione che consentono di ottenere risultati accurati e molto riproducibili a costi relativamente bassi rispetto ad altre indagini diagnostiche.

## Uso clinico dei marcatori tumorali

Riguardo alla specifica possibilità di utilizzo clinico, possono essere definite diverse categorie di marcatori tumorali:

- *Marcatori Tumorali Diagnostici*: sono caratterizzati da sensibilità (Se) e specificità diagnostica (Sp) elevate; il requisito fondamentale per questa categoria di marcatori è la capacità di differenziare la patologia benigna da quella maligna. Un marcatore di screening identifica una patologia maligna allo stato iniziale. I prerequisiti fondamentali per lo sviluppo di un marcatore di screening sono l'elevata prevalenza, la conoscenza della biologia della malattia e la disponibilità di una terapia efficace<sup>1</sup>; l'interpretazione si basa sul superamento di un valore di cut-off.
- *Marcatori Tumorali Prognostici*: forniscono al clinico informazioni per un bilancio di base della neoplasia e consentono la stima del rischio di recidiva e/o di morte tumore-correlata in un paziente prima del trattamento chirurgico, indipendentemente dagli effetti di una futura terapia. Questi marcatori sono, pertanto, valutati in maniera più appropriata in pazienti che non ricevono alcuna terapia sistemica dopo un trattamento loco-regionale standard. L'interpretazione si basa sul superamento di un valore di cut-off.
- *Marcatori Tumorali Predittivi*: predicono la risposta o la resistenza del paziente ad una specifica terapia. Queste informazioni possono essere ottenute, in maniera ideale, dai risultati di studi prospettici, in cui la misura del marcatore rappresenti l'obiettivo primario ovvero il suo impatto predittivo sia considerato l'obiettivo secondario all'interno di un trial terapeutico. L'interpretazione si basa sul superamento di un valore di cut-off.
- *Marcatori Tumorali di Monitoraggio*: sono utilizzati per la valutazione di recidiva o di remissione durante il follow-up di un paziente, in presenza o in assenza di terapia anti-tumorale. I marcatori di monitoraggio possono essere studiati in studi clinici diversi e sono spesso utilizzati come "surrogate end-point" di efficacia della

terapia; i pazienti che non rispondono ad un trattamento terapeutico sono indirizzati ad una terapia diversa, ovvero la terapia è temporaneamente sospesa per evitare potenziali effetti tossici. Il criterio di interpretazione dei risultati si basa sul riscontro di variazioni significative rispetto al valore precedente.

## L'epatocarcinoma: fattori di rischio e marcatori di screening

Il carcinoma epatocellulare (HCC) e il colangiocarcinoma o carcinoma delle vie biliari sono le neoplasie maligne epatiche primitive clinicamente più rilevanti e l'HCC, in particolare, rappresenta la neoplasia epatica in cui l'utilità dei marcatori tumorali è stata maggiormente documentata in fase diagnostica e nello screening di popolazione a rischio. L'incidenza dell'HCC (particolarmente elevata nei paesi asiatici e nell'Africa sub-sahariana) è in continuo aumento anche nei paesi occidentali.

L'HCC è universalmente più frequente nei maschi, mentre vi è una considerevole variabilità geografica relativamente alla distribuzione per fasce di età; la prognosi è grave, soprattutto in Africa e Cina, dove il tempo medio di sopravvivenza è di circa 11 settimane dalla comparsa dei sintomi e di 6 settimane dal momento della diagnosi.

Nel caso dell'HCC è stata posta particolare attenzione sulla possibile identificazione precoce di neoplasie di piccole dimensioni, asintomatiche e potenzialmente curabili, mediante lo screening dei pazienti ad alto rischio, dato che l'HCC rappresenta una delle principali cause di morte per i pazienti con cirrosi o epatite cronica, che possono sviluppare il cancro anche dopo molti anni. Molti studi clinici primari e secondari di buona qualità hanno fornito prove d'evidenza per la formulazione di Linee Guida e Raccomandazioni rivolte a clinici e laboratoristi.

La complessa carcinogenesi dell'HCC è multi-fattoriale e comprende più tappe. Il ruolo dell'infezione cronica da HIV ed HCV nell'eziologia del carcinoma epatico è stato ormai chiarito e le migliori prove d'evidenza provengono dagli studi classici prospettici effettuati a Taiwan su oltre 20.000 maschi da Beasley e coll.<sup>2</sup>. Altri fattori di rischio per HCC comprendono: esposizione ad aflatoossina, fumo di sigarette, consumo di alcool, uso di contraccettivi orali, patologie familiari come emocromatosi, tirosinemia, ipercitrullinemia, deficit di alfa 1-antritripsina, glicogenosi tipo I e II, morbo di Wilson e intolleranza ereditaria al fruttosio<sup>3</sup>. La maggior parte degli HCC si sviluppa in pazienti con cirrosi epatica ed in portatori cronici d'infezioni da HBV e HCV. Recentemente è stato attribuito un ruolo di rilievo a nuove tecniche radiologiche ed a Marcatori Tumorali sia nella diagnosi precoce in pazienti a rischio, che nell'individuazione, in fase iniziale, di eventuali recidive dopo resezione chirurgica.

## Benefici e limiti di uno screening per HCC

L'epatocarcinoma presenta tutte le caratteristiche necessarie per una sorveglianza efficace: 1) sono chiaramente identificate le categorie a rischio, 2) sono disponibili metodi diagnostici poco costosi, non invasivi e molto diffusi (ecografia e determinazione dell'AFP) e, soprattutto, 3) se la neoplasia è individuata in fase precoce, è possibile una terapia efficace (resezione chirurgica, trapianto di fegato,

alcooolizzazione e termo-ablazione percutanea).

Rimane, tuttavia, aperto il dibattito sull'efficacia dello screening per HCC, in termini di sopravvivenza e di rapporto costo/beneficio, in quanto la sorveglianza non è stata ancora validata da risultati di trial prospettici randomizzati di grandi dimensioni che confrontino l'outcome dei pazienti sottoposti a screening con quello dei controlli. Lo screening (ecografia e determinazione dell'AFP) di soggetti a rischio, è stato proposto fin dal 1980<sup>4</sup> ed è regolarmente eseguito in paesi come la Cina.

Studi prospettici randomizzati eseguiti in Cina su pazienti ad alto rischio, che mettono a confronto per 5 anni i risultati di uno screening bi-annuale effettuato con AFP più ecografia con quelli ottenuti in un gruppo di controllo, dimostrano che la maggior parte degli HCC individuati nel gruppo dei pazienti sottoposti a screening era ad uno stadio precoce. La percentuale di sopravvivenza dopo 1-2 anni dalla diagnosi per i pazienti con HCC era rispettivamente dell'88.1 e del 77.5% nei soggetti sottoposti a screening e dello 0% nei soggetti del gruppo controllo<sup>5</sup>.

Un analogo studio di popolazione di tipo prospettico, condotto in Alaska per 16 anni su 1487 soggetti HBsAg positivi, ha dimostrato l'efficacia dello screening nell'identificare la maggior parte degli HCC ad uno stadio precoce con tempi di sopravvivenza significativamente più prolungati<sup>6</sup>. Una recente meta-analisi sull'argomento conclude, tuttavia, che anche se lo screening ha individuato più casi di cancro, non ha diminuito in modo significativo la mortalità<sup>7</sup>. Nessuno dei due trial randomizzati compresi nella meta-analisi, comunque, fa riferimento allo stress fisico e psicologico cui è sottoposto un paziente sottoposto a follow-up, soprattutto nel caso di un risultato falso positivo per il quale è sottoposto ad ulteriori accertamenti.

### **Marcatori Tumorali Sierici per HCC**

I marcatori tumorali sierici utilizzabili per l'identificazione dell'HCC possono essere divisi in 4 categorie<sup>8</sup>:

#### **1) Antigeni oncofetali e glicoproteici:**

*Alfa fetoproteina (AFP):* è una glicoproteina di 70 kDa, costituita da 591 aminoacidi e dal 4% di carboidrati in peso, sintetizzata nel periodo embrionale dall'endoderma del sacco vitellino e dal fegato fetale. Dopo la nascita, la concentrazione di AFP presente nel siero materno cala rapidamente, mentre nel neonato si mantiene elevata per 3-4 settimane, per poi abbassarsi alla concentrazione nell'adulto sano, nel quale può aumentare per processi di rigenerazione epatica. L'espressione genica dell'AFP è regolata a livello di trascrizione: durante la vita fetale i geni per l'AFP e per l'albumina sono coespressi sul cromosoma 4, con una prevalenza di trascritti per AFP; quando il gene dell'albumina raggiunge la completa attivazione, quello per AFP è represso, quindi i livelli ematici di AFP diminuiscono dopo la nascita, per raggiungere i valori tipici dell'adulto (20 mg/L) al 12°-18° mese di vita post-natale. L'AFP è stata identificata per la prima volta nel 1956 da sangue di cordone ombelicale umano mediante tecnica elettroforetica come una banda distinta nel tracciato in posizione alfa, vicino all'albumina.

Nel 1990 Taketa et al. ha evidenziato, mediante isoelettrofocalizzazione, una microeterogeneità della struttura

(separazione in 3 bande maggiori) dovuta a differenti gradi di sialilazione e fucosilazione della catena carboidratica legata all'asparagina in posizione 232, con conseguente diversa reattività nei confronti di varie lectine<sup>9</sup>. La banda I è presente nelle patologie epatiche benigne, la banda II (composta solo da glicoproteine monosialo) negli HCC e la III banda nei tumori delle cellule germinali.

La tipologia delle catene zuccherine non è geneticamente codificata, ma dipende dal set di enzimi di glicosilazione presenti nel reticolo endoplasmatico e nel complesso del Golgi. L'associazione della concentrazione sierica di AFP con HCC è stata dimostrata nel 1963 da Abelev in topi con HCC trapiantato.

L'AFP è considerato il più importante marcatore di screening per l'HCC, anche se la sua concentrazione aumenta fisiologicamente in gravidanza e in altri tumori (germinali del testicolo e del tratto gastro-enterico) e (transitoriamente) dopo epatectomia, nelle epatopatie croniche, nella cirrosi e nella esacerbazione delle epatiti virali. Circa il 66-80% di HCC presenta valori di AFP superiori al limite superiore dell'intervallo di riferimento, ma alcuni HCC non producono AFP; pertanto, la positività al marcatore non è stadio-dipendente e non esiste una corrispondenza sicura fra la concentrazione di AFP nel siero e le dimensioni del tumore, anche se i 2/3 dei pazienti con piccoli tumori asintomatici presentano concentrazioni di AFP < 200 µg/L e gli HCC sintomatici sono spesso associati a valori di AFP >1000 µg/L. La sensibilità e specificità di AFP per HCC dipendono, fondamentalmente, dal valore di cut-off adottato per la diagnosi di HCC: ad esempio nei diversi studi presenti in letteratura, la Se varia dal 76% (cut-off: 10.5 µg/L) al 53% (cut-off: 500 µg/L)<sup>10</sup>. Il cut-off diagnostico per HCC è oggetto di dibattito anche se spesso sono proposti valori di AFP di 400-500 µg/L in pazienti con cirrosi epatica. Questo valore di cut-off appare, tuttavia, problematico in termini assoluti, in quanto concentrazioni così elevate sono rare in pazienti con HCC di piccole dimensioni (di fatto, solo il 30% di questi pazienti ha valori >100 µg/L).

Studi recenti hanno attribuito un valore prognostico al marcatore: in genere HCC ben differenziati ed a lenta crescita non sono associati a concentrazioni elevate del marcatore, mentre pazienti con valori di AFP >1000 µg/L vanno incontro a sopravvivenza breve. Determinazioni di AFP in serie sono utili per il monitoraggio della risposta alla terapia: la riduzione della concentrazione di AFP (emivita di 3-4 giorni) dopo un trattamento chirurgico indica una risposta favorevole, mentre un aumento indica la presenza di una nuova lesione riconducibile ad una neoplasia AFP secernente.

Nella diagnosi di HCC in pazienti con cirrosi epatica per aumenti della concentrazione dell'AFP ≥200 e 400 µg/L la Sp è del 100% e la Se è, rispettivamente, del 36.3% e del 20.2%. L'AUC maggiore (0.922) con Se di 71.4% e Sp di 100% è stata riportata da un incremento progressivo medio di AFP >7 µg/L in almeno 3 determinazioni mensili<sup>11</sup>.

Una particolare applicazione della valutazione progressiva di AFP per una diagnosi precoce di HCC in pazien-

ti con patologie epatiche croniche si basa sul calcolo del Valore della Differenza di Riferimento (RCV), che quantifica l'incertezza combinata relativa alla variabilità analitica ed alla variabilità biologica dell'analita in esame. Una differenza fra due risultati di AFP seriati  $>$  RCV in un paziente a rischio di HCC può rappresentare il primo segnale di una trasformazione in senso neoplastico<sup>12</sup>.

Autorevoli società scientifiche raccomandano la determinazione dell'AFP per una diagnosi precoce di HCC in pazienti ad alto rischio e per una conferma diagnostica (con un cut-off di 400-500  $\mu\text{g/L}$ ):

- L'algoritmo di sorveglianza con cadenza semestrale basato su criteri non invasivi, indicato dall'European Association for the Study of the Liver (EASL) nella conferenza di Barcellona del 2000, è valido solo per pazienti con cirrosi compensata e si basa, oltre che sul riscontro di lesioni focali  $>$  2 cm ed ipervascolarizzazione arteriosa (con l'uso di due tecniche di immagini coincidenti), su un criterio combinato che prevede l'uso di una tecnica di immagine associata al dosaggio di AFP (riscontro di lesioni focali  $>$  2 cm con ipervascolarizzazione arteriosa e valori di AFP  $>$  400  $\mu\text{g/L}$ ).
- Anche secondo le Linee guida della British Society of Gastroenterology (2003) il monitoraggio effettuato ogni sei mesi con ecografia addominale e determinazione di AFP può consentire l'identificazione di neoplasie di dimensioni inferiori potenzialmente curabili e tale sorveglianza viene estesa a pazienti con cirrosi conseguente ad epatite B, ad epatite C, ad emocromatosi, ad abuso da alcool e con cirrosi biliare primaria.
- Le Linee guida della National Academy of Clinical Biochemistry (2005) propongono, per una diagnosi precoce di HCC nei pazienti a rischio, un utilizzo clinico di AFP basato sul superamento di un livello decisionale (400-500  $\mu\text{g/L}$ ), in associazione ad un'ecografia addominale, mentre il marcatore è proposto per una valutazione prognostica pre-operatoria con un cut-off di 20  $\mu\text{g/L}$  e per il monitoraggio del paziente, dopo resezione chirurgica o trapianto, mediante valutazione di determinazioni in serie.

**AFP-L3:** fra le tre glicofornie di AFP è quella caratterizzata da un'elevata affinità di legame, di tipo non covalente, per l'agglutinina Lens Culinaris (LCA) a seguito di una modifica post-traslazionale nella catena zuccherina biantennaria di AFP che si verifica negli HCC. Proposta come nuovo marcatore diagnostico, è caratterizzata anche da notevole valore prognostico in relazione all'aggressività di HCC, dato che è espressa dagli epatociti maligni e sembra rappresentare un indicatore di aggressività, piuttosto che di estensione di HCC. L'aumentata fucosilazione di AFP nell'epatocarcinoma sembra correlata all'iperespressione di alfa 1-6 fucosil transferasi che caratterizza questa neoplasia.

AFP-L3 correla con il grado istologico di malignità; le altre 2 isoforme, AFP-L1 (con affinità di legame bassa per LCA) e AFP-L2 (con affinità intermedia) prevalgono, rispettivamente, in patologie benigne infiammatorie croniche del fegato e nei tumori del sacco vitellino.

L'affinità di legame con la Concanavalina A (Con A) che si lega ai residui di mannosio interni al glicano, differenzia la sede di produzione di AFP (fegato, sacco vitelli-

no), piuttosto che la trasformazione in senso neoplastico del tessuto di produzione: quella prodotta dal sacco vitellino contiene N Acetil-glucosamina, che blocca il sito di legame con la Concanavalina A, per cui è caratterizzata dalla presenza di un'elevata percentuale di frazione Con A non reattiva.

L'utilità diagnostica di AFP-L3% (AFP-L3 / AFP totale  $\times$  100) è stata studiata, principalmente, in pazienti con HCC  $<$  3 cm, in cui la Sensibilità di AFP risulta molto bassa<sup>13,14</sup>.

Il calcolo del rapporto fra AFP-L3 e AFP totale, soprattutto nell'ambito dell'"area grigia" di AFP (10-200  $\mu\text{g/L}$ ) per la sovrapposizione dei dati relativi a pazienti con HCC e con patologie croniche del fegato, risulta utile sia nella diagnosi che nella prognosi di HCC, dal momento che nei pazienti con HCC l'AFP-L3% aumenta prima di un incremento delle concentrazioni di AFP totale, come risulta da studi prospettici antecedenti<sup>15</sup>.

A variazioni di cut-off dal 10 al 15% corrispondevano variazioni di sensibilità e specificità per AFP-L3%, rispettivamente, dal 70 al 96.9% e dal 90 al 92%; in particolare, valori di rapporto  $>$  15%, riscontrati dopo terapia, avevano un elevato valore predittivo per recidiva. I livelli più alti di AFP-L3% sono stati riscontrati in HCC con maggiore grado di vascolarizzazione e sono stati associati a neoplasie caratterizzate da un tempo di raddoppiamento più breve e da invasione metastatica della vena porta<sup>13</sup>.

Uno studio di coorte retrospettivo sull'utilità del dosaggio di AFP-L3% nella diagnosi di HCC, compiuto in America su 272 pazienti, ha dimostrato una differenza significativa fra le AUC relative alla diagnosi effettuata con AFP-L3% (AUC= 0,76) e AFP totale (AUC= 0.59), nell'intervallo di AFP totale: 10-200  $\mu\text{g/L}$ . Con un cut-off del 35% per AFP-L3% (pari a 11  $\mu\text{g/L}$  in valore assoluto) si raggiungeva una specificità del 100% che, nonostante il basso valore di sensibilità (35%) consentiva la diagnosi di un ulteriore 10% di HCC rispetto al dosaggio di AFP totale<sup>14</sup>. Gli autori suggeriscono l'uso di un algoritmo combinato dei marcatori (AFP totale, AFP-L3% e AFP-L3 in valore assoluto), che utilizzi i rispettivi valori di cut-off correlati al valore più elevato di specificità.

**Glipicano 3 (GPC3):** è una glicoproteina di superficie cellulare, espressa nella placenta e nel fegato fetale, presente nel siero del 53% dei pazienti con HCC.

## 2) Enzimi e isoenzimi:

**Gamma-glutamyl transferasi (GGT):** è secreta, principalmente, dalle cellule del Kupffer e dalle cellule endoteliali dei dotti biliari; solo gli isoenzimi I e II (fra i 13 esistenti) sono rilevabili nel siero di pazienti con HCC.

**Alfa 1-fucosidasi (AFU):** è un enzima che idrolizza i legami glicosidici di glicoproteine e glicolipidi, la cui determinazione in contemporanea ad AFP può migliorarne la sensibilità diagnostica.

**DCP (Des-gamma-carbossi-protrombina, proteina indotta da assenza di Vitamina K, PIVKA II)** è una protrombina anomala che ha perso la capacità di interagire con altri fattori della coagulazione. È stata isolata, mediante cromatografia, nel liquido ascitico di un paziente con HCC da Liebman che usando un metodo RIA la ha trovato au-

mentata in pazienti con HCC nel 1984<sup>15</sup>. Il precursore della protrombina ha 10 residui di Acido Glutammico nel dominio N-terminale che, per una normale funzionalità, devono essere carbossilati ad acido gamma carbossiglutammico in un processo mediato dagli ioni calcio. La struttura di DCP (caratterizzata mediante elettroforesi su gel) presenta, in media, 5 residui di acido-gamma-carbossi-glutammico in meno rispetto alla protrombina nativa (con cui condivide il PM e la sequenza aminoterminale) e 3 residui in più rispetto alle PIVKA indotte da farmaci anti Vitamina K, come la Warfarina.

Non è nota l'esatta causa della produzione di DCP da parte dei tessuti trasformati di HCC: gli studi di Shal et al. su ratto con epatoma di Morris<sup>16</sup> hanno evidenziato un'attività della gamma-glutamyl carbossilasi notevolmente più bassa in tessuti di HCC che mostrano positività per DCP rispetto a quelli DCP negativi. Si ipotizza che la DCP derivi da un difetto acquisito nella carbossilazione post-traslazionale del precursore della protrombina, vitamina K dipendente, o da una eccessiva produzione di precursori della protrombina, piuttosto che da un difetto intrinseco del precursore della protrombina<sup>17</sup>.

La somministrazione di Vitamina K in pazienti con HCC non porta alla scomparsa della DCP e la concentrazione del marcatore si riduce dopo resezione epatica o chemioterapia, indicando un ruolo primario del tumore epatico nella sintesi del marcatore. D'altra parte, sono stati riscontrati livelli elevati di alcuni derivati della Vitamina K in pazienti con HCC, suggerendo la possibilità di un anomalo metabolismo della Vitamina nelle cellule di epatocarcinoma. Studi recenti dimostrano un potente effetto mitogeno di DCP su colture cellulari dose dipendente, suggerendo che il marcatore sia un fattore di crescita sia di tipo autocrino che paracrino per l'epatocarcinoma<sup>18</sup>. Strutturalmente presenta due domini simili a quelli del Fattore di crescita degli epatociti (HGF) il cui recettore di superficie è sovra-espresso in molti HCC e si ipotizza che DCP abbia la capacità di legarsi a Met (il recettore per HGF) causando la proliferazione cellulare di HCC<sup>19</sup>. Alcuni studi indicano che DCP può essere usato come marcatore di prognosi avversa, indicando la possibilità di recidiva, di progressione tumorale e di invasione della vena porta<sup>20</sup>.

Il marcatore (cut-off= di 40 mAU/ml) mostra una migliore accuratezza diagnostica per HCC rispetto all'AFP (cut-off = 20 mg/L): 81.9% vs 68.5%, oltre ad un maggior potere discriminante per neoplasie di piccole dimensioni. La determinazione contemporanea dei 2 marcatori aumenta notevolmente la sensibilità diagnostica per HCC dei singoli parametri (Se= 59% per AFP, 77% per DCP, 83.6% per DCP/AFP)<sup>21</sup>.

La prima generazione di dosaggi per DCP (EITEST MONO, P-II, Eisai, Tokio) era caratterizzata da elevata specificità diagnostica per HCC e scarsa sensibilità analitica e non era in grado di rilevare le basse concentrazioni del marcatore degli HCC di piccole dimensioni. Un nuovo metodo ELISA (EITEST PIVKA II, Eisai), disponibile anche su piattaforma automatica (LiBASys, Wako) approvata dalla FDA, ha migliorato notevolmente la sensibilità del metodo. E' anche possibile effettuare, mediante separazione delle isoforme con cromatogra-

fia a scambio ionico e lettura finale degli immunocomplessi in fluorescenza, la determinazione quantitativa, in batch, di DCP, AFP e AFP-L3 (con valutazione della relativa frazione percentuale).

#### 3) **Marcatori genici circolanti:**

*AFP mRNA*: identificato mediante RT-PCR, ha un valore prognostico sfavorevole, in quanto può essere indice di metastasi.

*GGT mRNA*: ne esistono 3 tipi (A, B, e C) prodotti, rispettivamente, dalle cellule epatiche in condizioni normali ed in caso di neoplasie benigne, da cellule di HCC e dalla placenta. Durante lo svilupparsi di un HCC può verificarsi uno shift dal tipo A al tipo B. Ha un notevole valore prognostico sfavorevole e può essere un utile complemento all'AFP per la diagnosi di HCC.

*bTERT mRNA* (mRNA di trascrittasi inversa di telomerasi umana): è stata rinvenuta anche nel siero di pazienti con cancro mammario, ma è un valido indicatore di scarsa prognosi per i pazienti con HCC.

#### 4) **Citochine:**

*Fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF)*: è un omodimero che regola la neo-vascularizzazione dei tumori e rappresenta un marcatore diagnostico e prognostico per HCC.

*Interleuchina -8 (IL-8)*: è una citochina che regola la funzionalità dei neutrofilo riguardo alla chemiotassi, al rilascio enzimatico ed alla espressione di molecole di superficie. Regola la crescita delle cellule tumorali ed il processo di metastatizzazione dell'HCC per il quale è considerato un ottimo indicatore prognostico.

*Fattore di crescita trasformante-beta 1 (TGF-B1)*: è un fattore di crescita negativo che correla con l'immunosoppressione durante la progressione di HCC.

*Fattore di crescita tumore-specifico (TSGF)*: è rilasciato nel sangue periferico dalle cellule del tumore durante la sua crescita.

#### **Marcatori sierici in altre neoplasie epatiche**

Nella rara *variante fibrolamellare dell'epatocarcinoma* la prognosi è migliore rispetto all'HCC convenzionale; poiché AFP non è prodotta in eccesso, possono essere utili per l'individuazione della neoplasia altri due marcatori sierici: la proteina legante la Vitamina B12 e la neurotensina<sup>22,23</sup>.

Il *Colangiocarcinoma* si riscontra nel 10% delle neoplasie epatiche primitive e può essere:

- intraepatico, a derivazione dalle cellule dei piccoli dotti biliari, con manifestazioni cliniche simili all'HCC;
- ilare o Tumore di Klatskin, che si sviluppa attorno alla biforcazione del dotto epatico comune e si manifesta con dolore, perdita di peso e ittero ostruttivo.

Nessun marcatore tumorale sierico può essere usato per fare un'accurata diagnosi differenziale di Colangiocarcinoma nei confronti di una malattia benigna: il CA 19-9 ha mostrato una sensibilità diagnostica del 55% con un cut-off di 100 U/ml<sup>24</sup>.

Il CA 19-9 è, tuttavia, usato (valutando il risultato rispetto ad un livello decisionale) come marcatore di prima scelta per fare un bilancio di base (estensione) della neoplasia e per un riconoscimento precoce di recidiva o per il monitoraggio della terapia (valutando la variazione del risultato rispetto al valore precedente).

## Profili di espressione genica per HCC

Il processo di trasformazione neoplastica coinvolge la variazione di espressione di molti geni.

In passato, i *profili di espressione genica* rappresentavano, dal punto di vista operativo, una sfida immane, in quanto i metodi di analisi disponibili, come il Northern blotting, richiedevano molto RNA ed erano adatti solo per un'analisi gene per gene, mentre la realizzazione dei profili di comparazione di interi trascrittomi con tecniche molecolari tipo SAGE o analisi RDA, richiede tempi molto lunghi, è molto laboriosa e poco adatta all'analisi di un grande numero di campioni. Grazie alla tecnologia di recente introduzione dei cDNA microarray, utilizzata con successo anche per l'individuazione, in via sperimentale, di modelli molecolari per la valutazione delle neoplasie, si può effettuare un'analisi in parallelo di moltissimi geni (profili genici) per un ampio numero di pazienti e con poco materiale. Lo studio dei profili globali di espressione genica mediante questa tecnica consiste nella valutazione contemporanea dei livelli di centinaia di mRNA prodotti da determinate cellule, mediante ibridazione con sequenze nucleotidiche note complementari, disposte in specifiche posizioni su un supporto di vetro o di silicene.

L'assenza di una predisposizione ereditaria evidente per lo sviluppo di un HCC, come quella presente in altre neoplasie (come colon-retto, ovaio, mammella), ha reso difficile l'identificazione di geni chiave per l'epatocarcinoma ed ha impedito la definizione di una gerarchia di eventi genetici coinvolti nei vari stadi della carcinogenesi epatica. Studi di biologia molecolare, di analisi microsatellitare e di citogenetica molecolare hanno, d'altra parte, mostrato un'ampia varietà di alterazioni cromosomiche, dal riarrangiamento genomico legato all'integrazione di HBV-DNA, alla perdita di eterozigosi in numerosi loci di cromosomi diversi. Sono state riscontrate, inoltre, molte amplificazioni geniche ed inattivazioni di geni oncosoppressori da mutazioni o delezioni<sup>1</sup>.

L'eterogeneità genetica dell'HCC è legata alla eterogeneità dei fattori eziologici implicati: ad esempio nei casi HBV correlati si assiste ad una maggiore instabilità cromosomica, con fenotipo poco differenziato e pattern di crescita cellulare accelerato; nei casi HCV correlati, invece, prevalgono lesioni genetiche ed epigenetiche pleiomorfe.

La possibilità di analizzare contemporaneamente più fenotipi molecolari consente di discriminare il fenotipo clinico di interesse, spesso indistinguibile con le tecniche tradizionali, ed ha portato alla identificazione di numerosi geni sottoposti a modulazione nei pazienti con HCC, in particolare di quelli la cui espressione correla con la progressione tumorale, con la formazione di metastasi a distanza e con una recidiva.

Dai risultati di studi effettuati per individuare geni chiave responsabili dell'epatocarcinogenesi è emersa un'espressività inferiore di geni a funzione nota, mentre sono state individuate espressioni alterate in geni a funzione sconosciuta, che potrebbero essere sottoposti ad ulteriori studi per verificare il loro ruolo nel processo di trasformazione neoplastica del tessuto epatico<sup>25</sup>.

## Profili di espressione proteomica per HCC

Oltre all'identificazione di geni target che possono gio-

care un ruolo importante nella cancerogenesi, è possibile identificare in varie neoplasie i profili di espressione proteomica, vale a dire le variazioni dei livelli delle proteine correlabili alle alterazioni genetiche riscontrate. Infatti, oltre a differenze legate all'efficienza della traduzione (studio del trascrittoma), possono verificarsi ulteriori variazioni nel passaggio dal genoma al proteoma: i trascritti dei vari geni possono andare incontro a variazioni di stabilità post-traduzionale e le stesse proteine prodotte possono subire ulteriori modificazioni chimiche.

Lo sviluppo di metodi analitici in grado di monitorare queste variazioni è, quindi, di particolare interesse pratico per l'individuazione dei nuovi biomarcatori tumorali. Gli sforzi in questa direzione si basano sulla conoscenza del *profiling proteomico* utilizzato come "fingerprint" e sono concentrati sia sulla ricerca di un'unica proteina che subisce un'alterazione (aumento o diminuzione) dell'espressione genica sia sull'individuazione di una variante proteica indotta dalla neoplasia e rilasciata in circolo.

La tecnologia del Protein Biochip Assay ha segnato il passaggio della proteomica da strumento di ricerca a strumento di utilizzo quotidiano, la cui accuratezza è il risultato di una collocazione spaziale del legante alla superficie del biochip che consente una elevata riproducibilità dei risultati e la possibilità di analizzare, contemporaneamente, diversi analiti per uno stesso campione.

L'enorme quantità di dati generati con un'analisi proteomica richiede l'adozione di strategie dirette a migliorare la qualità dei risultati, con una standardizzazione della fase pre-analitica ed analitica e la misura della variabilità biologica intra ed inter-individuale dei biomarcatori. E' inoltre, necessario, ricorrere a strumenti bioinformatici per estrarre informazioni utili, per cui sono state introdotte Reti Neuronal Artificiali come strumento di ausilio per effettuare una diagnosi clinica.

Oltre alla scelta di un efficace metodo di frazionamento per rimuovere le proteine "abbondanti", è importante quella relativa alla metodica da utilizzare per l'analisi del campione.

Tramite l'utilizzo della SELDI-TOF Spettrometria di Massa sono stati effettuati molti studi per identificare profili proteomici associati all'HCC. In uno studio caso controllo realizzato con 2.834 campioni sottoposti ad analisi bioinformatica, sono stati identificati 88 profili di proteine iper-esprese nei pazienti con HCC rispetto a quelli con cirrosi epatica e con 2 sottogruppi in relazione a pattern di predizione per invasione linfonodale e metastatizzazione<sup>26</sup>.

In uno studio successivo sono stati individuati, nell'ambito di 261 picchi che differenziavano pazienti con HCC da quelli con Cirrosi Epatica, 11 picchi corrispondenti a determinate proteine di 3 diversi microchip (inclusa la citostatina C, overespressa nei pazienti con HCC), utilizzabili per la diagnosi di HCC con una sensibilità del 79% ed una specificità dell'86%. Questa metodica consentiva una migliore accuratezza diagnostica rispetto all'uso dei tradizionali marcatori (AFP, AFP-L3 e DCP) e l'associazione della SELDI-TOF-MS con il contemporaneo dosaggio di questi ultimi, incrementava i valori di sensibilità al 95% (mentre la specificità si riduceva al 73 %) <sup>27</sup>. Gli autori dello studio sottolineano un potenziale vantaggio dell'analisi proteo-

mica nella identificazione immediata di HCC di piccole dimensioni.

## Conclusioni

La diagnosi precoce di HCC rimane un obiettivo chiave per il raggiungimento di una prognosi migliore per il paziente, considerati i recenti progressi terapeutici nei confronti di neoplasie epatiche di piccole dimensioni. Il ruolo del Laboratorio di Patologia Clinica nella individuazione precoce, in pazienti a rischio di epatocarcinoma, di una neoformazione o di una recidiva, dopo resezione chirurgica di un HCC, è di fondamentale importanza. Spesso, infatti, le informazioni fornite da una appropriata gestione dei biomarcatori possono rappresentare per l'oncologo uno strumento diagnostico più accurato rispetto ad altre procedure di imaging. L'anticipazione pre-clinica della diagnosi di HCC, ottenuta grazie alla sorveglianza con procedure di screening basate anche sull'uso di biomarcatori sierici, ha ridotto in Cina di circa il 37% la mortalità per HCC<sup>28</sup>.

Pur se l'uso di AFP in fase di diagnosi e screening per l'HCC è ormai consolidato, dovrebbero essere stabiliti valori di riferimento metodo-specifici ed appare pressante la necessità di validare protocolli ottimali per il follow-up della neoplasia. L'introduzione nella pratica clinica di tecnologie e metodiche di nuova generazione per il dosaggio di nuovi biomarcatori consentirà una diagnosi ancora più precoce<sup>29</sup>.

## Bibliografia

- Diamandis EP, Fritsche H Jr, Lilja H, Chan D, Schwartz M. Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications. Washington DC, USA: AACR Press; 2002.
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2:1129-33.
- Bosh FX, Ribes J, Borràs J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999; 19:271-85.
- Tang ZY, Yang BH, Tang CL, Yu YQ, Lin ZY, Weng HZ. Evaluation of population screening for hepatocellular carcinoma. *Chin Med J* 1980; 93:795-9.
- Yang B, Zhang B, Xu Y, Wang W, Shen Y, Zhang A, Xu Z. Prospective study of early detection for primary liver cancer. *J Cancer Res Clin Onc* 1997; 123:357-60.
- McMahon BJ, Bulkow L, Harpster A, Snowball M, Lanier A, Sacco F, et al. Screening for hepatocellular carcinoma in Alaska natives infected with chronic hepatitis B: a 16-year population-based study. *Hepatology* 2000; 32:842-6.
- Wu YT, Dickinson JA. Alpha-fetoprotein and/or liver ultrasonography for liver cancer screening in patient with chronic hepatitis B. *Cochrane database Syst Rev* 2003; 2:CD002799.
- Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1175-81.
- Taketa K, Sekiya C, Namiki M, Akamatsu K, Ohta Y, Endo Y, et al. Lectin-reactive profiles of alpha-fetoprotein characterizing hepatocellular carcinoma and related conditions. *Gastroenterology* 1990; 99:508-18.
- Lopez JB. Recent developments in the first detection of hepatocellular carcinoma. *Clin Biochem Rev* 2005; 26:65-79.
- Arrieta O, Cacho B, Morales-Espinosa D, Ruelas-Villavicencio A, Flores-Estrada D, Hernández-Pedro N. The progressive elevation of alpha fetoprotein for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *BMC Cancer* 2007; 7:28.
- Trape J, Botargues JM, Porta F, Ricos C, Badal JM, Salinas R. Reference Change Value for alpha-fetoprotein and its application in early detection of Hepatocellular Carcinoma in patients with hepatic disease. *Clin Chem* 2003; 49:1209-11.
- Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1175-81.
- Leerapun A, Suravarapu SV, Bida JP, Clark RJ, Sanders EL, Mettler TA, et al. The utility of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5:394-402.
- Liebman HA. Isolation and characterization of a hepatoma-associated abnormal (des-gamma-carboxy) prothrombin. *Cancer Research* 1989; 49:6493-7.
- Shah DV, Engelke JA, Suttie JW. Abnormal prothrombin in the plasma of rats carrying hepatic tumors. *Blood* 1987; 69: 850-4.
- Inagaki Y, Tang W, Xu H, Wang F, Nakata M, Sugawara Y, et al. Des-gamma-carboxyprothrombin: Clinical effectiveness and biochemical importance. *Biosci Trends* 2008; 2:53-60.
- Fujikawa T, Shiraha H, Yamamoto K. Significance of des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. *Acta Med Okayama* 2009; 63:299-304.
- Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi T, et al. Des-gamma carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2005; 280:6409-15.
- Hakamada K, Kimura N, Miura T, Morohashi H, Ishido K, Nara M, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin as an important prognostic indicator in patients with small hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14:1370-7.
- Wang CS, Lin CL, Lee HC, Chen KY, Chiang MF, Chen HS, et al. Usefulness of serum des-gamma carboxy-prothrombin in detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11:6115-9.
- Paradinas FJ, Melia WM, Wilkinson ML, Portmann B, Johnson PJ, Murray-Lyon IM, et al. High serum vitamin B12 binding capacity as a marker of the fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma. *Br Med J* 1982; 285:840-2.
- Collier NA, Weinbren K, Bloom SR, Lee YC, Hodgson HJ, Blumgart LH. Neurotensin secretion by fibrolamellar carcinoma of the liver. *Lancet* 1984; 1:538-40.
- Patel AH, Harnois DM, Klee GG, La Russo NF, Gores GJ. The utility of CA 19-9 in the diagnosis of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 204-7.
- Mao HJ, Li HN, Zhou XM, Zhao JL, Wan DF. Monitoring microarray-based gene expression profile changes in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11:2811-6.
- Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, et al. Comprehensive Proteomic Profiling identifies serum proteomic signatures for detection of Hepatocellular Carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003; 49:752-60.
- Zinkin NT, Grall F, Bhaskar K, Otu HH, Spentzos D, Kalmowitz B, et al. Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Clin Cancer Res* 2008; 14:470-7.
- Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130:417-22.
- Sturgeon CM, Duffy MJ, Hofmann BR, Lamerz R, Fritsche HA, Gaarenstroom K, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Liver, Bladder, Cervical, and Gastric Cancers. *Clin Chem* 2010; 56:e1-48.