



Allegato 4 : Biopsia ed esame istologico

**A cura del Gruppo di Studio Epatocarcinoma
Rete oncologica Piemonte e Valle d'Aosta
Anno di pubblicazione 2022**

BIOPSIA ED ESAME ISTOLOGICO

2.1 Indicazioni. Le indicazioni all'esecuzione della biopsia epatica, nel sospetto di HCC sono le seguenti:

- Lesioni epatiche focali (range usuale ≥ 1 cm e ≤ 2 cm) in fegato cirrotico con pattern contrastografico atipico/sospetto LI-RADS LR-4 (enhancement arterioso non seguito da washout o mancato enhancement arterioso) alla RM confermato da una seconda metodica (RM, TC o CEUS);
- Lesioni epatiche focali maligne indeterminate (LI-RADS LR-M);
- Lesioni epatiche maligne che soddisfano i criteri LI-RADS LR-5 in pz. non ad alto rischio di HCC, con CA 19-9 o CEA elevati o con altro tumore primitivo a potenziale metastatico;
- Lesioni epatiche focali in fegato non cirrotico;
- Neoplasie avanzate eleggibili alla terapia sistemica, quale test diagnostico confermativo di istotipo su tumore primitivo e/o su metastasi o qualora fosse opportuna una tipizzazione molecolare (*Childs et al. British Journal of Cancer 2021; 125: 1350-1355*)

2.2 Tecnica di esecuzione. Tra le tecniche diagnostiche invasive la biopsia epatica con ago tranciante (Trucut) è da preferirsi alla citologia agoaspirativa in quanto permette una valutazione microscopica sia dei dettagli citologici sia dell'architettura della lesione su frustolo tissutale, fornendo inoltre un campione adatto a indagini di immunohistochimica e biologia molecolare; il materiale biptico dovrebbe comprendere almeno un frustolo rappresentativo della lesione e un frustolo di parenchima epatico extralesionale per la comparazione morfologica (per i dettagli tecnici, le controindicazioni assolute e relative e le complicanze della metodica si rimanda a *Neuberger J et al. Gut 2020; 69: 1382-1403*).

2.3 Diagnosi differenziale. Nel fegato cirrotico, le principali difficoltà diagnostiche sono costituite dal riconoscimento degli HCC ben differenziati e dei noduli displastici (DN), soprattutto quelli di alto grado (HGDN); nel fegato non cirrotico, il HCC deve essere distinto principalmente da lesioni focali benigne quali l'adenoma epatocellulare (HCA), l'iperplasia nodulare focale (FNH) e i noduli rigenerativi. Il HCC deve essere inoltre distinto da altre neoplasie primitive del fegato (colangiocarcinoma intraepatico, epato-colangiocarcinoma, carcinoma indifferenziato) e dalle neoplasie metastatiche. I criteri morfologici e le indagini immunohistochimiche su cui si basa la diagnosi differenziale di tali lesioni sono descritti in: *WHO Classification of Tumours, Digestive System Tumours, 5th Edition, IARC, Lyon; pg. 220-262*

Un reperto istologico dubbio o negativo su lesione radiologicamente sospetta dovrebbe essere considerato un potenziale falso negativo (HCC ben differenziato, errore di campionamento valutato in circa il 30%) e richiede la ripetizione della biopsia (una seconda biopsia riduce la percentuale dei falsi negativi a meno del 10%); la ripetizione della biopsia è inoltre indicata qualora il reperto istologico fosse in contrasto con dati di imaging, biomarkers o altri fattori.

Riferimenti: LG AIOM, Ed 2020; https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2020/10/2020_LG_AIOM_EPATOCARCINOMA.pdf
Neuberger J et al. *Gut* 2020; 69: 1382-1403
Childs et al. *British Journal of Cancer* 2021; 125: 1350-1355

2.4 Istologia

Riferimenti: *WHO Classification of Tumours Editorial Board (ed) (2019). WHO Classification of Tumours, Digestive System Tumours, 5th Edition, IARC, Lyon*

Gli elementi di HCC mostrano evidenza di differenziazione epatocellulare morfologica e/o immunofenotipica con perdita della normale architettura parenchimale in termini di arterializzazione dei sinusoidi e riduzione o perdita della trama reticolare; l'atipia citologica varia da minima a marcata e l'attività proliferativa è

generalmente aumentata. Da escludere aspetti di differenziazione eterotipica non-epatocellulare, in particolare colangiocellulare.

Qui viene adottata la classificazione *WHO 5th Ed, 2019*. Si distinguono quattro pattern di crescita tumorale microarchitetturali che possono combinarsi tra loro in una data neoplasia: trabecolare, solido/compatto, pseudoghiandolare/pseudoacinare, e macrotrabecolare (trabecole spesse ≥ 10 cellule); inoltre, vengono individuati quattro pattern di crescita tumorale macroarchitetturali: nodulo singolo, grande nodulo dominante con piccoli noduli satelliti multipli, cirroticomimetico, noduli distinti multipli. Nella sua forma iniziale (< 2 cm: piccolo HCC/early HCC), prognosticamente più favorevole, l'HCC è costituito da un nodulo non incapsulato a margini indistinti. In tabella 1 sono riportati i nove sottotipi istologici del HCC, con i rispettivi correlati clinici e molecolari.

Tab.1 Sottotipi istologici di HCC (*WHO 5th Ed, 2019*)

Sottotipo	Frequenza relativa	Correlati clinici	Prognosi rispetto HCC NAS	Morfologia	Caratteristiche molecolari
Steatoepatitico	5-20%	Associazione con steatoepatite metabolica/esotossica	uguale	Simil-steatoepatitica	Attivazione di IL-6/JAK/STAT
A cellule chiare	3-7%	Non noti	migliore	Cellule chiare glicogenate $> 80\%$	Non note
Macrotrabecolare /massivo	5%	AFP elevata, prognosi sfavorevole	peggiore	Macrotrabecole $> 50\%$, invasione vascolare	Mutazione di TP53 e amplificazione di FGF19
Scirroso	4%	Simula il colangiocarcinoma intraepatico (ICC) radiologicamente	variabile	Fibrosi intratumorale $> 50\%$	Mutazione di TSC1/2, attivazione di TGF- β signalling
Cromofobo	3%	Non noti	uguale	Citoplasma poco tingibile, glicogenato, monomorfismo nucleare	Alternative lengthening dei telomeri
Carcinoma fibrolamellare	1%	Giovani (media 25 aa), in fegato normale	uguale in fegato non cirrotico	Cellule grandi, eosinofile, nucleoli prominenti, fibrosi densa	Attivazione di PKA via gene di fusione DNAJB1-PRKACA
Ricco in neutrofili (Neutrophil-rich)	$< 1\%$	WBC, PCR, IL-6 elevati	peggiore	Numerosi neutrofili intratumorali, aspetti sarcomatoidi	Produzione di G-CSF
Ricco in linfociti (Lymphocyte-rich)	$< 1\%$	Non noti	migliore	Linfociti prevalgono su cellule tumorali	Non note

2.5 INDAGINI IMMUNOISTOCHIMICHE E MOLECOLARI

Riferimenti: *WHO Classification of Tumours Editorial Board (ed) (2019). WHO Classification of Tumours, Digestive System Tumours, 5th Edition, IARC, Lyon*

Calderaro J et al. J Hepathol 2019; 71: 616-630

In tabella 2 sono elencati i principali markers immunoistochimici utilizzati nella diagnostica istopatologica dell'HCC. Si distinguono markers di differenziazione epatocitaria, utili nella definizione di istotipo, markers tipicamente sovra espressi nel HCC, utilizzati in panel per la diagnosi differenziale con lesioni epatiche

premalighe e proliferative benigne e, infine, markers di significato prognostico; una diagnosi definitiva richiede la piena compatibilità del reperto immunohistochimico con la morfologia in Ematossilina-Eosina.

L'espressione immunohistochimica della proteina PD-L1 (Programmed death ligand 1) consente di selezionare pazienti con HCC avanzati/metastatici da destinare a trattamenti con checkpoint inhibitors bloccanti l'asse PD1-PD-L1. Per fornire un dato riproducibile, è richiesta una valutazione dell'espressione di PD-L1 con metodologia validata (es: clone 22C3 su piattaforma Dako-Agilent e SP263 su piattaforma Roche Ventana).

Tab 2 Markers immunohistochimici di utilità diagnostica (*WHO 5th Ed, 2019*)

Marker	Pattern di colorazione	Sensibilità	Note
Arginasi-1 (ARG1)	Citoplasma e nucleo	45-95%	Differenziazione epatocitaria Talora neg. in HCC ben differ; meglio di Hep Par-1 in HCC scarsamente differ.
Hep Par-1	Citoplasma	70-85%	Differenziazione epatocitaria Meglio di ARG1 in HCC ben differ.
CEA Policlonale	Canalicolare	45-80%	Buona resa morfologica
CD10	Canalicolare	50-75%	Buona resa morfologica
AFP	Citoplasma	30%	Perlopiù neg. in HCC ben differ.
Glypican-3 (GPC3) *	Nucleo, Citoplasma/membrana	72% in panel con GS e HSP70	Sovraespresso nel HCC
Glutamina sintetasi (GS)**	Citoplasma	72% in panel con GPC3 e HSP70	Sovraespresso nel HCC Surrogato di mutazione / attivazione di β -Catenina
Heat Shock protein 70 (HSP70) ^o	Nucleo	72% in panel con GPC3 e GS	Sovraespresso nel HCC
CK19	Citoplasma		Prognosi sfavorevole se espressa in più del 5% delle cellule neoplastiche

Sono state proposte classificazioni dell'HCC in base a criteri puramente molecolari o combinati, molecolari e istologici (*vedi Calderaro J et al. J Hepathol 2019; 71: 616-630*); esse, tuttavia, non presentano al momento vantaggi dal punto di vista clinico rispetto alle informazioni fornite dall' imaging e dall'istopatologia tradizionale. Da segnalare, tra i fattori di valore prognostico, l'amplificazione di FGF19 e la tipizzazione biomolecolare tramite *gene expression profiling* (sottoclasse *low-proliferation*, caratterizzata da stabilità cromosomica ed espressione di markers di differenziazione epatocitaria vs sottoclasse *high proliferation* caratterizzata da attivazione delle *signalling pathways* coinvolte nella progressione del ciclo cellulare e da fenotipo più aggressivo a prognosi sfavorevole). L'analisi molecolare quale metodica ancillare diagnostica trova particolare applicazione nella diagnosi del carcinoma fibrolamellare, con la dimostrazione della traslocazione DNAJB1-PRKACA.

2.6 GRADING

Riferimenti: *WHO Classification of Tumours Editorial Board (ed) (2019). WHO Classification of Tumours, Digestive System Tumours, 5th Edition, IARC, Lyon*

Il grado istologico dell'HCC, secondo la classificazione WHO 5th Ed, 2019 corrisponde al grado di differenziazione morfologica della neoplasia rispetto all'epatocita normale apprezzabile in Ematossilina-Eosina ed è correlato alla prognosi; in caso di presenza di differenti gradi di differenziazione nel medesimo tumore, viene riportato il grado più alto (prognosticamente sfavorevole), indipendentemente dalla sua percentuale. Aspetti sarcomatoidi e anaplastici vengono considerati a scarso grado di differenziazione; il carcinoma

indifferenziato primitivo non viene gradato. Il sistema di grading è basato su tre gradi di differenziazione: G1 (ben differenziato, comprende i gradi G1 e G2 del sistema a 4 gradi di Edmondson e Steiner modificato: atipia lieve-moderata, spesso necessarie immunocolorazioni specifiche per HCC), G2 (moderatamente differenziato: chiaramente maligno, differenziazione epatocitaria riconoscibile), G3 (scarsamente differenziato: chiaramente maligno, dubbia differenziazione, spesso necessarie indagini immunoistochimiche).

2.7 REFERTO STRUTTURATO

Riferimenti:

Burt AD, Alves V, Clouston AD, Guido M, Hübscher SG, Kakar S, Ng IO, Nyun Park Y, Reeves HL, Wyatt J, Yeh MM, Washington MK (2020). *Intrahepatic Cholangiocarcinoma, Perihilar Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma Histopathology Reporting Guide*. International Collaboration on Cancer Reporting; Sydney, Australia. ISBN: 978-1-922324-09-2.

(<http://www.iccr-cancer.org/datasets/published-datasets/digestive-tract/liver>)

CAP Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Hepatocellular Carcinoma
Version: 4.2.0.0, 2021 (https://documents.cap.org/protocols/Liver.HCC_4.2.0.0.REL_CAPCP.docx)

RCPATH Standards and datasets for reporting cancers: Dataset for histopathology reporting of Liver resection specimens (including gallbladder) and liver biopsies for primary and metastatic carcinoma (2nd edition, 2012)

(<https://www.rcpath.org/uploads/assets/cbae24ce-220c-4d9f-95c5b83dd1f0ad2b/Dataset-for-histopathology-reporting-of-liver-resection-specimens-and-liver-biopsies-for-primary-and-metastatic-carcinoma-2nd-edition.pdf>)

Il referto istologico dovrebbe comprendere: dati anagrafici del paziente, struttura sanitaria richiedente con data dell'intervento e data della richiesta, data di accettazione del materiale, descrizione del materiale inviato, notizie anamnestico-cliniche, esame macroscopico, diagnosi istologica, indicazione delle metodiche ancillari eseguite (colorazioni immunoistochimiche, indagini di biologia molecolare).

Descrizione del materiale inviato: biopsia epatica, resezione segmentaria (specificare segmento/i o tipo di segmentectomia), resezione cuneiforme (specificare sito/segmento), epatectomia totale; linfonodi (specificare); altro

Notizie anamnestico-cliniche: patologie epatiche associate, dati di imaging, pregressi trattamenti.

Esame macroscopico:

Biopsia epatica: numero e lunghezza dei frustoli biotici;

Resezioni: dimensioni e peso del campione chirurgico; numero, dimensione massima e localizzazione dei noduli tumorali (noduli multipli: diametro massimo dei 5 noduli maggiori, range dimensionale dei restanti); satellitosi (presenza/assenza/non valutabilità); rottura tumorale macroscopica/perforazione della sierosa (presenza/assenza); invasione macroscopica di organi-strutture adiacenti (neoplasia limitata al fegato/presente, specificare le strutture interessate); invasione vascolare (VI) di vasi venosi maggiori portali o epatici, specificando se branche principali; rapporto della neoplasia coi margini chirurgici.

Diagnosi istologica:

Istotipo sec. WHO 5th Ed, 2019: (HCC NAS/di tipo non speciale, steatoepatitico, a cellule chiare, macrotrabecolare/massivo, scirroso, cromofobo, carcinoma fibrolamellare, ricco in neutrofili/neutrophil-rich, ricco in linfociti/lymphocyte-rich);

Grado sec. WHO 5th Ed, 2019: ben differenziato G1, moderatamente differenziato G2, scarsamente differenziato G3;

Infiltrazione neoplastica di strutture/organi adiacenti: neoplasia limitata al fegato/presente (specificare: branche principali della vena porta/delle vene epatiche, del peritoneo viscerale, della colecisti, del diaframma, altro);

Invasione vascolare (IV): assente/presente, dei piccoli vasi – MiV; presente, dei grandi vasi (branche principali della vena epatica/della vena porta); presente NAS;

Invasione perineurale (Pn): assente/presente;

Lesioni associate: non identificabili/presenti (steatosi, steatoepatite, emosiderosi, lesioni biliari, epatite cronica, altro; segnalare eventuale presenza di fibrosi, se possibile con relativo stadio; segnalare lesioni displastiche/premaligne);

Risposta alla terapia: (da valutare nei 5 noduli maggiori) necrosi tumorale: assente/presente, totale/presente, parziale - %; fibrosi: assente/presente - %);

Stato dei margini (parenchimali, altri): margini non coinvolti (riportare la distanza minima dai margini in mm)/margini non coinvolti ma prossimi (distanza < 1 mm)/margini coinvolti (R1);

Linfonodi: indenni (specificare il numero)/metastasi in (specificare il numero di linfonodi metastatici sul totale);

Classificazione TNM (UICC 8th Ed, 2017): (vedi tabella 3)

Indagini immunohistochimiche eseguite: (elenco, eventuale commento).

Tab 3 Classificazione TNM (UICC, 8th Ed., 2017)

<p>Liver (ICD-O-3 C 22.0)</p> <p>Rules for Classification</p> <p>The classification applies to hepatocellular carcinoma.</p> <p>Cholangio- (intrahepatic bile duct) carcinoma of the liver has a separate classification (see page 83). There should be histological confirmation of the disease.</p> <p>The following are the procedures for assessing T, N, and M categories.</p> <p>T categories Physical examination, imaging, and/or surgical exploration N categories Physical examination, imaging, and/or surgical exploration M categories Physical examination, imaging, and/or surgical exploration</p> <p>Note</p> <p>Although the presence of cirrhosis is an important prognostic factor it does not affect the TNM classification, being an independent prognostic variable.</p> <p>Regional Lymph Nodes</p> <p>The regional lymph nodes are the hilar, hepatic (along the proper hepatic artery), periportal (along the portal vein), inferior phrenic, and caval nodes.</p> <p>TNM Clinical Classification</p> <p>T – Primary Tumour</p> <p>TX Primary tumour cannot be assessed T0 No evidence of primary tumour</p> <p>T1a Solitary tumour 2 cm or less in greatest dimension with or without vascular invasion T1b Solitary tumour more than 2 cm in greatest dimension without vascular invasion T2 Solitary tumour with vascular invasion more than 2 cm dimension or multiple tumours, none more than 5 cm in greatest dimension T3 Multiple tumours any more than 5 cm in greatest dimension T4 Tumour(s) involving a major branch of the portal or hepatic vein with direct invasion of adjacent organs (including the diaphragm), other than the gallbladder or with perforation of visceral peritoneum</p>	<p>N – Regional Lymph Nodes</p> <p>NX Regional lymph nodes cannot be assessed N0 No regional lymph node metastasis N1 Regional lymph node metastasis</p> <p>M – Distant Metastasis</p> <p>M0 No distant metastasis M1 Distant metastasis</p> <p>pTNM Pathological Classification</p> <p>The pT and pN categories correspond to the T and N categories on page 8.</p> <p>pN0 Histological examination of a regional lymphadenectomy will ordinarily include 3 or more lymph nodes. If they are negative, but the number ordinarily examined is insufficient, classify as pN0.</p> <p>Stage – Liver</p> <table border="1"> <tr> <td>Stage IA</td> <td>T1a</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stage IB</td> <td>T1b</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stage II</td> <td>T2</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stage IIIA</td> <td>T3</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stage IIIB</td> <td>T4</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stage IVA</td> <td>Any T</td> <td>N1</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stage IVB</td> <td>Any T</td> <td>Any N</td> <td>M1</td> </tr> </table>	Stage IA	T1a	N0	M0	Stage IB	T1b	N0	M0	Stage II	T2	N0	M0	Stage IIIA	T3	N0	M0	Stage IIIB	T4	N0	M0	Stage IVA	Any T	N1	M0	Stage IVB	Any T	Any N	M1
Stage IA	T1a	N0	M0																										
Stage IB	T1b	N0	M0																										
Stage II	T2	N0	M0																										
Stage IIIA	T3	N0	M0																										
Stage IIIB	T4	N0	M0																										
Stage IVA	Any T	N1	M0																										
Stage IVB	Any T	Any N	M1																										

2.8 POTENZIALI INDICATORI: tempi di refertazione (tempo massimo in giorni lavorativi per il 90% dei referti, escluse eventuali metodiche di biologia molecolare)

- **Esame istologico su biopsia epatica: 10 giorni**
- **Esame istologico su pezzo operatorio: 20 giorni**