



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

**CARENZA DELL'ENZIMA GLUCOSIO-6-FOSFATO
DEIDROGENASI E RISCHIO DI CARCINOMA
EPATOCELLULARE. UNO STUDIO RETROSPETTIVO**

Relatore

Prof. MARIA PINA DORE

Tesi di laurea di

SILAS ASSY

Anno Accademico 2016-2017

INDICE

	Pagina
Abbreviazioni	3
1. RIASSUNTO.....	4
2. INTRODUZIONE	6
2.1 Epidemiologia e fattori di rischio	
2.2 Sintomi	8
2.3 Diagnosi e terapia	9
3. MATERIALI E METODI	18
3.1 Casistica	18
3.2 Analisi statistica dei dati	20
4. RISULTATI	22
4.1 Caratteristiche generali dei partecipanti allo studio	22
7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	34
Bibliografia	
Sitografia	

ABBREVIAZIONI

HCC, HepatoCellular Carcinoma, carcinoma epatocellulare

HCV, virus dell'epatite C

HBV, virus dell'epatite B

OR, odds ratio

CI, Confidence Interval, intervallo di confidenza

G6PD, glucosio-6-fosfato deidrogenasi

6PGD, 6-fosfogluconato deidrogenasi

1. RIASSUNTO

Introduzione. Il carcinoma epatocellulare (*HepatoCellular Carcinoma*, HCC) ha un tasso di prevalenza che lo pone al quinto posto nel mondo, e la sua incidenza è in costante aumento sia nei paesi industrializzati sia in quelli in via di sviluppo. La sua morbilità e mortalità sono molto elevate. Nonostante i numerosi progressi in campo terapeutico la sopravvivenza a 5 anni non raggiunge ancora il 20%. Abitualmente il tumore insorge in pazienti affetti da cirrosi epatica: tra i fattori di rischio più noti vanno annoverati le infezioni croniche da virus C e B, l'epatopatia alcolica e la steatoepatite non-alcolica. Vari studi effettuati su modelli sperimentali, sia *in vitro* che *in vivo* negli animali da laboratorio, sembrano indicare nella carenza dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), una condizione genetica comune nei paesi Mediterranei, un fattore "protettivo" nei riguardi dell'insorgenza di tale neoplasia. Nel presente studio, il cui disegno è di tipo retrospettivo caso-controllo, abbiamo voluto sottoporre a verifica l'ipotesi di una eventuale associazione tra deficit di G6PD ed insorgenza di carcinoma epatocellulare in una casistica di pazienti del Nord Sardegna, popolazione nella quale il difetto genetico presenta una frequenza media di circa il 12%.

Pazienti e Metodi. I dati utilizzati nella presente analisi provengono da un database in formato digitale contenente informazioni su 11.568 pazienti (4.417 uomini e 7.151 donne, età mediana 55 anni ed intervallo interquartile 27 anni) sottoposti ad esame endoscopico dell'apparato gastrointestinale tra il gennaio 2002 e il dicembre 2017 presso gli ambulatori dell'Unità di Gastroenterologia dell'Università di Sassari. L'ipotetica associazione tra HCC e deficit di G6PD è stata valutata mediante procedure statistiche uni- e multivariate.

Risultati. La frequenza della carenza di G6PD nell'intera casistica è risultata essere dell'11,5%, sostanzialmente sovrapponibile a quella riportata nella popolazione generale sarda. La

proporzione di individui con carenza totale di G6PD era dell' 8,0% negli uomini e dell' 11,7% nelle donne. La proporzione di pazienti con carenza parziale era di 0% negli uomini e del 2,1% nelle donne. In totale sono stati identificati 114 pazienti con diagnosi di HCC (tasso di prevalenza 1%). La diagnosi di tumore era più frequente negli uomini (1,7%; 77/4.422) che nelle donne (0,5%; 39/7.163). La frequenza della carenza di G6PD nei pazienti esenti da HCC era del 15,3% mentre risultava essere appena del 5,2% ($p=0.039$) nei pazienti in cui il tumore era insorto. L'analisi della regressione logistica ha confermato l'effetto protettivo della G6PD con un odds ratio di 0.34 (95% CI 0.128 – 0.887). Inoltre, un'età superiore a 64 anni (OR: 1.979, 95% CI 1.273 – 3.167), l'appartenenza al sesso maschile (OR: 2.011, 95% CI 1.241 – 3.258), la presenza di diabete (OR: 2.329, 95% CI 1.399 – 3.876), la pregressa infezione da virus C (OR: 3.446, 95% CI 1.914 – 6.207) e virus B (OR: 3.432, 95% CI 1.580 – 7.453) sono risultati essere fattori di rischio indipendenti.

Conclusioni. I risultati del presente studio indicano che la carenza di G6PD costituisce un fattore protettivo per l'insorgenza di HCC, confermando in tal modo gli studi *in vitro* e *in vivo* condotti in precedenza; la spiegazione più plausibile sembra risiedere nell'inibizione della via biochimica dei pentosofosfati che comporta una minore sintesi di acidi grassi necessari per la proliferazione cellulare nonché una ridotta generazione di specie reattive dell'ossigeno che promuovono la cancerogenesi.

2. INTRODUZIONE

A livello planetario la prevalenza dei tumori è in continuo aumento e costituisce un grave problema sanitario sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo [1]. Si stima che nel 2012 nel mondo i nuovi casi di cancro siano stati 14,1 milioni e si prevede che nel 2035 saranno circa 24 milioni [2]. Il numero dei decessi per neoplasia nel 2012 a livello mondiale è stato pari a 8,2 milioni, equivalente al 5.2% del numero complessivo di decessi [3]. L'aumento dell'incidenza delle neoplasie è stato attribuito a vari fattori di rischio, alcuni dei quali modificabili come l'ambiente e l'occupazione, l'obesità, la sedentarietà, l'abitudine al fumo di sigaretta, la dieta di tipo "occidentale", ed altri non modificabili, tra cui i fattori genetici, il sesso e l'età avanzata [4].

Il carcinoma epatocellulare (*hepatocellular carcinoma*, HCC) occupa il quinto posto nel mondo nella lista delle neoplasie più diagnosticate nel sesso maschile e si stima che ogni anno muoiano a causa di questo tumore tra 250.000 e un milione di persone [1–4]. La distribuzione geografica del carcinoma epatico primitivo varia ampiamente e dipende dalla presenza di fattori eziologici specifici.

Epidemiologia e fattori di rischio.

L'incidenza annuale per HCC stimata nel 2010 è di circa 6 casi ogni 100.000 individui [5]. Data l'elevata mortalità di questo carcinoma il numero di decessi corrisponde al tasso di incidenza. Uno studio basato sulle popolazioni negli Stati Uniti ha identificato variazioni etniche e razziali in relazione all'incidenza di HCC [4]. L'incidenza si è dimostrata più alta fra gli asiatici, approssimativamente il doppio rispetto agli ispanici bianchi (11,0 contro 6,8 su 100.000 individui ogni anno) e 4 volte più alto rispetto ai Caucasic (2,6 ogni 100.000 individui per anno). In altre analisi di database statunitensi il tasso di incidenza di isolani asiatici e del pacifico (APIs), neri, nativi americani e dell'Alaska, e bianchi si è rivelato

rispettivamente di 7,8 – 4,2 – 3,2 – 2,6 ogni 100.000 individui [6]. Questi dati supportano la teoria secondo cui, comparati ad altri gruppi etnici, gli APIs sono storicamente vittime del più alto tasso di incidenza di HCC. Tuttavia, dati acquisiti dal programma SEER del National Cancer Institute suggeriscono che l'incidenza di HCC inizia ad avere un declino in questo gruppo etnico, e che gli APIs sono proiettati verso una percentuale più bassa di casi di HCC in confronto a ispanici e neri nel corso dei prossimi 15 anni [7]. Benchè ci si aspetti che la percentuale di HCC in questi gruppi rimanga la più alta, si prevede un aumento del tasso di HCC fra i bianchi. A causa di questo incremento, entro il 2030 ci si aspetta che il tasso di HCC negli uomini bianchi superi quello degli APIs. L'incidenza di HCC varia ampiamente a seconda dei paesi [8]. La distribuzione di HCC varia anche in base alla razza e al gruppo etnico all'interno dello stesso paese e fra regioni all'interno della stessa nazione. Queste differenze estreme della distribuzione di HCC sono probabilmente legate a variazioni regionali dell'esposizione ai virus delle epatiti e a patogeni ambientali. Per esempio la frequenza di portatori di HBV è relativamente alta nelle regioni ad alta incidenza e bassa in quelle ad alta incidenza. E' stato osservato un progressivo aumento del tasso di incidenza in America, America Latina e Europa centrale [6–9]. Le regioni ad alta incidenza (più di 15 casi su 100.000 individui per anno) includono l'Africa sub-sahariana, la Repubblica Popolare Cinese, Hong Kong e Taiwan [7]. L'incidenza è di 24,2 per 100.000 in alcune parti dell'Africa, e di 35,5 per 100.000 in Asia orientale [8]. Oltre il 40% di tutti i casi di HCC si riscontrano nella Repubblica Popolare Cinese dove ha un'incidenza annuale di 137.000 casi [9]. Il Giappone ha avuto uno dei più alti tassi di incidenza di HCC associato ad un'infezione cronica da HCV; tuttavia questo tasso sembra stia decrescendo [9]. Le aree di incidenza intermedia includono numerosi paesi in Europa occidentale e orientale, Thailandia, Indonesia, Jamaica, Haiti, Nuova Zelanda (popolo Mahori) e Alaska (popolo Inuit) [6]. Il nord e il sud America, gran parte dell'Europa, l'Australia e parte del medio oriente sono considerate aree a

bassa incidenza con meno di 3 casi riportati ogni 100.000 abitanti per anno. Tuttavia negli Stati Uniti il tasso di incidenza è incrementato nell'ultimo ventennio, probabilmente in relazione a un grande gruppo di persone affette a lungo da epatite C cronica [4, 6–9]. Il tasso ha cominciato ad aumentare progressivamente a metà degli anni '80 molto probabilmente a causa dell'incremento dell'incidenza di cirrosi epatica correlata ad un'infezione cronica da HCV e steatosi epatica non alcolica, in combinazione con un grande afflusso di immigranti provenienti dall'est asiatico e altri paesi geografici con alte percentuali di infezioni virali endemiche da HBV [8].

L'incidenza è tre volte più alta negli uomini rispetto alle donne (11,5 vs 3,9 su 100'000 persone per anno) [10–11]. Nonostante si sia verificata una diminuzione del tasso di incidenza per altre forme di cancro (ad esempio polmonare, del seno e carcinoma prostatico), il tasso relativo ad HCC è invece aumentato del 2,8% su base generale annua e nello specifico del 3,4% nel sesso femminile. È rilevabile anche un "effetto coorte", segnalato ad esempio negli USA: l'esposizione al virus dell'epatite C e quindi l'infezione da HCV. È stata particolarmente elevata negli individui nati negli States a cavallo fra il 1945 e il 1965 (approssimativamente un tasso del 2,5% e dunque 5 volte maggiore rispetto al tasso relativo ai nati in anni diversi da questi). Un'analisi condotta su molteplici dati relativi a diverse cause di morte, acquisiti dal National Center for Health Statistics, ha dimostrato che in questa coorte di nascita HCV e quindi l'HCC sono fortemente responsabili dell'alto tasso di mortalità [10]. Fra tutti i deceduti fra il 1999 e il 2013 per un'infezione da HCV, i nati a cavallo fra il 1945 e il 1965 hanno avuto la percentuale di mortalità più alta legata ad HCC rispetto a tutti gli individui nati prima del 1945 o dopo il 1965. Basandosi sui dati ci si aspetta che il tasso di mortalità in questo gruppo continui ad aumentare mentre che decresca quello riguardante i nati in anni successivi al '65 [10].

Distribuzione in base al sesso e all'età - In ogni parte del mondo gli uomini sono

maggiormente predisposti rispetto alle donne a sviluppare HCC [11]. Questa disparità è più pronunciata nelle regioni ad alta incidenza, dove gli uomini sono affetti da 2,1 a 5,7 volte più frequentemente rispetto alle donne (per una media 3,7:1). Il rapporto decresce fino a un valore di 2,4:1 nelle aree ad incidenza intermedia ed è minore nelle regioni a bassa incidenza. In Nord America il tasso di incidenza per individui di sesso maschile e di sesso femminile era, nel 2008, rispettivamente di 6,8 e 2,2 ogni 100.000 individui [4]. Nonostante il meccanismo non sia ancora completamente compreso, le differenze che riguardano la distribuzione di HCC in base al sesso si crede siano collegate a differenti stati dei portatori di epatite, all'esposizione a tossine ambientali, all'effetto trofico degli androgeni [10–11], e/o agli effetti potenzialmente protettivi degli estrogeni mediati attraverso l'inibizione dell'interleuchina 6 [11]. La maggioranza dei casi di HCC si manifesta in pazienti con patologie epatiche croniche o cirrosi epatica. Quindi, i pazienti più vecchi con patologie epatiche di vecchia data sono più predisposti allo sviluppo di HCC. Numerosi e approfonditi studi prospettici condotti sia in Asia che in Europa occidentale hanno messo in evidenza un'età media di insorgenza fra i 50 e i 60 anni [10].

Fattori di rischio

Si stima che almeno l'80% dei casi di HCC si associ a una pregressa infezione da HBV o HCV [5]. È stata identificata una varietà di importanti fattori di rischio per lo sviluppo dell'epatocarcinoma cellulare. Questi includono infezioni da HBV, infezioni croniche da HCV, emocromatosi ereditaria e cirrosi (da qualsiasi cosa sia causata) [12]. La sorveglianza per epatocarcinoma cellulare è indicata per tutti quei pazienti con quei disordini che li espongono ad un rischio aumentato. In uno dei maggiori centri di riferimento degli Stati Uniti i fattori di rischio maggiormente osservati per HCC sono stati infezioni da HCV, consumo di alcolici e quadri di steatosi epatica non alcolica [26]. Nonostante ciò HCC può ricorrere anche

in pazienti senza fattori di rischio noti [27].

L'associazione fra un'infezione cronica da HBV e l'epatocarcinoma cellulare è stata dimostrata in numerosi studi [20.22.28-31]. HCC può presentarsi in pazienti con un'infezione cronica da HBV anche in assenza di cirrosi [32]. Tuttavia una percentuale di pazienti con HBV, fra il 70 e il 90%, che sviluppa HCC, presenta un quadro di cirrosi. A causa della stretta correlazione fra HCC e HBV, lo screening per HCC è vivamente consigliato a tutti quei pazienti affetti da epatite B. Insieme alla cirrosi altri fattori di rischio sono stati associati alla possibilità di sviluppare HCC fra i pazienti con HBV, fra i quali una presente carica virale, la presenza dell'antigene HbeAg e la presenza dell'antigene di superficie HbsAg.

Il rischio di epatocarcinoma cellulare è molto più alto in nei pazienti con alti livelli sierici di HBV DNA rispetto a quei pazienti che presentano livelli più bassi (10'000 copie/mL) [33-37]. Uno degli studi più grandi mai eseguiti per dimostrare questo fatto è stato condotto a Taiwan basandosi su una coorte di 3653 pazienti reclutati fra il 1991 e il 1992, i quali risultavano positivi per HbsAg e negativi per gli anticorpi anti-HCV [33]. 164 pazienti hanno sviluppato HCC (il 4,5%) durante un follow up intermedio di 11 anni. Al tempo dell'ingaggio l'età media dei pazienti positivi per HbsAg era di 45 anni; l'85% era negativo per HbeAg, il 94% aveva valori normali per l'alanina aminotransferasi (ALT) e il 2% presentava cirrosi epatica. Una più alta incidenza di HCC è stata riscontrata in relazione ai livelli di HBV DNA all'inizio dello studio. Fra quei pazienti con livelli di HBV DNA < 300 copie per mL sono stati riscontrati 108 casi per 100'000 individui in un anno (incidenza cumulativa del 1.3%). Per quei pazienti con livelli di HBV DNA >1'000'000 di copie per mL sono stati riscontrati 1152 casi su 100'000 individui per anno (incidenza cumulativa del 14,9%).

I livelli sierici di HBV DNA continuano ad essere considerati come un fattore di predizione indipendente per il carcinoma epatico, anche indipendentemente da altri fattori legati ad HCC come il sesso, l'età, il fumo di sigaretta, il consumo di alcolici, i livelli sierici di HbeAg, i

livelli sierici di ALT e la presenza alla base di un quadro di cirrosi epatica. La maggior parte dei soggetti di questo studio hanno contratto un'infezione da HBV perinatale e la loro età media al momento della partecipazione allo studio era di 45 anni, il che suggerisce che un periodo prolungato di replicazione del virus HBV potrebbe essere associato ad un aumentato rischio di sviluppo di HCC. Nonostante ciò, a causa della natura oscillante dell'infezione da HBV, il valore prognostico di un singolo valore della carica virale di HBV è limitato. Per esempio, il rischio di sviluppare HCC in una donna di 20 anni nella quale è stata riscontrata una singola misurazione del livello sierico di HBV DNA di 1'000'000 di copie per mL, è molto diverso rispetto al rischio di una donna cinquantenne che ha avuto livelli sierici di HBV DNA pari ad 1'000'000 di copie per mL per cinque interi decenni. Comunque non è chiarissima l'applicabilità di questi dati a quegli individui portatori di HbsAg che hanno contratto l'infezione da HBV in età adulta. Attualmente si consiglia quindi di seguire i protocolli di sorveglianza a tutti quei pazienti che hanno avuto valori elevati per HBV DNA e chiari segni clinici di infiammazione attiva (valore elevato di ALT) per molti anni consecutivamente.

La positività ad HbeAg, la quale indica una replicazione virale in atto, è anch'essa associata allo sviluppo di HCC [38-43]. Uno dei maggiori studi condotti per attestare questo dato è stato condotto reclutando 11'893 taiwanesi i quali sono stati testati inizialmente per HbsAg e HbeAg e in seguito monitorati per circa 10 anni [43]. Durante il follow-up sono stati riscontrati 11 casi di carcinoma epatocellulare. L'incidenza di HCC si è dimostrata significativamente più alta in quei pazienti che erano positivi per HbsAg e HbeAg (1169 individui su 100'000 per anno) rispetto a quelli risultati positivi unicamente per HbsAg (324 persone su 100'000 per anno) o che sono risultati negativi sia per HbsAg che per HbeAg (39 individui su 100'000 per anno). Il riscontro di HbeAg si è mantenuto determinante anche dopo aver migliorato aspetti importanti come il consumo di alcolici e la dipendenza da fumo

di sigaretta.

Il rischio di contrarre HCC è comunque più elevato in quei pazienti che sono HbsAg positivi ma negativi per HbeAg (denominati portatori inattivi) rispetto al resto della popolazione generale [30.31.37.44]. Inoltre è stato dimostrato che individui guariti dal punto di vista sierologico hanno comunque un tasso di incidenza più alto relativo allo sviluppo di carcinoma epatocellulare. Il rischio nei portatori inattivi è stato valutato conducendo uno studio sulla popolazione dello stato di Taiwan [31]. Lo studio ha incluso 20'069 partecipanti affetti da HBV, di cui 1932 presentavano livelli sierici di HBV DNA < 10'000 copie per mL, i quali risultavano HbsAg positivi, HbeAg negativi, negativi per HCV e con livelli di ALT nella norma. Questo gruppo è stato poi confrontato con un altro composto da individui con caratteristiche simili ma negativi per HbsAg. Durante un follow up intermedio di 13 anni si è asodato che il numero annuale di casi per HCC era stato maggiore in quel gruppo di pazienti HbsAg positivi rispetto al gruppo di controllo (0,06% contro lo 0,02%). Nonostante la prognosi sia generalmente favorevole, la scomparsa di HbsAg non preclude la comparsa di un quadro cirrotico o di HCC [45.46]. L'aumento del rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare in pazienti con un'infezione da HBV regredita è stata dimostrata in uno studio che ha monitorato 1271 nativi dell'Alaska che sono stati affetti da un'infezione cronica da HBV per almeno 20 anni. Fra i pazienti liberi dal virus HBV (diventati quindi HbsAg negativi) il tasso di incidenza di HCC si è rivelato inferiore a quello di coloro che sono rimasti comunque positivi per HbsAg (37 individui anziché 196 su 100'000 per anno), ma comunque superiore rispetto alla popolazione generale [47]. Un'inchiesta a sé stante ha suggerito che la possibilità di ammalarsi di HCC è superiore in coloro che sono risultati negativi per HbsAg superati i 50 anni di età [48].

Effetti della terapia per HBV – Diversi reportage hanno valutato l'impatto della terapia per

HBV sul rischio di sviluppare HCC. La consultazione dei dati mette in evidenza che il rischio relativo viene ridotto di circa il 50-60% dopo i trattamenti effettuati con interferone o analoghi nucleosidici [49-51]. Nonostante tutto però il rischio non viene completamente eliminato e non è stato notato alcun beneficio in quei pazienti che hanno sviluppato resistenza agli analoghi nucleosidici.

Sesso – Gli uomini positivi per HbsAg sembrano essere esposti ad un rischio maggiore di HCC rispetto alle donne [37.53]. In uno studio di coorte che ha esaminato 23'820 abitanti di Taiwan, di età compresa fra i 30 e i 65 anni, è stato messo in evidenza che durante la loro vita l'incidenza di sviluppo HCC, in quei pazienti HbsAg positivi, era maggiore negli uomini rispetto che nelle donne (27% contro 8%) [53]. Fra i pazienti infetti sia da HBV che da HCV il rischio si è dimostrato più alto ma non sono state riscontrate differenze per quanto riguarda una probabilità maggiore di sviluppare carcinoma epatocellulare basandosi unicamente sul sesso del paziente. Come ampiamente dimostrato in altri studi è chiaro che una carica virale maggiore è correlata ad un incremento del rischio rispetto al HCC.

Genotipo di HBV – La prevalenza di specifici genotipi varia in base alla localizzazione geografica. Il genotipo di HBV è molto importante nella valutazione del rischio relazionato ad HCC [54-56]. Il genotipo A è diffuso principalmente in Nord Europa, Nord America, India e Africa mentre i genotipi B e C sono i più diffusi in Asia e il genotipo D è quello prevalente in Europa Meridionale, Medio Oriente e India. I pazienti affetti da HBV di genotipo C corrono un rischio di HCC maggiore rispetto a coloro affetti dal genotipo B mentre gli individui che hanno contratto il genotipo D sono esposti ad un rischio maggiore rispetto a chi è affetto da HBV di genotipo A [57-59].

Coinfezione con HCV o HDV – E' stata associata ad un maggiore rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare anche una eventuale coinfezione da HCV. Alcune statistiche riportano che i pazienti con una doppia infezione da HBV e HCV vanno incontro ad una probabilità più elevata di ammalarsi di HCC rispetto agli individui che presentano solo una delle due infezioni, in particolare quelli che risultano positivi agli anti-HCV e ad HbsAg [41.60.61]. Anche una coinfezione da HDV parrebbe aumentare il tasso di rischio per lo sviluppo di un carcinoma epatocellulare nei pazienti già affetti da HBV. Uno studio, che ha coinvolto 200 individui con un quadro di cirrosi compensata correlata ad HBV, di cui il 20% è risultato positivo per gli anti-HDV, ha rivelato che una concomitante infezione da HDV aumenta di tre volte il rischio di ammalarsi di HCC e porta il tasso di mortalità a circa il doppio [62]. Dopo aver riportato a valori simili ogni differenza clinica e sierologica presente alla base, il rischio di sviluppare HCC in 5 anni è stato stimato del 13% per i pazienti positivi per gli anti-HDV e negativi per HbeAg, del 4% per gli individui negativi sia per gli anti-HDV che per HbeAg e del 2% per i soggetti negativi per gli anti-HDV e positivi per HbeAg. In uno studio effettuato sulla popolazione della Svezia il rischio di HCC si è dimostrato maggiore nei pazienti coinfezati da HDV e HBV rispetto ai soggetti infettati solamente da HBV [63]. Fra coloro con un'infezione acuta da HDV il tasso di incidenza standardizzato(SIR) è stato di 6,1 (95% CI 2,8-11,7). Fra i pazienti con un'infezione da HDV cronica il SIR è stato di 3,9 (95% CI 1,6-7,2).

Altri fattori associati al carcinoma epatico in pazienti con HBV – Altri fattori di rischio associati con HCC includono l'età avanzata del paziente, il consumo abituale di alcolici, il fumo di sigaretta, alti livelli sierici di ALT, la presenza di mutazioni genetiche, una coinfezione da HCV ed, eventualmente, familiarità per questo tipo di carcinoma [34.35.37.39.41.45.46.64-67]. Inoltre uno studio effettuato in Cina ha messo in evidenza che

rispetto agli uomini con gruppo sanguigno uguale a 0, quelli appartenenti al gruppo sanguigno A e B possono essere esposti ad un aumentato rischio per HCC, mentre le donne di gruppo sanguigno AB o B potrebbero andare incontro ad un rischio di insorgenza minore [68]. Alcune popolazioni possono andare incontro ad un decorso benigno di un'infezione cronica da HBV. Per esempio, uno studio mette in evidenza come gli Inuit della Groenlandia cronicamente affetti da HBV corrono un rischio nettamente minore di sviluppare HCC, nonostante in generale chi è portatore di un'infezione cronica abbia un tasso di rischio 9 volte superiore rispetto a chi è negativo per HBV [69]. Fra le varie motivazioni riportate per spiegare questo fenomeno vengono chiamate in cause differenze importanti sulla distribuzione del genotipo, il diverso periodo della vita in cui si è contratta l'infezione (adolescenza/età adulta paragonate alle infezioni perinatali), una giovane età e le influenze genetiche sulla risposta immunitaria nei confronti di un'infezione da virus dell'epatite B.

Predire il rischio di HCC in pazienti con HBV – Sono stati messi a punto e validati due grafici che identificano i pazienti affetti da HBV ad aumentato rischio di carcinoma epatocellulare.

Epatite C – Nonostante sia stata riscontrata una stretta associazione fra infezione da HBV e HCC, i meccanismi della carcinogenesi rimangono poco chiari [70-72]. I malati di HCV corrispondono a circa un terzo dei casi di affetti da HCC negli USA [17]. Un'altra importante osservazione riguarda il fatto che l'HCC si sviluppa in quei pazienti con HBV che presentano quadri avanzati di fibrosi epatica o cirrosi [73]. Tuttavia si possono riscontrare solamente dei leggeri quadri di fibrosi in quel 10% dei pazienti affetti da HCV che si sottopongono a resezione per carcinoma epatico [74]. In uno studio di coorte prospettico che ha preso in analisi 23'820 individui taiwanesi di età inclusa fra i 30 e i 65 anni, si è osservato che l'incidenza cumulativa durante l'arco della vita di quelle persone affette unicamente da HCV

era del 24% per gli uomini e del 17% per le donne [53]. Quegli individui che invece sono risultati positivi anche ad HbsAg hanno avuto un'incidenza cumulativa del 38% e del 27% rispettivamente riferiti al sesso maschile e femminile. Fra i pazienti con infezione da HCV non è stata riscontrata nessuna differenza significativa legata al sesso degli individui per quanto riguarda il tasso di sviluppo di HCC. Inoltre, ancora una volta, si è potuto associare ad un valore più elevato della carica virale un più elevato rischio di andare incontro ad HCC. E' anche stata associata ad un maggiore rischio di sviluppare HCC un'alterazione del profilo di espressione del gene 186 fra quei pazienti con HCV e un quadro di cirrosi Child-Pugh di classe A [75]. Generalmente si ritiene che l'HCC scaturisca da un contesto di rapido turnover cellulare e da uno stato infiammatorio cronico indotto da HCV. Una delle possibili teorie è che vi sia uno squilibrio nei microambienti cellulari e nelle citochine di quei fegati infettati da HCV con un conseguente aumento dello stato infiammatorio e del turnover cellulare che in ultima analisi causa un quadro cirrotico. Probabilmente si assiste ad una proliferazione di epatociti poco differenziati i quali degenerano in noduli displastici e in un epatocarcinoma cellulare. A sostegno di questa ipotesi si può osservare che l'HCC indotto da un'infezione da HCV è strettamente correlato dal grado di infiammazione e di necrosi e sembra quindi causato da un quadro infiammatorio piuttosto che dall'attivazione di specifici oncogeni [77.78]. Al contrario, l'HCC connesso ad HBV sembra non essere correlato con uno stato infiammatorio e si suppone invece che vi siano specifici oncogeni attivati dal virus che si traducono in un aumento del rischio di carcinoma epatocellulare. Una volta fatta diagnosi di HCC il grado di infiammazione del fegato dei pazienti affetti da HCV è strettamente correlato con la prognosi. A questo proposito sono stati esaminati nel tessuto epatico sano di pazienti affetti da HCV con HCC diversi marker di stress ossidativo e infiammazione fra cui CD68+, 8-OHdG e HNE. E' stato riscontrato che pazienti con livelli più alti di questi markers andavano incontro ad una prognosi peggiore [79]. La risposta immunitaria può essere considerata come un'importante

fattore associato ad un rischio di progressione verso un quadro cirrotico ed oncologico [80].

Sono implicati anche altri diversi fattori:

-I modelli animali hanno dimostrato che un aumento dei depositi di ferro epatico in pazienti con un'infezione cronica da HCV determina un incremento delle specie reattive dell'ossigeno portando ad un maggiore stato di infiammazione e turnover cellulare [81].

-Un'analisi ha riscontrato un'associazione con HCV di genotipo 1b ma i dati dei singoli studi sono confusi [82-86] e questa associazione non è stata confermata.

-E' stato dimostrato un rapporto fra l'aumento del rischio di HCC e l'abuso di alcolici, al diabete mellito e all'obesità.

-Da un report di un trial denominato HALT-C (uno studio prospettico designato per valutare l'impatto a lungo termine di una bassa dose di peginterferone in pazienti con una fibrosi epatica avanzata) si è dedotto che l'epatocarcinoma cellulare è anche associato ad un'età avanzata, all'appartenenza alla razza nera, a una bassa conta piastrinica, a valori aumentati della fosfatasi alcalina, alla presenza di varici esofagee e al fumo di sigaretta. Nonostante sia più comune nei pazienti con cirrosi epatica, l'epatocarcinoma è riscontrabile anche in pazienti con fibrosi a ponte.

-Un'infezione latente da HBV e l'esposizione al virus sembra aumentare il tasso di rischio per HCC in pazienti già affetti da HCV e focolai di cirrosi [87]. Queste condizioni non sembrano comunque essere un importante fattore di rischio per HCC fra gli individui con HCV negli USA [88].

Una trattamento terapeutico per HBV con esito positivo è stato associato ad un decremento del rischio di sviluppare HCC (nonostante non sia pari a zero) [89.90]. Da una differente analisi si è capito che i pazienti che hanno avuto una risposta immunitaria virologica prolungata vanno incontro ad un rischio minore di sviluppare HCC rispetto a coloro che non hanno avuto la stessa risposta e sono stati trattati (rischio relativo di 0,24, 95% CI 0,18-0,31).

Si ipotizza che gran parte del rischio residuo derivi dalla presenza o meno di una cirrosi epatica alla base.

È stato sviluppato un grafico basato su parametri come età, storia di alcolismo, conta piastrinica, livello di GGT e la presenza o meno di una prolungata risposta virologica, utile per prevedere la comparsa di HCC a distanza di 1, 3 e 5 anni in pazienti con cirrosi HCV-correlata.

Epatite cronica e cirrosi – I pazienti affetti da malattie croniche del fegato di qualsiasi natura (come cirrosi o epatite cronica), hanno un aumentato rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare. D'altra parte molti pazienti (dal 20% al 56%) con HCC hanno una diagnosi pregressa di cirrosi epatica [92.93]. Questo è di importanza fondamentale sia per un eventuale piano terapeutico, sia per un intervento di resezione chirurgica atto al debellamento di HCC. I pazienti con una cirrosi epatica compensata vanno incontro ad un'incidenza annuale di HCC dall'1 all'8% (a seconda dell'eziologia di tale cirrosi) mentre quelli affetti da epatite cronica hanno un tasso di rischio annuale di circa 1 caso ogni 100. A loro volta gli individui con alti livelli sierici di alfa-fetoproteina corrono un rischio maggiore rispetto a chi ne ha in concentrazioni normali (<20mcg/L) [21.22]. I pazienti con epatite cronica o cirrosi che hanno l'epatite B, l'epatite C o l'emocromatosi ereditaria (HH) hanno il più alto rischio di sviluppare HCC. Tra i pazienti con HH, l'HCC è praticamente limitato a coloro che presentano quadri cirrotici [94-96]. Ad esempio, uno studio che ha seguito 152 pazienti con HH in un lasso di tempo da 1 a 229 mesi è stato registrato che dei 97 con cirrosi epatica ben 28 hanno sviluppato HCC. Dei 55 pazienti senza cirrosi nessuno si è ammalato. Il rischio per HCC era ancora aumentato in quegli individui con un'età superiore ai 55 anni, in quelli positivi per HBsAg e in coloro che avevano una storia di alcolismo.

Una correlazione simile alla cirrosi è stata riscontrata in pazienti con colangite biliare primaria.

Tossine ambientali – Sono almeno due le tossine ambientali che possono contribuire allo sviluppo di un carcinoma epatocellulare: l'aflatossina e l'acqua potabile inquinata. Comunque la loro incidenza nel determinare HCC in tutto il mondo è veramente minima. È da sottolineare inoltre che da sole non costituiscono un fattore di rischio indipendente. Probabilmente coadiuvano lo sviluppo di HCC in pazienti che presentano già altri fattori di rischio alla base.

Aflatossine – L'aflatossina è una micotossina che contamina comunemente mais, soia e arachidi. Un alto consumo di aflatossine all'interno della propria dieta è stato associato con HCC. Ad esempio negli isolotti di Penghu in Taiwan vi è un tasso di incidenza estremamente alto di HCC che non è interamente dovuto alla presenza di portatori di HBV. In uno studio condotto fra 20 pazienti di questa regione con HCC è stata riscontrata un'alta probabilità di presenza di composti di aflatossina B1 e albumina. Il 94% di questi pazienti era portatore di HBsAg [97]. In un altro studio condotto a Shanghai la possibilità di sviluppare HCC fra gli individui con HBV esposti alle aflatossine si è rivelata essere 59,4 volte maggiore [98.99]. In pazienti con HCC cronicamente esposti alle aflatossine sono state individuate mutazioni a carico del gene oncosoppressore p53 [100.101]. Mutazioni simili sono state registrate su animali da laboratorio esposti ad HBV e aflatossine [102]. L'effetto coadiuvante di questi fattori di rischio è stato dimostrato anche in topi transgenici positivi per HBsAg. Alcuni di questi topi sono stati allevati senza uno degli alleli di p53 e/o sono stati esposti ad aflatossine [103]. Dopo 13 mesi ciascuno dei 7 topi con tutti e tre i fattori di rischio mostravano un alto grado di sviluppo di HCC rispetto ai topi con entrambi gli alleli di p53 esposti ad aflatossine (62%) e rispetto ai topi privi di un allele di p53 ma non esposti all'aflatossina (25%).

Acqua potabile contaminata – Diversi studi condotti nella campagna cinese hanno denotato un tasso di mortalità più elevato a causa di HCC fra le persone che bevono acqua stagnante rispetto a coloro che si abbeverano con acqua di pozzo (100 decessi vs < 20 decessi ogni

100'000 abitanti ogni anno) [104]. La tossina blu-verde delle alghe chiamata microcistina contamina generalmente queste pozze e si crede possa essere un forte promotore di HCC [105].

Masticazione di noci di betel – Alcuni studi hanno suggerito che la masticazione di noci di betel (pratica diffusa in alcune regioni dell'Asia) possa costituire un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di cirrosi e HCC [106-108]. Si pensa anche ad un coinvolgimento nello sviluppo del carcinoma esofageo e nel carcinoma a cellule squamose della testa e del collo.

Tabacco e abuso di alcol – In qualche studio è stato dimostrato che il fumo di sigaretta costituisce un fattore di rischio per HCC [109-111]. Anche l'assunzione di alcol è stata correlata ad HCC anche se non è ben chiaro in quali dosi e per quanto tempo. Il rapporto tra etanolo ed HCC potrebbe essere costituito da un effetto tossico diretto o indiretto in quanto rappresenta sia un importante fattore di rischio per la cirrosi sia un fattore predisponente per HCC [22]. L'abuso di alcol, il diabete mellito e l'obesità sono stati individuati come promotori di carcinoma epatocellulare. Il rischio di HCC alcol-indotto può essere alterato dalla presenza o meno di un'epatite virale alla base. In uno studio italiano che comprendeva 464 soggetti con HCC e 824 individui di controllo è stato riscontrato un aumento lineare della probabilità di sviluppare HCC in corrispondenza ad un consumo alcolico giornaliero di oltre 60g. Questo rapporto si duplica in pazienti infettati da HBV o HCV[115].

Diabete mellito – Studi epidemiologici suggeriscono un possibile legame fra diabete mellito e HCC [124-132]. Uno studio ha stimato che il rischio è aumentato di circa 2,2 volte. Inoltre è stato dimostrato che la presenza di una sindrome metabolica (definita dalla presenza dei tre parametri seguenti: obesità, dislipidemia, ipertensione e alterata glicemia a digiuno) sia un fattore di rischio per HCC [136]. Uno studio che ha incluso 19'349 pazienti con diagnosi di diabete e 77'396 pazienti non diabetici ha messo in evidenza che l'incidenza di HCC è

significativamente più alta fra i pazienti diabetici rispetto a quelli che non lo sono (21 casi contro 10,4 ogni 10'000 persone in un anno) [127]. Terapie a base di metformina e tiazolidinedione sono associate ad un ridotto rischio di HCC in pazienti con diabete. Tuttavia le associazioni tra diabete e HCC devono essere interpretate con cautela. In alcuni casi un quadro di intolleranza al glucosio può scaturire da un quadro cirrotico quindi il “diabete” in questo contesto potrebbe essere un surrogato della cirrosi la quale aumenta il rischio di HCC. Inoltre molti pazienti con diabete hanno anche una steatosi epatica non alcolica (NAFLD) associata anch'essa ad un aumentato rischio di HCC. Alcuni studi hanno valutato l'interferenza fra l'utilizzo di farmaci antidiabetici e il rischio di HCC [137]. Un'analisi ha rilevato che con l'uso di metformina si assiste ad una riduzione del tasso di incidenza per HCC. Non è stata riscontrata interferenza dovuta all'utilizzo di tiazolidinedione mentre solfonilurea e insulina sono associate ad un aumentato rischio di HCC. Tuttavia questi risultati devono essere valutati con cautela a causa della notevole eterogeneità dei dati.

Steatosi epatica non alcolica – E' sempre più evidente che la NAFLD rappresenta una malattia epatica di base molto frequente nei pazienti con HCC [138-142]. E' probabile che la NAFLD provochi l'HCC attraverso la cirrosi anche se la patogenesi non è ancora stata determinata ed è stato trovato che talvolta l'HCC può verificarsi in pazienti con NAFLD che non hanno cirrosi [142]. Un ulteriore studio ha dimostrato che l'HCC in NASH è associata ad obesità, diabete, ipertensione arteriosa e al sesso maschile[141].

Obesità – Un certo numero di studi ha portato in evidenza che una quantità eccessiva di grasso corporeo determini un rischio più elevato di sviluppare HCC [119.121.132.136.143-145]. Un gruppo di lavoro dell'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIRC) ha stimato che il rischio relativo di HCC è maggiore negli individui con un alto BMI rispetto a quelli con un BMI normale [143].

Deficit di Alfa-1 antitripsina – Il deficit di questa sostanza è associato ad un aumentato rischio

di carcinoma epatocellulare anche in pazienti senza cirrosi.

Porfiria acuta intermittente – Alcuni studi suggeriscono che ci possa essere un aumento del rischio di HCC nei pazienti con AIP, comprendendo quelli senza segni clinici evidenti di cirrosi [146]. I tassi di HCC in pazienti con AIP variano dallo 0% al 27% [146-155].

Calcoli biliari e colecistectomia – E' stato riscontrato un aumento del rischio di tumore epatico primario (compreso l'HCC) in uno studio con oltre 4'000'000 di soggetti [156]. E' stato rilevato che il rischio di sviluppare cancro al fegato è di 2,5 fra i pazienti con calcoli biliari e di 1,6 fra i pazienti che hanno subito una colecistectomia.

Polimorfismi di EGF ed espressione del recettore – Alcuni polimorfismi del gene dell'EGF sono stati associati ad un aumentato rischio di carcinoma epatico in pazienti con cirrosi [157-158]. Inoltre il recettore per l'EGF può essere un cofattore per l'ingresso di HCV nelle cellule [159]. In alcuni modelli animali la sovraespressione dell'EGF è stata associata ad HCC. Nel già citato studio denominato HALT-C sono stati individuati come fattori indipendenti, contribuenti ad un maggiore rischio per HCC, il sesso, l'età, il tabagismo, livelli di fosfatasi alcalina, la conta piastrinica e i polimorfismi di EGF . Inoltre questi fattori possono essere utilizzati per suddividere i pazienti affetti da HCV in categorie a basso, intermedio e alto rischio di sviluppare HCC [158].

Fattori che riguardano la dieta – Alcuni studi hanno messo in evidenza che il consumo di carne rossa e di grassi saturi determinano un più elevato rischio di ammalarsi di HCC (rischio relativo di 1,1 per gli individui con un consumo di carne rossa più elevato rispetto a quelli con una più bassa assunzione) [160-162].

Fattori protettivi

Trattamento con statine. Diversi studi hanno dimostrato che l'uso di statine è associato ad un minor rischio di HCC [163-165]. Coloro che hanno preso le statine hanno avuto una

diminuzione del 37% della probabilità di sviluppare HCC [166]. Questo risultato è stato più evidente negli uomini dell'asia orientale affetti da epatite B cronica, i quali vanno incontro ad un alto rischio per lo sviluppo di HCC. Tuttavia non è ancora chiaro se questa associazione sia valida o meno [167].

Fattori dietetici– Uno studio basato sulla popolazione ha portato alla luce che il consumo di carne bianca può essere associato ad un rischio ridotto [160.162], così come il consumo di pesce, acidi grassi omega-3 e verdura [162.168-172]. Lo stesso risultato è stato riferito in quei pazienti con o senza una storia familiare di carcinoma epatico grazie ad una maggiore assunzione di vitamina E [173]. Altri studi hanno evidenziato come il consumo di caffè possa essere un fattore protettivo per il cancro al fegato, tra cui HCC. Il consumo di due o più tazze al giorno è stato associato a una riduzione del rischio del 43% in individui con e senza patologie epatiche [174]. Probabilmente l'effetto protettivo è da attribuire alla grande quantità di antiossidanti in esso contenuta. E' stato inoltre dimostrato che la caffeina è capace di abbassare i livelli di aminotransferasi e di ridurre il rischio di cirrosi epatica [175.176].

Tuttavia, in alcune nazioni in via di sviluppo l'incidenza del cancro è in rapido aumento in conseguenza dell'adozione di uno stile di vita "occidentale" da parte della classe media e in seguito all'impiego massiccio di contaminanti ambientali in agricoltura come pesticidi clorurati, conservanti ed additivi alimentari (6).

Nei decenni scorsi vari studi in vivo e in vitro (Garcea et al., 1987; Pascale et al., 1990; Simile et al., 2001) hanno suggerito che il deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) possa essere protettivo nei confronti dell'insorgenza di HCC a causa dell'inibizione della via dei pentosiofosfati (PPP) che le cellule tumorali utilizzano preferenzialmente al posto della glicolisi aerobica (Ming-Jing Xua, 2015).

In questo studio abbiamo testato l'ipotesi che la G6PD carenza possa essere inversamente

associate all'HCC in una casistica di pazienti di origine sarda con epatopatia.

PAZIENTI E METODI

Il disegno dello studio era di tipo retrospettivo. I dati sono stati ricavati da un database digitalizzato di pazienti afferenti all'unità di Gastroenterologia dell'Università di Sassari nel periodo compreso tra il gennaio 2002 e il gennaio 2017. I pazienti erano in lista per essere sottoposti ad esame endoscopico per qualunque causa (sintomi da reflusso e/o dispepsia, programmi di sorveglianza e follow-up, screening per varici esofagee) inviati dai medici di Medicina Generale o dagli specialisti distribuiti nell'area di riferimento. Prima dell'esame endoscopico in ciascun paziente è stata raccolta una anamnesi particolareggiata da parte di un esperto gastroenterologo, che comprendeva informazioni riguardanti malattie del fegato attuali o pregresse, presenza di epatocarcinoma (HCC) e di diabete mellito di tipo 1 e 2. Il database ha fornito inoltre informazioni riguardanti le variabili demografiche (età, sesso), indice di massa corporea (BMI), luogo di residenza, abitudine tabagica, attività lavorativa. Nel caso di più esami per lo stesso paziente nel determinato intervallo di periodo di tempo per l'analisi, è stato considerato solo l'esame più recente. Per evitare errori di selezione, nel caso di gastroscopie multiple eseguite sullo stesso paziente, è stata inclusa nell'analisi solo la prima di esse in cui compariva nella storia clinica una diagnosi di tumore.

Considerazioni Etiche: Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale: *Comitato di Bioetica, Azienda Ospedaliero Universitaria di Sassari, Italia* (Prot N° 2099/CE, 2014). Dal momento che solo sono state utilizzate solo cartelle cliniche preesistenti tutti i dati dei pazienti sono stati de-identificati prima dell'analisi, per cui la raccolta del consenso informato da parte dei partecipanti è stata considerata superflua.

Caratterizzazione dell'epatopatia: La diagnosi, la stadiazione e l'accertamento dell'eziologia dell'epatopatia sono stati ottenuti attraverso una combinazione di marcatori clinici, biochimici e virologici, imaging e parametri istopatologici. I pazienti con cirrosi ma senza ascite, ittero, encefalopatia o anamnesi di sanguinamento delle varici sono stati classificati come "cirrotici compensati". La presenza di HCC è stata determinata attraverso studi dinamici di imaging contrast-enhanced e/o caratteristiche istopatologiche in campioni di tessuto ottenuti mediante agobiopsia.

Carenza di G6PD: L'attività enzimatica è stata misurata negli eritrociti isolati da sangue periferico mediante test biochimico quantitativo basato sulla determinazione del rapporto tra G6PD / 6GPD negli eritrociti seguendo le indicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (Mosca et al, 1996, Dore et al.). Secondo le indicazioni della ditta che ha fornito il kit (G6PD, Nurex Diagnostici s.r.l. Sassari, ITALY) i pazienti sono stati classificati come normali se il rapporto era maggiore di 0,85, carenti parziali se tale rapporto era compreso tra 0,10 e 0,85, e carenti totali quando il rapporto era inferiore al 10%. Nei pazienti che risultavano G6PD carenti al test enzimatico non è stata effettuata alcuna tipizzazione genotipica.

Analisi Statistica dei dati: l'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS (versione 16.0, Chicago, IL, USA) con una soglia di significatività statistica fissata ai valori di p inferiori a 0,05. Eventuali differenze tra i sottogruppi per quanto riguarda la distribuzione delle variabili categoriche sono state analizzate con il test del χ^2 oppure col test esatto di Fisher. Per determinare l'associazione statistica tra HCC e carenza di G6PD sono stati utilizzati vari modelli di regressione logistica univariata e multivariata, utilizzando quale variabile dipendente dicotomica la presenza o l'assenza di HCC. L'età dei pazienti con epatopatia cronica è stata ricodificata in una variabile binaria, considerando la soglia di età di

64 anni. Sono stati raggruppati insieme il diabete di tipo 1 e 2 in quanto entrambi fattori di rischio per carcinoma epatocellulare, indipendentemente dalla loro iniziale eziologia. Allo scopo di massimizzare il potenziale effetto della carenza di G6PD sull'insorgenza di HCC, solo i pazienti con deficit enzimatico totale sono stati inclusi nell'analisi. Infatti, per definizione, il deficit parziale comprende i soggetti nei quali il rapporto varia tra 0,10 e 0,85, per cui coloro che sono vicini al limite superiore dell'intervallo risultano assai simili a coloro che presentano un'attività della G6PD normale. Nell'analisi di regressione logistica, sono stati calcolati gli odds ratio (OR) grezzi e corretti e i loro intervalli di confidenza al 95% (CI). Dato che la G6PD presenta una distribuzione dipendente dal sesso, è stata testata l'eventuale interazione includendo nel modello di regressione anche il termine "G6PD × sesso". All'inizio le covariate sono state inserite tutte insieme (modello pieno), per essere successivamente sottoposte ad eliminazione progressiva con la procedura "stepwise backward" se risultavano statisticamente non significative. Le covariate incluse nel modello comprendevano età, sesso, stato della G6PD, diabete mellito, HCV, HBV, consumo di alcool e stato civile. Per ogni covariata sono stati calcolati i coefficienti di regressione e il loro errore standard; gli odds ratio e i loro intervalli di confidenza al 95% sono stati ricavati con la formula di Wald ($95\% \text{ CI} = \text{OR}^{1 \pm B / \text{SE}}$). Il coefficiente R^2 aggiustato è stato utilizzato per valutare l'efficienza dei modelli statistici.

RISULTATI

Tutti i pazienti erano di razza Caucasica e provenivano dal Nord Sardegna. Sono state passate in rassegna in totale 11.143 cartelle cliniche 6.888 delle quali di pazienti di sesso femminile (61,8%). L'età media era di $54,7 \pm 17,0$ anni negli uomini e di $52,2 \pm 17,6$ anni nelle donne. Per questo studio sono stati selezionati 1301 casi di pazienti con epatopatia (Figura 1, Tabella 1). Nella casistica totale la percentuale di pazienti con normale attività G6PD risultava essere del 88,5% (9863 / 11.143), mentre il deficit di G6PD era presente nel 11,5% dei pazienti (figura 1). Questi valori riflettono la distribuzione del difetto enzimatico nella popolazione generale della Sardegna settentrionale [Fiorelli, De Vita]. Nel sottogruppo degli epatopatici la proporzione dei soggetti con normale attività G6PD era del 88,5% (1151/1301), e quella dei soggetti con G6PD carente era dell'11,5% (150/1301). La Figura 1 riporta la prevalenza della carenza di G6PD nei pazienti con epatite e cirrosi. La proporzione di pazienti con carcinoma epatocellulare nella casistica studiata era dell'8,8% (114/1301) ed era più elevata nei pazienti con cirrosi e G6PD normale (99/421) rispetto ai pazienti con cirrosi e deficit di G6PD (6/54) (11,1% contro il 23,9%; OR: 0.41 95% CI 0,17–0,98 $p = 0,038$) (Figura 1). In base all'analisi univariata il rischio di HCC era superiore nei pazienti di sesso maschile e in quelli di età superiore a 64 anni (Tabella 1), ed era praticamente assente prima dei 30 anni, per crescere sensibilmente nei decenni successivi fino a raggiungere un picco nel decennio 70–79 (Figura 2). Nella nostra casistica il rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare nei pazienti senza epatopatia era pari a zero ($p < 0,0001$). E' interessante notare come nei pazienti con epatite e/o cirrosi, la carenza di G6PD mostrava un'associazione inversa con il carcinoma epatocellulare, con un odds ratio pari a 0.49 (95% CI 0,22-1,08) rispetto ai pazienti con normale attività G6PD (Tabella 1). Il diabete di tipo 1 (29,6%, OR 5,56, 95% CI 2,36-13,1) e di tipo 2 (20,2%, OR 3,33, 95% CI 2,03-5,46) sono risultati essere fattori di rischio indipendente di HCC (Tabella 1).

Figura 1. Frequenza di epatopatia ed epatocarcinoma in 11.143 pazienti suddivisi in base all'attività della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD).

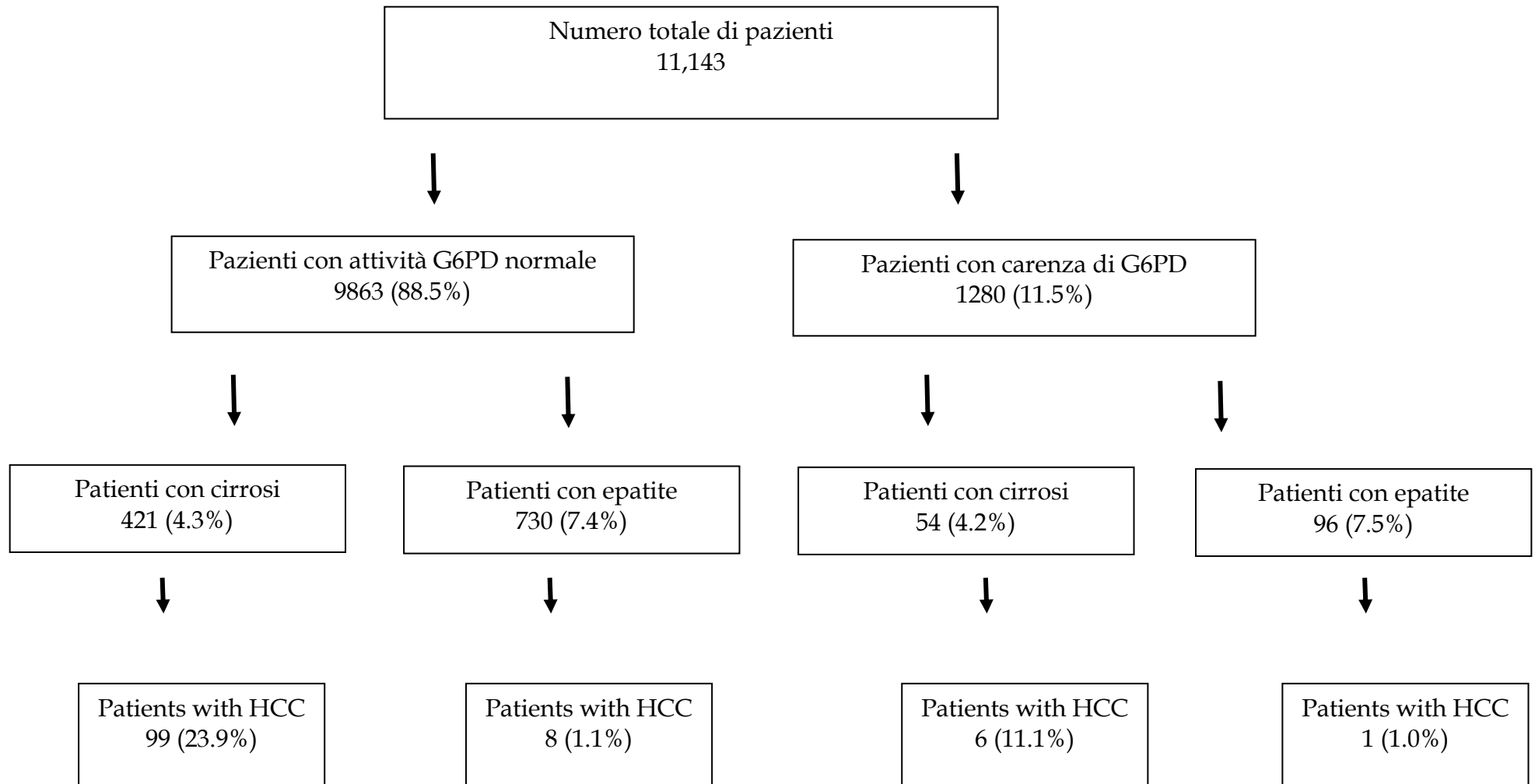


Tabella 1. Attività della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e rischio di carcinoma epatocellulare (HCC) in 1301 pazienti con epatopatia cronica.

Pazienti	Epatopatia	HCC	OR ¹ (95% CI ²)	Significatività
<i>Età</i>				
< 64	632	37 (5.9%) [#]	1.00	<0.0001*
≥ 64	669	77 (11.5%)	2.09 (1.39–3.15)	
<i>Sesso</i>				
Women	597	35 (5.9%)	1.00	0.001
Men	704	79 (10.9%)	2.03 (1.34–3.07)	
<i>G6PD</i>				
Normal	1151	107 (9.3%)	1.00	0.033
Deficient	150	7 (4.7%)	0.37 (0.15–0.92)	
<i>Diabete mellito</i>				
No	1150	81 (7.0%)	1.00	<0.0001
Type 1	27	8 (29.6%)	5.56 (2.37–13.1)	
Type 2	124	25 (20.2%)	3.33 (2.03–5.46)	
<i>Epatopatia</i>				
Hepatitis	826	9 (1.1%)	1.00	<0.0001
Cirrhosis	475	105 (22.1%)	25.7 (12.9–51.4)	
<i>Stato civile³</i>				
Celibe/Nubile	267	17 (6.4%)	1.00	0.084 0.506 0.956
Coniugato/a	819	81 (9.9%)	1.61 (0.93–2.78)	
Vedovo/a	148	12 (8.1%)	1.30 (0.60–2.80)	
Divorziato/a	61	4 (6.6%)	1.03 (0.33–3.18)	

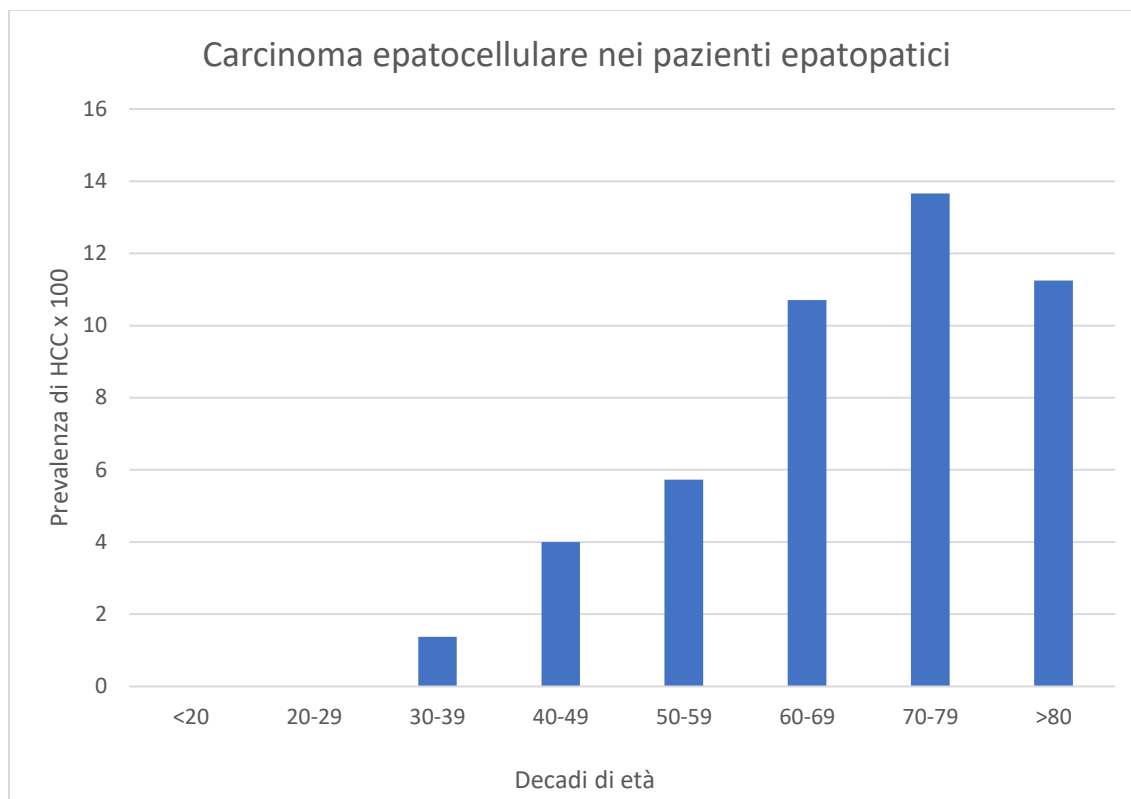
1: Odd Ratio,

2: Intervallo di confidenza,

3: Sconosciuto in 6 pazienti,

*I valori in grassetto sono statisticamente significativi

Figura 2. Distribuzione di frequenza del carcinoma epatocellulare in 1301 pazienti epatopatici suddivisi in base a classi di età decennali.



Per quanto riguarda lo stato civile, i pazienti sposati presentavano un sensibile aumento del rischio (OR = 1.61), anche se non in modo statisticamente significativo ($p = 0,084$) (Tabella 1). Ulteriori fattori di rischio per carcinoma epatocellulare in entrambi i sessi erano i virus dell'epatite C e B. Centonove pazienti all'anamnesi risultavano essere stati forti bevitori di sostanze alcoliche e tra essi, 97 presentavano una concomitante cirrosi. Tra essi, 14 pazienti di sesso maschile avevano sviluppato un epatocarcinoma (Figura 3). L'abuso di alcolici era poco frequente nelle donne (6 pazienti su 597), in linea con le caratteristiche della dieta mediterranea e le tradizionali abitudini alimentari delle donne sarde, e nessun caso di HCC è stato rilevato in questo gruppo (Figura 3).

I risultati dell'analisi di regressione logistica multivariata nei pazienti con epatopatia sono

riportati nella Tabella 2. Dopo correzione statistica per età, sesso, gravità della malattia epatica, principali fattori di rischio, diabete e stato civile, il rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare risultava essere inferiore del 63% nei pazienti con carenza di G6PD rispetto ai pazienti con normale attività enzimatica (OR = 0,337, 95% CI 0,128–0,887). Nel modello statistico successivo, nel quale è stata utilizzata la procedura inversa di eliminazione delle variabili, le covariate “alcool” e “stato civile” sono state eliminate automaticamente in quanto statisticamente non significative, e la carenza di G6PD si associava ad un odds ratio di 0.379, pari ad una riduzione del rischio del 62%. In questo modello il termine di interazione “G6PD × sesso” è stato eliminato anch’esso in quanto non significativo. Considerando che la cirrosi, come è facile intuire, è il più potente fattore di rischio per HCC (OR = 23.3), al fine di evitare un possibile effetto di interazione sulla carenza di G6PD, nel terzo modello è stata rimossa la sola variabile “cirrosi” e tuttavia l'effetto protettivo del deficit di G6PD nei confronti dell'epatocarcinoma rimaneva sostanzialmente invariato (OR: 0,348, 95% CI 0,133–0,911).

Figure 3. Distribution of hepatocellular carcinoma in male and female with HCV, HBV, and alcoholic hepatitis

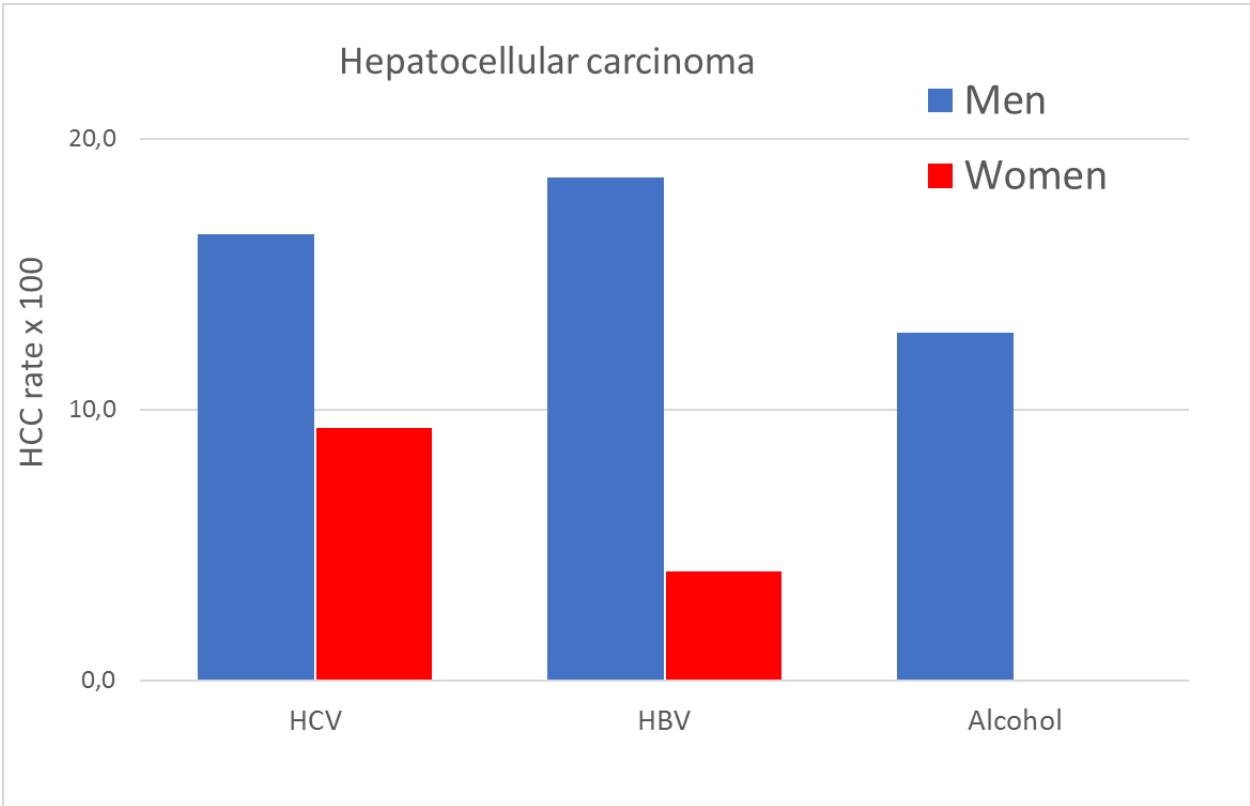


Table 2. Analisi di regressione logistica in 1301 pazienti con epatopatia. La variabile dipendente era la presenza/assenza di carcinoma epatocellulare.

Covariate	Modello 1 [^]			Modello 2 [#]			Modello 3 [†]		
	ORs	95% CI del OR	Significatività	ORs	95% CI del OR	Significatività	ORs	95% CI del OR	Significatività
<i>Età</i>									
<64	1.000	–	–	1.000	–	–	1.000	–	–
≥64	1.788	(1.079 – 2.963)	0.024	1.859	(1.156 – 2.989)	0.010	2.158	(1.400 – 3.325)	<0.0001*
<i>Sesso</i>									
Donne	1.000	–	–	1.000	–	–	1.000	–	–
Uomini	1.872	(1.100 – 3.188)	0.021	1.883	(1.151 – 3.081)	0.012	2.396	(1.531 – 3.750)	<0.0001
<i>Carenza di G6PD</i>									
No	1.000	–	–	1.000	–	–	1.000	–	–
Si	0.130	(0.006 – 2.746)	0.190	0.379	(0.144 – 0.997)	0.049	0.372	(0.146 – 0.948)	0.038
<i>Carenza di G6PD × età</i>	1.614	(0.146 – 17.8)	0.696	–	–	–	–	–	–
<i>Carenza di G6PD × sesso</i>	2.590	(0.233 – 28.8)	0.439	–	–	–	–	–	–
<i>Epatopatia</i>									
Epatite	1.000	–	–	1.000	–	–	–	–	–
Cirrosi	24.30	(11.93 – 49.45)	<0.0001	23.30	(11.48 – 47.25)	<0.0001	–	–	–
<i>Eziologia</i>									
HCV	2.023	(1.149 – 3.564)	0.015	2.312	(1.405 – 3.803)	0.001	2.064	(1.294 – 3.293)	0.002
HBV	3.273	(1.465 – 7.311)	0.004	3.844	(1.808 – 8.170)	<0.0001	2.222	(2.141 – 4.330)	0.019
Alcool	0.675	(0.318 – 1.436)	0.308	–	–	–	–	–	–
<i>Diabete</i>									
No	1.000	–	–	1.000	–	–	1.000	–	–
Si	2.372	(1.424 – 3.951)	0.001	2.396	(1.449 – 3.963)	0.001	3.531	(2.217 – 5.625)	<0.0001
<i>Stato civile³</i>									
Celibe/Nubile	1.000	–	–	–	–	–	–	–	–
Coniugato/a	1.145	(0.618 – 2.119)	0.667	–	–	–	–	–	–
Vedovo/a	0.968	(0.387 – 2.420)	0.944	–	–	–	–	–	–
Divorziato/a	0.697	(0.206 – 2.360)	0.562	–	–	–	–	–	–
Costante	0.003		<0.0001	0.003		<0.0001	0.019		<0.0001

[§]Tutte le variabili insieme(modello pieno); [#]Eliminazione a ritroso; [†]Eliminazione a ritroso escludendo la variabile “epatopatia”

- 1: Odd Ratio,
 - 2: Intervallo di confidenza,
 - 3: Sconosciuto in 6 pazienti,
- *I valori in grassetto sono statisticamente significativi

DISCUSSIONE

I tumori costituiscono un problema di interesse crescente per la società nel suo complesso sia perché determinano una ridotta produttività lavorativa, sia per l'aumento della spesa sanitaria (22), che deve prendere in considerazione soprattutto i costi per la prevenzione e la cura, i ricoveri ospedalieri, la disabilità a lungo termine e la mortalità prematura evitabile. Nella popolazione ultrasessantacinquenne il cancro rappresenta la seconda causa di malattia, preceduta solo dalle malattie cardiovascolari, con ovvie implicazioni socio-economiche (23). Sono state osservate importanti differenze nella distribuzione geografica del rischio di tumore nelle varie aree geografiche del pianeta, e anche in singole aree all'interno dello stessa nazione. Solitamente tali differenze vengono attribuite all'influenza di specifiche condizioni locali quali l'esposizione a cancerogeni ambientali o alimentari.

Il carcinoma epatocellulare è un tumore maligno che insorge come complicanza tardiva in un fegato affetto da epatopatia cronica, nella maggior parte dei casi una cirrosi (El-Serag et al., 2007). Più di 700.000 morti/anno a causa di questo tipo di tumore sono stati riportati a livello internazionale (Ferlay et al., 2015). Il carcinoma epatocellulare è frequente nei paesi in via di sviluppo dell'Asia e dell'Africa, ma è in rapido aumento anche nei paesi occidentali (Moore et al., 2016). La caratteristica più allarmante è che in genere è una condizione asintomatica che può essere facilmente confusa con le manifestazioni dell'epatopatia di base e pertanto ritardare la diagnosi, con ripercussioni negative sia per le potenzialità terapeutiche che la prognosi a lungo termine.

Attualmente è stata proposta l'adozione di rigorosi programmi di sorveglianza dei pazienti con epatopatia cronica, tra cui un frequente monitoraggio con cadenza semestrale e il dosaggio dell'alfa-fetoproteina (AFP) e l'imaging, al fine di evitare una diagnosi tardiva e migliorare la sopravvivenza (El-Serag et al., 2008). Le raccomandazioni generali di sorveglianza si basano sulla valutazione della incidenza prevista di HCC in una popolazione specifica di pazienti con malattia epatica. L'associazione americana delle Malattie del Fegato consiglia il monitoraggio

per HCC nei pazienti con infezione cronica da HBV e cirrosi, negli asiatici, nei portatori africani e caucasici di HBV, nei pazienti con storia familiare di carcinoma epatico, e in tutti i pazienti con cirrosi di qualsivoglia eziologia (xx), anche se alcuni autori suggeriscono che la sorveglianza debba essere limitata ai pazienti con HCV e cirrosi, emocromatosi genetica e cirrosi biliare primitiva in fase 4 (Atkins). Le procedure di sorveglianza potrebbero essere migliorate se il rischio di HCC fosse prevedibile con sufficiente precisione nei pazienti singoli. Tuttavia, poiché il rischio di carcinoma epatico aumenta con l'età e con l'avanzare della malattia epatica, i programmi di sorveglianza personalizzati sono difficili da attuare.

A tale proposito, una migliore conoscenza dei fattori di rischio, tra cui la carenza di G6PD consentirebbe di formulare protocolli di sorveglianza meno stringenti e strategie di trattamento più conservative nei pazienti che vivono nel bacino del Mediterraneo dove la carenza enzimatica è frequente.

L'ipotesi di un effetto protettivo della carenza di G6PD nei confronti dell'insorgenza del cancro primitivo del fegato è stata oggetto in passato di numerose indagini epidemiologiche. La popolazione sarda costituisce lo scenario ideale per sottoporre a verifica questa ipotesi poiché presenta una delle frequenze più elevate di deficit di G6PD al mondo (Refs + Fiorelli et al, 1990).

In particolare, uno studio precedente che ha indagato il rischio di neoplasie in un'ampia casistica di soggetti sardi con deficit di G6PD ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa del rapporto standardizzato di mortalità per cirrosi epatica (0,12 rispetto al valore di riferimento di 1,0) nei soggetti G6PD carenti (Cocco et al., 1998). Nonostante il fatto che questo primo studio abbia affermato l'esistenza di una relazione inversa tra deficit di G6PD e rischio di mortalità attribuibile a malattie del fegato nella popolazione, per quanto a noi risulta non sono stati effettuati ulteriori studi specificatamente orientati ad accertare il legame tra carenza enzimatica e rischio di HCC. In sostanza, quindi, l'ipotesi di un effetto protettivo da parte del deficit di G6PD nei confronti di questo tipo di tumore è rimasta sostanzialmente priva

di evidenze empiriche.

Nel presente studio abbiamo analizzato una casistica di pazienti sardi in cui l'attività della G6PD era stata determinata attraverso un metodo altamente sensibile e specifico (Mosca et al., 1996), e la diagnosi di HCC era stata effettuata con mezzi ecografici o con procedure radiologiche, e confermata mediante biopsia percutanea. I nostri risultati indicano che l'insorgenza del carcinoma epatocellulare nei pazienti con malattia epatica si riduce del 62% nei pazienti con deficit di G6PD, rispetto ai pazienti con normale attività enzimatica. La riduzione del rischio era indipendente dall'età e dal sesso, sulla base dell'analisi multivariata, in quanto l'interazione tra deficit di G6PD e sesso non è risultata statisticamente significativa. A prima vista il riscontro di una ridotta frequenza di carcinoma epatico nei soggetti con epatopatia cronica e deficit di G6PD può apparire paradossale, considerando il ruolo centrale di questo enzima nei meccanismi di protezione contro lo stress ossidativo (Pandolfi et al., 1995). Possiamo presumere che i risultati dello studio riflettano con ogni probabilità il fatto che la carenza di G6PD induce una carenza cronica NADPH attraverso l'inibizione della branca ossidativa della via dei pentoso fosfati (PPP) [28]. Ciò, a sua volta, può diminuire la produzione dell'anione superossido e altri radicali liberi, tra cui l'ossido nitrico che induce mutazioni del DNA e stimola la sintesi di citochine pro-infiammatorie coinvolte nella cancerogenesi [29]. Vista da questa prospettiva, l'inibizione della via dei pentoso fosfati agirebbe in modo analogo ad alcuni farmaci antitumorali che forzano l'utilizzazione del glucosio attraverso la glicolisi aerobica anziché la via dei pentoso fosfati [30]. Ulteriori meccanismi di protezione indotti dal deficit di G6PD possono essere correlati alla ridotta attivazione di cancerogeni chimici [15, 31, 32], all'inibizione dell'apoptosi [33], e dell'angiogenesi [29]. Questi dati ottenuti da studi nell'uomo sono in linea col ritardato sviluppo del cancro nei roditori indotto dal deidro-epiandrosterone (DHEA) un inibitore selettivo della G6PD [34].

Il nostro studio conferma che la maggior parte dei tumori epatici primitivi si verifica in pazienti con epatite cronica o cirrosi di qualsivoglia causa ed è più frequente negli uomini che nelle

donne. Tra i fattori di rischio di HCC in Sardegna, come nel resto del mondo, vi è l'infezione da virus C e B associata a cirrosi, forte predittore di HCC con OR di 2.312 e 3.844, rispettivamente [35]. Un possibile legame tra diabete mellito e HCC è stato suggerito come un certo numero di meta-analisi che hanno segnalato un'associazione positiva e un aumento del rischio di carcinoma epatocellulare nei pazienti con diabete [36-38]. Anche il nostro studio retrospettivo ha confermato che la prevalenza di carcinoma epatocellulare è significativamente più elevata nei pazienti con diabete rispetto a quelli senza diabete (17% contro 0,7%), con un OR corretto di 2.369. Tuttavia, si deve porre attenzione al fatto che con la progressione della malattia epatica verso la fibrosi, può svilupparsi un'intolleranza al glucosio la quale di per sé aumenta il rischio di carcinoma epatocellulare. Inoltre, i pazienti con diabete di tipo 2 possono sviluppare una steatosi epatica non alcolica, che è stata riconosciuta quale fattore di rischio ulteriore di HCC [38].

Diversi studi osservazionali hanno riportato che l'uso di statine [39], caffè [40], carni bianche [41], pesce [42], acidi grassi omega-3 [43], vitamina E [44] e consumo di verdure [45] si associano ad una riduzione del rischio di carcinoma epatocellulare. A questi si può ora aggiungere il ruolo protettivo indotto dalla carenza di G6PD. Il vantaggio offerto dal deficit di G6PD rimane significativo rispetto alle altre variabili, nella maggior parte dei modelli statistici eseguiti.

L'indagine condotta in questo studio presenta alcuni limiti metodologici. La prima limitazione deriva dalla sua natura retrospettiva che rende incompleti alcuni risultati, data l'assenza di alcune variabili e altre interferenze indesiderate. Inoltre, la nostra era un'indagine clinica e non uno studio basato sulla popolazione. Per tale motivo, i soggetti indagati non erano completamente rappresentativi della popolazione generale sarda e i partecipanti non sono stati randomizzati in modo da assicurare una distribuzione equilibrata dei potenziali fattori confondenti tra gruppi normali e G6PD carenti; l'epatopatia potrebbe essere stata meno grave nel gruppo con deficit di G6PD determinando quindi una riduzione artificiale della frequenza di

HCC in tale gruppo. Tuttavia, la frequenza complessiva della carenza di G6PD nella casistica da noi analizzata era simile alla frequenza media riportata in studi precedenti nella popolazione sarda, per cui una sovrastima o una sotto-stima del difetto enzimatico nei partecipanti allo studio sembra piuttosto improbabile.

In conclusione, il nostro studio suggerisce che la perdita di funzione di un gene ubiquitario come la G6PD può ridurre il rischio di HCC. Questo risultato è in linea con l'ipotesi, ora in auge, di un più ampio ruolo biologico della G6PD durante la carcinogenesi, e apre nuovi scenari per il trattamento molecolare del carcinoma epatocellulare. Recentemente è diventata disponibile la terapia mediante oligonucleotidi antisenso: ad esempio, se si conosce la sequenza nucleotidica di un particolare gene è teoricamente possibile inattivarlo sintetizzando un oligonucleotide "antisenso" complementare al RNA messaggero (mRNA) prodotto da quel gene [46]. Ultimamente, per la terapia del carcinoma epatocellulare è stata proposta l'uso di oligonucleotidi antisenso rivolto contro i messaggeri di alcune proteine sovraespresse durante la cancerogenesi epatica: essi includono l'antisenso verso il miRNA-21 [47] e altri anti-miRNA testati *in vitro*, negli animali da esperimento TGF-beta2 [48, 49], e anche negli esseri umani Mcl-1 [50]. Maggiori informazioni sull'attività della G6PD a livello individuale potrebbero inoltre facilitare lo sviluppo di nuovi sistemi di stratificazione del rischio e la programmazione di protocolli per lo screening dell'epatocarcinoma. Naturalmente, saranno necessarie ulteriori indagini su casistiche più ampie per rendere possibili tali sviluppi.

BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69–90.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127:2893–2917.
3. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35(5 Suppl 2): S72-8.
4. El-Serag HB, Kanwal F. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the United States: where are we? Where do we go? *Hepatology* 2014; 60:1767.
5. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45:529.
6. Munoz N, Bosch X. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: *In: Neoplasms of the Liver*, Okuda K, Ishak KG (Eds), Springer, Tokyo 1989. p.3.
7. Muir C, Waterhouse J, Mack T, et al. *Cancer incidence in five continents. Vol. 5 (IARC publications, No. 88)*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1987.
8. Bosch FX, Munoz N. Hepatocellular carcinoma in the world: Epidemiologic questions. In: *Etiology, Pathology and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in America. Advances in Applied Technology Series*, Tabor E, DiBisceglie AM, Purcell RH (Eds), Gulf, Houston 1991. p.35.
9. Okuda K. Epidemiology of primary liver cancer. In: *Primary Liver Cancer in Japan*, Tobe T (Ed), Springer-Verlag, Tokyo 1992. p.3.

10. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132:2557–2576.
11. Nishida N, Arizumi T, Hayaishi S, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Ikai I, Kudo M. Gender differences in the livers of patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C infection. *Dig Dis*. 2012;30:547-53.
12.
 - 1.
 2. Yu SJ. A concise review of updated guidelines regarding the management of hepatocellular carcinoma around the world: 2010-2016. *Clin Mol Hepatol*. 2016;22:7-17.
 - 3.
 4. Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 325:675.
 5. Biggeri A, Lagazio C, Catelan D, Pirastu R, Casson F, Terracini B. Report on health status of residents in areas with industrial, mining or military sites in Sardinia, Italy. *Epidemiol Prev*. 2006;30(1 Suppl 1):5-95.
 6. Garcea R, Daino L, Pascale R, Frassetto S, Cozzolino P, Ruggiu ME, Feo F. Inhibition by dehydroepiandrosterone of liver preneoplastic foci formation in rats after initiation-selection in experimental carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 1987;15:164-9.
 7. Pascale R, Ruggiu ME, Simile MM, et al. Dependence of benzo(a)pyrene metabolism on NADPH pool in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient human fibroblasts. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1990; 69:361–4.

8. Simile M, De Miglio M, Calvisi D, Muroli M, Frau M, Asara G, Daino L, Deiana L, Pascale R, Feo F. Long-term dehydroepiandrosterone and 16alpha-fluoro-5-androsten-17-one administration enhances DNA synthesis and induces expression of c-fos and c-Ha-ras in a selected population of preneoplastic lesions in liver of diethylnitrosamine-initiated rats. *Carcinogenesis*. 2001;22:301-8.
9. Fiorelli G, Meloni T, Palomba V, Manoussakis C, Villa S, Cappellini MD. Gene frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) polymorphic variants in Sardinia. *Gene Geogr* 1990;4:139-142.
10. Cocco P, Todde P, Fornera S, Manca MB, Manca P, Sias AR. Mortality in a cohort of men expressing the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* 1998; 91:706-709.
11. Bruix J, Sherman M; American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020-1022.
12. Mosca A, Paleari R, Rosti E, Luzzana M, Barella S, Sollaino C, Galanello R. Simultaneous automated determination of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in whole blood. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1996;34:431-8.
13. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359- E386.
14. Moore MS, Ivanina E, Bornschlegel K, Qiao B, Schymura MJ, Laraque F. Hepatocellular Carcinoma and Viral Hepatitis in New York City. *Clin Infect Dis*. 2016. pii: ciw605.
15. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, and Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1752-1763.

16. Sugano S, Miyoshi K, Suzuki T, et al. Intrahepatic arteriovenous shunting due to hepatocellular carcinoma and cirrhosis, and its change by transcatheter arterial embolization. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:184.
17. Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F, Luzzatto L. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J* 1995; 14:5209–15.
18. Luzzatto L, Notaro R. Malaria. Protecting against bad air. *Science* 2001; 293:442-3.
19. Shen X, Chen J, Qiu R, Fan X, Xin Y. Effect of camptothecin on inducible nitric oxide synthase expression in the colon cancer SW480 cell line. *Oncol Lett* 2015; 10:3157-3160.
20. Corti
21. Pascale R, Garcea R, Ruggi ME, et al. Decreased stimulation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate of superoxide radical production by polymorphonuclear leukocytes carrying the Mediterranean variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Carcinogenesis* 1987; 8:1567-70.
22. Frederiks WM, Vizan P, Bosch KS, Vreeling-Sindelárová H, Boren J, Cascante M. Elevated activity of the oxidative and non-oxidative pentose phosphate pathway in (pre)neoplastic lesions in rat liver. *Int J Exp Pathol.* 2008;89:232-40.
23. Baba M, Yamamoto R, Iishi H, Tatsuta M, Wada A. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase on enhanced proliferation of pre-neoplastic and neoplastic cells in rat liver induced by N-nitrosomorpholine. *Int J Cancer.* 1989;43:892-5.
24. Moore MA, Nakamura T, Shirai T, Ichihara A, Ito N. Immunohistochemical demonstration of increased glucose-6-phosphate dehydrogenase in preneoplastic and neoplastic le-

- sions induced by propylnitrosamines in F344 rats and Syrian hamsters. *Jpn J Cancer Res.* 1986;77:131-8.
25. Ho HY, Cheng ML, Chiu HY, Weng SF, Chiu DT. Dehydroepiandrosterone induces growth arrest of hepatoma cells via alteration of mitochondrial gene expression and function. *Int J Oncol.* 2008;33:969-77.
26. Cocco PL, Manca P, Dessì S. Preliminary results of a geographic correlation study on G6PD deficiency and cancer. *Toxicol Pathol* 1987; 15: 106-108.
27. Cocco PL, Dessì S, Avataneo G, Picchiri GF, Heineman EF. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and cancer in a Sardinian male population: A case-control study. *Carcinogenesis* 1989; 10:813-816.
28. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*, 2014; 74: 2913-21.
29. Cocco PL. Does G6PD deficiency protect against cancer? A critical review. *J Epidemiol Community Health* 1987; 41:89-93.
30. De Vita G, Alcalay M, Sampietro M, Cappellini MD, Fiorelli G, Toniolo D. Two point mutations are responsible for G6PD polymorphism in Sardinia. *Am J Hum Genet* 1989; 44:233-40.
31. Feo F, Ruggiu ME, Lenzerini L, et al. Benzo(a)pyrene metabolism by lymphocytes from normal individuals and individuals carrying the Mediterranean variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Int J Cancer* 1987; 39:560-4.
32. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C, Hansen G, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015;1:505-527.

33. Stein CJ, Colditz GA. Modifiable risk factors for cancer. *Br J Cancer*. 2004;90:299–303.
34. Lambert R, Saito H, Lucas E, Sankaranarayanan R. Survival from digestive cancer in emerging countries in Asia and Africa. *Eur J GastroenterolHepatol*. 2012;24:605–612.
35. Jaga K, Dharmani C. The epidemiology of pesticide exposure and cancer: A review. *Rev Environ Health*. 2005;20:15–38.
36. Omran A. The epidemiologic transition : a theory of the epidemiology of population change. *Milbank Memorial Fund Quarterly*. 1971;49:509–538.
37. Tognotti E. Program to eradicate malaria in Sardinia, 1946-1950. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1460–1466.
38. Pes GM, Errigo A. Fattori alimentari e longevità in Sardegna. In: *Longevità e identità in Sardegna*. Pes GM and Poulain M (eds). Franco Angeli, Milano, Italy.
39. Doderò G. Storia della medicina e della sanità pubblica in Sardegna. Aipsa, Cagliari; 1999.
40. Pes GM, Tolu F, Dore MP, Sechi GP, Errigo A, Canelada A et al. Male longevity in Sardinia, a review of historical sources supporting a causal link with dietary factors. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2014;69:411-8
41. Carta P, Aru G, Cadeddu C, Gigli G, Papi G, Carta F, et al. Mortality for pancreatic cancer among aluminium smelter workers in Sardinia, Italy. *G Ital Med LavErgon*. 2004;26:83-89.
42. Budroni M, Sechi O, Cossu A, Palmieri G, Tanda F, Foschi R, et al. Estimates of cancer-burden in Sardinia. *Tumori*. 2013;99:408–415. doi: 10.1700/1334.14806. [PMID: 24158071]

43. Cossu A, Budroni M, Pulighe F, Cesaraccio R, Palmieri G, Ruggiu MW, et al. Gastric cancer in North Sardinia, Italy. An epidemiological report. *Acta Medica Mediterranea*. 2014;30:935–940.
44. Paliogiannis P, Attene F, Cossu A, Budroni M, Cesaraccio R, Tanda F, et al. Lungcancer-epidemiology in North Sardinia, Italy. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*. 2013;8:45.
45. Palomba G, Loi A, Uras A, Fancello P, Piras G, Gabbas A, et al. A role of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in breast cancer susceptibility within Sardinian population. *BMC Cancer*. 2009;9:245.
46. Broccia G, Longinotti M, Gabbas A, Monne M, Porcu C, Chessa E, et al. A 30-year epidemiologic survey (1974-2003) of haematological malignancies on the island of Sardinia: temporal changes in incidence and a geographic comparison of incidence rates. *Ann Hematol*. 2014;93:1041–1049.
47. Dore MP, Pes GM, Sferlazzo G, Marras G, Bassotti G. Role of Helicobacter pylori Infection in Body Height of Adult Dyspeptic Patients. *Helicobacter*. 2016. doi: 10.1111/hel.12314.
48. Dore MP, Marras G, Rocchi C, Soro S, Loria MF, Bassotti G, et al. Changing prevalence of Helicobacter pylori infection and peptic ulcer among dyspeptic Sardinian patients. *Intern Emerg Med*. 2015;10:787–794.
49. Dore MP, Pes GM, Bassotti G, Farina MA, Marras G, Graham DY. Risk factors for erosive and nonerosive gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus in Northern Sardinia. *Scandinavian Journal of Gastroenterology (in press)*.
50. McCullagh P, Nelder JA. Log-linear models. In: *Generalized linear models*. Anonymous London: Chapman & Hall, 1989, 193–236.

51. Jönsson B, Wilking N. A global comparison regarding patient access to cancer drugs. *Ann Oncol.* 2007;18 Suppl 3:iii1–iii77.
52. Prince MJ, Wu F, Guo Y, GutierrezRobledo LM, O'Donnell M, Sullivan R, et al. The burden of disease in older people and implications for health policy and practice. *Lancet.* 2015;385:549–562.
53. Cocco P, Blair A, Congia P, Saba G, Ecça AR, Palmas C. Long-term health effects of the occupational exposure to DDT. A preliminary report. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;837:246-256.
54. Cavalli-Sforza LL, Menotti P, Piazza A. The history and geography of human genes. Princeton University. Princeton N.J.; 1994.
55. Poulain M, Pes GM, Grasland C, Carru C, Ferrucci L, Baggio G et al. Identification of a geographic area characterized by extreme longevity in the Sardinia island: the AKEA study. *Exp Gerontol.* 2004;39:1423–1429.
56. Thakkar et al, Age-Specific Cancer Incidence Rates Increase Through the Oldest Age Groups. *Am J Med Sci.* 2014;348:65–70.
57. Harding C, Pompei F, Wilson R. Peak and Decline in Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence at Old Ages. *Cancer.* 2012;118:1371–86.
58. Franceschi S, La Vecchia C. Cancer epidemiology in the elderly. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2001;39:219–226.
59. Hansen J. Common Cancers in the Elderly. *Drugs & Aging.* 1998;13:467–478.
60. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69.

61. El-Serag HB, Kanwal F. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the United States: where are we? Where do we go? *Hepatology* 2014; 60:1767.
62. Allan BJ, Wang B, Davis JS, et al. A review of 218 pediatric cases of hepatocellular carcinoma. *J Pediatr Surg* 2014; 49:166.
63. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45:529.
64. Bosetti C, Levi F, Boffetta P, et al. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology* 2008; 48:137.
65. Ryerson AB, Ehemann CR, Altekruse SF, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer* 2016; 122:1312.
66. Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, et al. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Ann Oncol* 2016; 27:926.
67. Petrick JL, Kelly SP, Altekruse SF, et al. Future of Hepatocellular Carcinoma Incidence in the United States Forecast Through 2030. *J Clin Oncol* 2016; 34:1787.
68. Cancer Incidence in five continents: IARC scientific publications volume VIII (No. 155), Parkin DM (Ed), IARC Press, Lyon 2002.
69. Skolnick AA. Armed with epidemiologic research, China launches programs to prevent liver cancer. *JAMA* 1996; 276:1458.
70. Tanaka H, Imai Y, Hiramatsu N, et al. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990 to 2003. *Ann Intern Med* 2008; 148:820.

71. El-Serag HB, Davila JA, Petersen NJ, McGlynn KA. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann Intern Med* 2003; 139:817.
72. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, et al. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. *Gastroenterology* 2004; 127:1372.
73. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology* 2004; 127:S27.
74. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 2007; 317:121.
75. 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.
76. Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 325:675.
77. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993; 328:1797.
78. Prates MD, Torres FO. A cancer survey in Lourenço Marques, Portuguese East Africa. *J Natl Cancer Inst* 1965; 35:729.
79. Wong R, Corley DA. Racial and ethnic variations in hepatocellular carcinoma incidence within the United States. *Am J Med* 2008; 121:525.
80. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatocellular carcinoma - United States, 2001-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59:517.

81. Yang JD, Harmsen WS, Slettedahl SW, et al. Factors that affect risk for hepatocellular carcinoma and effects of surveillance. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9:617.
82. Bralet MP, Régimbeau JM, Pineau P, et al. Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. *Hepatology* 2000; 32:200.
83. Yu MW, Chen CJ. Hepatitis B and C viruses in the development of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994; 17:71.
84. Sherman M, Peltekian KM, Lee C. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* 1995; 22:432.
85. Villeneuve JP, Desrochers M, Infante-Rivard C, et al. A long-term follow-up study of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive carriers in Montreal. *Gastroenterology* 1994; 106:1000.
86. Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, et al. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology* 2010; 138:1747.
87. Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988; 61:1942.
88. Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295:65.
89. Chen CJ, Yang HI, Iloeje U, et al. Models to predict hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B infection: The REVEAL HBV study (abstract). *Hepatology* 2005; 42 Suppl 1:714A.

90. Chen CF, Lee WC, Yang HI, et al. Changes in serum levels of HBV DNA and alanine aminotransferase determine risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011; 141:1240.
91. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:265.
92. Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, et al. High levels of hepatitis B surface antigen increase risk of hepatocellular carcinoma in patients with low HBV load. *Gastroenterology* 2012; 142:1140.
93. Lu SN, Lin TM, Chen CJ, et al. A case-control study of primary hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer* 1988; 62:2051.
94. Chen CJ, Liang KY, Chang AS, et al. Effects of hepatitis B virus, alcohol drinking, cigarette smoking and familial tendency on hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1991; 13:398.
95. Lin TM, Chen CJ, Lu SN, et al. Hepatitis B virus e antigen and primary hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 1991; 11:2063.
96. Yu MW, You SL, Chang AS, et al. Association between hepatitis C virus antibodies and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res* 1991; 51:5621.
97. Tsai JF, Jeng JE, Ho MS, et al. Additive effect modification of hepatitis B surface antigen and e antigen on the development of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73:1498.
98. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347:168.

99. Dragosics B, Ferenci P, Hitchman E, Denk H. Long-term follow-up study of asymptomatic HBsAg-positive voluntary blood donors in Austria: a clinical and histologic evaluation of 242 cases. *Hepatology* 1987; 7:302.
100. Chen CJ, Yang HI, Iloeje UH, et al. Time-dependent relative risk of hepatocellular carcinoma for markers of chronic hepatitis B. The REVEAL HBV study (abstract). *Hepatology* 2005; 42 Suppl 1:722A.
101. Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, et al. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers. *Liver Int* 2007; 27:1356.
102. Simonetti J, Bulkow L, McMahon BJ, et al. Clearance of hepatitis B surface antigen and risk of hepatocellular carcinoma in a cohort chronically infected with hepatitis B virus. *Hepatology* 2010; 51:1531.
103. Yuen MF, Wong DK, Fung J, et al. HBsAg Seroclearance in chronic hepatitis B in Asian patients: replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008; 135:1192.
104. Sung JJ, Tsoi KK, Wong VW, et al. Meta-analysis: Treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:1067.
105. Papatheodoridis GV, Lampertico P, Manolakopoulos S, Lok A. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide therapy: a systematic review. *J Hepatol* 2010; 53:348.
106. Shen YC, Hsu C, Cheng CC, et al. A critical evaluation of the preventive effect of antiviral therapy on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C or B: a novel approach by using meta-regression. *Oncology* 2012; 82:275.

107. Singal AK, Salameh H, Kuo YF, Fontana RJ. Meta-analysis: the impact of oral anti-viral agents on the incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38:98.
108. Huang YT, Jen CL, Yang HI, et al. Lifetime risk and sex difference of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis B and C. *J Clin Oncol* 2011; 29:3643.
109. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81:67.
110. Norder H, Hammas B, Lee SD, et al. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 7):1341.
111. Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175:1285.
112. Yuen MF, Tanaka Y, Fong DY, et al. Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50:80.
113. Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, et al. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002; 123:1848.
114. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100:1134.
115. Huang YT, Yang HI, Jen CL, et al. Suppression of hepatitis B virus replication by hepatitis C virus: combined effects on risk of hepatocellular carcinoma (abstract). *Hepatology* 2005; 42 (Suppl 1):230A.

116. Benvegnù L, Fattovich G, Noventa F, et al. Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study. *Cancer* 1994; 74:2442.
117. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut* 2000; 46:420.
118. Ji J, Sundquist K, Sundquist J. A population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104:790.
119. Liu S, Zhang H, Gu C, et al. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:1066.
120. Yang JD, Kim WR, Coelho R, et al. Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9:64.
121. Lin CW, Lin CC, Mo LR, et al. Heavy alcohol consumption increases the incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-related cirrhosis. *J Hepatol* 2013; 58:730.
122. Loomba R, Liu J, Yang HI, et al. Synergistic effects of family history of hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus infection on risk for incident hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:1636.
123. Li Q, Yu CH, Yu JH, et al. ABO blood group and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One* 2012; 7:e29928.
124. Børresen ML, Koch A, Biggar RJ, et al. Hepatocellular carcinoma and other liver disease among Greenlanders chronically infected with hepatitis B virus: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:1676.

125. Bruix J, Barrera JM, Calvet X, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989; 2:1004.
126. Colombo M, Kuo G, Choo QL, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989; 2:1006.
127. Omland LH, Jepsen P, Krarup H, et al. Liver cancer and non-Hodgkin lymphoma in hepatitis C virus-infected patients: results from the DANVIR cohort study. *Int J Cancer* 2012; 130:2310.
128. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology* 2009; 136:138.
129. Lewis S, Roayaie S, Ward SC, et al. Hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C in the absence of advanced fibrosis or cirrhosis. *AJR Am J Roentgenol* 2013; 200:W610.
130. Hoshida Y, Villanueva A, Sangiovanni A, et al. Prognostic gene expression signature for patients with hepatitis C-related early-stage cirrhosis. *Gastroenterology* 2013; 144:1024.
131. Budhu A, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol* 2006; 80:1197.
132. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998; 4:1065.
133. Kamegaya Y, Hiasa Y, Zukerberg L, et al. Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2005; 41:660.

134. Maki A, Kono H, Gupta M, et al. Predictive power of biomarkers of oxidative stress and inflammation in patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:1182.
135. Suruki RY, Mueller N, Hayashi K, et al. Host immune status and incidence of hepatocellular carcinoma among subjects infected with hepatitis C virus: a nested case-control study in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:2521.
136. Furutani T, Hino K, Okuda M, et al. Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* 2006; 130:2087.
137. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol* 2009; 50:1142.
138. Stankovic-Djordjevic D, Djordjevic N, Tasic G, et al. Hepatitis C virus genotypes and the development of hepatocellular carcinoma. *J Dig Dis* 2007; 8:42.
139. Bruno S, Crosignani A, Maisonneuve P, et al. Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study. *Hepatology* 2007; 46:1350.
140. Noursbaum JB, Pol S, Nalpas B, et al. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med* 1995; 122:161.
141. Lee MH, Yang HI, Lu SN, et al. Hepatitis C virus genotype 1b increases cumulative lifetime risk of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2014; 135:1119.
142. Ikeda K, Marusawa H, Osaki Y, et al. Antibody to hepatitis B core antigen and risk for hepatitis C-related hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Ann Intern Med* 2007; 146:649.

- 143.Lok AS, Everhart JE, Di Bisceglie AM, et al. Occult and previous hepatitis B virus infection are not associated with hepatocellular carcinoma in United States patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011; 54:434.
- 144.George SL, Bacon BR, Brunt EM, et al. Clinical, virologic, histologic, and biochemical outcomes after successful HCV therapy: a 5-year follow-up of 150 patients. *Hepatology* 2009; 49:729.
- 145.van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, et al. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA* 2012; 308:2584.
- 146.Ganne-Carrié N, Layese R, Bourcier V, et al. Nomogram for individualized prediction of hepatocellular carcinoma occurrence in hepatitis C virus cirrhosis (ANRS CO12 CirVir). *Hepatology* 2016; 64:1136.
- 147.Zaman SN, Johnson PJ, Williams R. Silent cirrhosis in patients with hepatocellular carcinoma. Implications for screening in high-incidence and low-incidence areas. *Cancer* 1990; 65:1607.
- 148.Liver Cancer Study Group of Japan. Primary liver cancer in Japan. Clinicopathologic features and results of surgical treatment. *Ann Surg* 1990; 211:277.
- 149.Fargion S, Fracanzani AL, Piperno A, et al. Prognostic factors for hepatocellular carcinoma in genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1994; 20:1426.
- 150.Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, et al. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985; 313:1256.

151. Deugnier YM, Guyader D, Crantock L, et al. Primary liver cancer in genetic hemochromatosis: a clinical, pathological, and pathogenetic study of 54 cases. *Gastroenterology* 1993; 104:228.
152. Chen CJ, Wang LY, Lu SN, et al. Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 24:38.
153. Qian GS, Ross RK, Yu MC, et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3:3.
154. Bosch FX, Ribes J, Borràs J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999; 19:271.
155. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; 350:429.
156. Unsal H, Yakicier C, Marçais C, et al. Genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:822.
157. Yan RQ, Su JJ, Huang DR, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. II. Experimental induction of hepatocellular carcinoma in tree shrews exposed to hepatitis B virus and aflatoxin B1. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122:289.
158. Ghebranious N, Sell S. Hepatitis B injury, male gender, aflatoxin, and p53 expression each contribute to hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1998; 27:383.
159. Yu SZ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10:674.
160. Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, et al. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 1996; 17:1317.

161. Tsai JF, Chuang LY, Jeng JE, et al. Betel quid chewing as a risk factor for hepatocellular carcinoma: a case-control study. *Br J Cancer* 2001; 84:709.
162. Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, et al. Habitual betel quid chewing as a risk factor for cirrhosis: a case-control study. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82:365.
163. Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, et al. Habitual betel quid chewing and risk for hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis. *Medicine (Baltimore)* 2004; 83:176.
164. Yu MC, Tong MJ, Govindarajan S, Henderson BE. Nonviral risk factors for hepatocellular carcinoma in a low-risk population, the non-Asians of Los Angeles County, California. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:1820.
165. Kuper H, Tzonou A, Kaklamani E, et al. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 85:498.
166. Trichopoulos D, Bamia C, Lagiou P, et al. Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:1686.
167. Mayans MV, Calvet X, Bruix J, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Catalonia, Spain. *Int J Cancer* 1990; 46:378.
168. Tanaka K, Hirohata T, Takeshita S, et al. Hepatitis B virus, cigarette smoking and alcohol consumption in the development of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Fukuoka, Japan. *Int J Cancer* 1992; 51:509.
169. Mohamed AE, Kew MC, Groeneveld HT. Alcohol consumption as a risk factor for hepatocellular carcinoma in urban southern African blacks. *Int J Cancer* 1992; 51:537.
170. Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002; 155:323.

- 171.Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 1994; 106:1085.
- 172.Chiesa R, Donato F, Tagger A, et al. Etiology of hepatocellular carcinoma in Italian patients with and without cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:213.
- 173.Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36:1206.
- 174.Ohki T, Tateishi R, Sato T, et al. Obesity is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6:459.
- 175.Saunders D, Seidel D, Allison M, Lyrtzopoulos G. Systematic review: the association between obesity and hepatocellular carcinoma - epidemiological evidence. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31:1051.
- 176.Loomba R, Yang HI, Su J, et al. Synergism between obesity and alcohol in increasing the risk of hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 2013; 177:333.
- 177.Brechot C, Nalpas B, Feitelson MA. Interactions between alcohol and hepatitis viruses in the liver. *Clin Lab Med* 1996; 16:273.
- 178.Schiff ER. Hepatitis C and alcohol. *Hepatology* 1997; 26:39S.
- 179.El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126:460.
- 180.Jee SH, Ohrr H, Sull JW, et al. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. *JAMA* 2005; 293:194.

181. Inoue M, Iwasaki M, Otani T, et al. Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Arch Intern Med* 2006; 166:1871.
182. Lai SW, Chen PC, Liao KF, et al. Risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients and risk reduction associated with anti-diabetic therapy: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:46.
183. Salmon D, Bani-Sadr F, Loko MA, et al. Insulin resistance is associated with a higher risk of hepatocellular carcinoma in cirrhotic HIV/HCV-co-infected patients: results from ANRS CO13 HEPAVIH. *J Hepatol* 2012; 56:862.
184. Li Q, Li WW, Yang X, et al. Type 2 diabetes and hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. *Int J Cancer* 2012; 131:1197.
185. Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, et al. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013; 57:964.
186. Chen HP, Shieh JJ, Chang CC, et al. Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: population-based and in vitro studies. *Gut* 2013; 62:606.
187. Campbell PT, Newton CC, Freedman ND. *Cancer Res* 2016.
188. Wang P, Kang D, Cao W, et al. Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev* 2012; 28:109.
189. Yang WS, Va P, Bray F, et al. The role of pre-existing diabetes mellitus on hepatocellular carcinoma occurrence and prognosis: a meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS One* 2011; 6:e27326.
190. Wang C, Wang X, Gong G, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Int J Cancer* 2012; 130:1639.

191. Welzel TM, Graubard BI, Zeuzem S, et al. Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database. *Hepatology* 2011; 54:463.
192. Singh S, Singh PP, Singh AG, et al. Anti-diabetic medications and the risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2013; 108:881.
193. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002; 123:134.
194. Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2009; 44 Suppl 19:89.
195. Ascha MS, Hanounch IA, Lopez R, et al. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010; 51:1972.
196. Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, et al. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9:428.
197. 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; 14:124.
198. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2016; 375:794.
199. Seyda Seydel G, Kucukoglu O, Altinbasv A, et al. Economic growth leads to increase of obesity and associated hepatocellular carcinoma in developing countries. *Ann Hepatol* 2016; 15:662.

- 200.Koh JC, Loo WM, Goh KL, et al. Asian consensus on the relationship between obesity and gastrointestinal and liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2016; 31:1405.
- 201.Stewart MF. Review of hepatocellular cancer, hypertension and renal impairment as late complications of acute porphyria and recommendations for patient follow-up. *J Clin Pathol* 2012; 65:976.
- 202.Andant C, Puy H, Bogard C, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with acute hepatic porphyria: frequency of occurrence and related factors. *J Hepatol* 2000; 32:933.
- 203.Andant C, Puy H, Faivre J, Deybach JC. Acute hepatic porphyrias and primary liver cancer. *N Engl J Med* 1998; 338:1853.
- 204.Andersson C, Bjersing L, Lithner F. The epidemiology of hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. *J Intern Med* 1996; 240:195.
- 205.Bengtsson NO, Hardell L. Porphyrins, porphyrins and hepatocellular cancer. *Br J Cancer* 1986; 54:115.
- 206.Gubler JG, Bargetzi MJ, Meyer UA. Primary liver carcinoma in two sisters with acute intermittent porphyria. *Am J Med* 1990; 89:540.
- 207.Hardell L, Bengtsson NO, Jonsson U, et al. Aetiological aspects on primary liver cancer with special regard to alcohol, organic solvents and acute intermittent porphyria--an epidemiological investigation. *Br J Cancer* 1984; 50:389.
- 208.Kauppinen R, Mustajoki P. Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1988; 57:117.
- 209.Linet MS, Gridley G, Nyrén O, et al. Primary liver cancer, other malignancies, and mortality risks following porphyria: a cohort study in Denmark and Sweden. *Am J Epidemiol* 1999; 149:1010.

- 210.Lithner F, Wetterberg L. Hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. *Acta Med Scand* 1984; 215:271.
- 211.Liu Y, He Y, Li T, et al. Risk of primary liver cancer associated with gallstones and cholecystectomy: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9:e109733.
- 212.Tanabe KK, Lemoine A, Finkelstein DM, et al. Epidermal growth factor gene functional polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *JAMA* 2008; 299:53.
- 213.Abu Dayyeh BK, Yang M, Fuchs BC, et al. A functional polymorphism in the epidermal growth factor gene is associated with risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011; 141:141.
- 214.Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011; 17:589.
- 215.Freedman ND, Cross AJ, McGlynn KA, et al. Association of meat and fat intake with liver disease and hepatocellular carcinoma in the NIH-AARP cohort. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:1354.
- 216.Cross AJ, Leitzmann MF, Gail MH, et al. A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk. *PLoS Med* 2007; 4:e325.
- 217.Luo J, Yang Y, Liu J, et al. Systematic review with meta-analysis: meat consumption and the risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39:913.
- 218.Tsan YT, Lee CH, Wang JD, Chen PC. Statins and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. *J Clin Oncol* 2012; 30:623.
- 219.Tsan YT, Lee CH, Ho WC, et al. Statins and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Clin Oncol* 2013; 31:1514.

- 220.Hsiang JC, Wong GL, Tse YK, et al. Statin and the risk of hepatocellular carcinoma and death in a hospital-based hepatitis B-infected population: A propensity score landmark analysis. *J Hepatol* 2015; 63:1190.
- 221.Singh S, Singh PP, Singh AG, et al. Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2013; 144:323.
- 222.Friedman GD, Achacoso N, Fireman B, Habel LA. Statins and Reduced Risk of Liver Cancer: Evidence for Confounding. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108.
- 223.Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, et al. Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012; 142:1468.
- 224.Fedirko V, Trichopolou A, Bamia C, et al. Consumption of fish and meats and risk of hepatocellular carcinoma: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Ann Oncol* 2013; 24:2166.
- 225.Yang Y, Zhang D, Feng N, et al. Increased intake of vegetables, but not fruit, reduces risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2014; 147:1031.
- 226.Huang RX, Duan YY, Hu JA. Fish intake and risk of liver cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2015; 10:e0096102.
- 227.Bamia C, Lagiou P, Jenab M, et al. Fruit and vegetable consumption in relation to hepatocellular carcinoma in a multi-centre, European cohort study. *Br J Cancer* 2015; 112:1273.
- 228.Zhang W, Shu XO, Li H, et al. Vitamin intake and liver cancer risk: a report from two cohort studies in China. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104:1173.
- 229.Larsson SC, Wolk A. Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2007; 132:1740.

230.Bravi F, Bosetti C, Tavani A, et al. Coffee reduces risk for hepatocellular carcinoma: an updated meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:1413.

231.Setiawan VW, Wilkens LR, Lu SC, et al. Association of coffee intake with reduced incidence of liver cancer and death from chronic liver disease in the US multiethnic cohort. *Gastroenterology* 2015; 148:118.

