

CORRELAÇÃO DO NÍVEL DE ALFA-FETO PROTEÍNA, ÍNDICE DE SOBREVIDA E RECIDIVA TUMORAL EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE HEPÁTICO

Survival and tumor relapse rate according to alpha-fetoprotein level in patients submitted to liver transplantation

Elaine Cristina **ATAIDE**, Ricardo Rossetto **MACHADO**, Maxwell Boga Capsy **RIBEIRO**,
Thiago Jose Almeida Prado **MATTOSINHO**, Fernando Araujo **ROMANI**,
Cecilia Amelia Fazzio **ESCANHONELA**, Ilka de Fatima Santana Ferreira **BOIN**

Trabalho realizado na Unidade de Transplante Hepático do Hospital de Clínicas da Universidade de Campinas - Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

DESCRIPTORIOS - Carcinoma hepatocelular. Transplante de fígado. Recidiva. Sobrevida.

Correspondência:
Elaine Cristina Ataíde,
e-mail: elainebataide@yahoo.com.br

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 20/01/2011
Aceito para publicação: 25/01/2011

HEADINGS - Carcinoma, hepatocelular. Liver transplantation. Recurrence. Survivorship.

RESUMO – Racional - O transplante hepático para carcinoma hepatocelular pode resultar em potencial cura e melhora da sobrevida comparado com operações conservadoras. **Objetivo** - Analisar os índices de recorrência e sobrevida em pacientes transplantados hepáticos por carcinoma hepatocelular e com níveis séricos de alfa-fetoproteína maiores que 200 ng/ml. **Método** - Foram analisados retrospectivamente 90 pacientes cirróticos com carcinoma hepatocelular submetidos à transplante hepático ortotópico entre 1997 e 2009. As lesões hepáticas foram diagnosticadas no pré-operatório por ultrassonografia com Doppler, tomografia computadorizada e níveis séricos de alfa-fetoproteína. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o nível de alfa-fetoproteína (menor ou maior que 200 ng/ml. O método de Kaplan-Meier foi usado para calcular a taxa de sobrevida. A análise de regressão Cox estudou os fatores preditivos de sobrevida. **Resultados** - Pacientes com alfa-fetoproteína maior que 200 ng/ml (n=6) apresentaram menor taxa de sobrevida em um e cinco anos e na média de meses comparados com o grupo com alfa-fetoproteína menor que 200 ng/ml (n=84); respectivamente 35%, 18% e 11,8 meses contra 68%, 43% e 28,1 meses. Além disso, a taxa de recidiva foi 16,6% no primeiro grupo, e de 5,6% no outro. Observou-se risco de óbito de 1% para cada 10 u de alfa-fetoproteína >200 ng/ml e para cada mm da maior medida de tumor acima de 28 mm. **Conclusão** - Os pacientes com valores séricos de alfa-fetoproteína maiores que 200 ng/ml demonstraram menores taxas de sobrevida, porém não foi preditivo de recidiva tumoral.

ABSTRACT - Background - Liver transplantation for hepatocellular carcinoma (HCC) can result in a potential cure and greater survival than other less radical techniques. **Aim** - To analyze the survival and recurrence rate in liver transplant recipients with hepatocellular carcinoma and alpha-fetoprotein over 200 ng/ml. **Method** - Analysis, in this retrospective study, 90 cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma who underwent orthotopic liver transplantation between 1997 and 2009. Liver lesions were diagnosed by preoperative Doppler ultrasonography, abdominal computerized tomography and alpha-fetoprotein blood level. Two groups were studied according to alpha-fetoprotein level over or below 200 ng/ml. The Kaplan-Meier method was used to study survival rate. The Cox regression analysis was performed to study predictive factor to survival. **Results** - It was observed that risk of death was 1% for each 10 units of alpha-fetoprotein over 200 ng/ml and 1% for each mm over 28 mm (tumor size). In this sample average age, gender, presence of recidivism, vascular invasion, incidental tumor, Edmondson-Steiner grade and Milan criteria were similar when the two groups were submitted to multivariate analysis and the survival rate and the size of great nodule had a significant difference between the two groups. The survival rate was better for those patients with alpha-fetoprotein <200 ng/ml. **Conclusion** - Patients who had alpha-fetoprotein >200 showed worst survival and size of tumor was a predictive risk factor for mortality but this did not have influence in relationship to tumor recurrence

INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é descrito como a terceira causa de mortalidade por neoplasia no mundo, correspondendo a aproximadamente 500 mil mortes por ano^{11,13}. É caracterizado pela incidência elevada em pacientes portadores de hepatopatia crônica, sendo as causas virais as de maior impacto epidemiológico^{8,11,13}.

Sua incidência vem crescendo anualmente em países do ocidente como resultado do crescente aumento de pacientes portadores do vírus da hepatite C e B. Segundo estimativas epidemiológicas esta incidência tende a aumentar nas próximas duas décadas^{2,8,20}.

O tratamento cirúrgico é atualmente a melhor terapêutica para o tratamento do CHC em virtude da recorrência tumoral após o transplante hepático total (TOF) e vem se demonstrando como uma opção adequada em estádios precoces com potencial de cura e implemento da sobrevida^{14,20}.

A sobrevida de cinco anos em 75% dos casos é similar a de pacientes submetidos à transplante hepático sem CHC principalmente naqueles pacientes que se encontram dentro dos critérios de Milão (nódulo único menor que 5 cm no seu maior diâmetro ou até três nódulos de até 3 cm no seu maior diâmetro)¹⁸.

No entanto, índices de recorrência de CHC pós-transplante hepático variam de 3,5 a 26 % em diversos estudos realizados em grandes centros e vêm despertando atenção e cautela^{2,12,14,18,24}.

O risco de recorrência foi atrelado a algumas variáveis como: tamanho do nódulo à avaliação do explante, diferenciação histológica, presença de invasão macrovascular, microvascular e nível pré-operatório de alfa-feto-proteína (AFP). Essas variáveis são atualmente os melhores preditores de recorrência de CHC após o transplante hepático^{5,10,23,24}.

A dosagem de alfa-feto proteína, inicialmente descrita por Abelev, et al.¹ em 1963, é o mais difundido marcador tumoral empregado para rastreamento e seguimento do CHC ao redor do mundo. Vários estudos demonstraram que alfa-feto proteína elevada é fator de pior prognóstico em relação à agressividade da doença estando assim atrelada, em níveis elevados, à tumores de diâmetros maiores e invasão vascular. Nesses estudos o valor de corte associado à piora do prognóstico é de 200 ng/ml^{1,9,16,19}.

O objetivo deste estudo foi analisar os índices de recidiva e sobrevida em pacientes transplantados hepáticos por CHC e com níveis séricos de alfa-fetoproteína maiores que 200 ng/ml^{1,9,16,19,21}.

MÉTODO

Foram analisados 90 pacientes cirróticos com diagnóstico pré-operatório de CHC submetidos

à transplante hepático no Hospital de Clínicas da Unicamp, entre janeiro de 1997 e setembro de 2009.

O diagnóstico pré-operatório foi obtido de acordo com critérios estabelecidos pela EASL (European Association for Study of Liver) e AASLD (American Association for Study of Liver Disease). Foram utilizados tomografia de abdome, ultrassonografia com Doppler e/ou ressonância de abdome mostrando hipervascularização arterial e dosagem de alfa-feto proteína¹².

Todos os pacientes submetidos à intervenção cirúrgica apresentavam-se dentro dos critérios de Milão durante a inclusão em lista pré-transplante e avaliação pré-operatória.

Durante o tempo de espera em lista alguns pacientes foram submetidos a tratamento quimioterápico seletivo ou alcoolização quando necessário, mediante decisão de equipe multidisciplinar, de acordo com o estágio e localização do tumor.

Pacientes que no momento do diagnóstico se encontravam fora dos critérios de Milão foram submetidos a tratamento para "downstaging" (redução do tumor obtida por métodos alternativos terapêuticos como quimioembolização ou alcoolização) e posteriormente submetidos ao transplante, seguindo as leis vigentes no país.

Após o transplante todos os pacientes foram acompanhados através de dosagem de alfa-feto proteína e ultrassonografia de abdome a cada três meses até o final do primeiro ano e após a cada seis meses até o final do segundo ano. Em casos de suspeita de recidiva tumoral foram realizadas tomografia de abdome ou ressonância de abdome.

A avaliação da função hepática foi obtida através do score MELD (Model for End-stage Liver Disease)⁶. Pacientes transplantados anteriormente a 2005 tiveram sua função hepática calculada retroativamente.

As variáveis estudadas foram: idade (anos), sexo (masculino ou feminino), nível sanguíneo de alfa-fetoproteína acima ou abaixo de 200 ng/ml, tamanho do tumor (em mm), número de nódulos, estágio histológico segundo Edmondson-Steiner (grau I, II, III), presença de invasão macrovascular e microvascular observados no explante; estar ou não dentro do critério de Milão após avaliação do explante, presença de tumor incidental ou não, ter apresentado recidiva ou não; sobrevida e presença de recidiva tumoral ao final do primeiro e quinto ano.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Statistica 7.5/2007-Softstat-Chicago/USA. Foi utilizada análise descritiva para observação da frequência e das médias. A comparação dos grupos com e sem AFP maior que 200 ng/ml foi feita utilizando-se o teste de Wilcoxon. A sobrevida compreendendo o período entre a intervenção cirúrgica e a última visita foi calculada utilizando-se o método estimativo de sobrevida de Kaplan-Meyer e os fatores prognósticos para recorrência foram avaliados utilizando-se o teste de regressão de Cox.

RESULTADOS

Foram avaliados 90 pacientes cirróticos transplantados com diagnóstico pré-operatório de CHC sendo 72 pacientes do sexo masculino (80%) e 18 do feminino (20%).

A média de idade no momento do transplante foi de 52,3 anos (33-68 anos).

Como causa encontrou-se a hepatopatia por vírus C em 54% dos pacientes, seguida por álcool em 22%, vírus B em 19% dos casos e 5% nas demais causas.

A média de seguimento foi de 42 meses; a média dos níveis de alfa-feto proteína foi de 42,3ng/ml e a média do tamanho dos nódulos em seu maior diâmetros foi de 32 mm.

Os pacientes apresentaram resultados de escore MELD e níveis de imunossuppressores semelhantes independente do nível de AFP.

O tratamento pré-operatório com quimio-embolização para "downstaging" foi realizado em 13 pacientes sendo que nenhum deles apresentou recidiva tumoral.

A recorrência de CHC pós transplante foi encontrada em seis pacientes (6,7%) com média de tempo de nove meses entre a intervenção cirúrgica e o diagnóstico de recidiva.

Embora 72% dos pacientes estivessem dentro dos critérios de Milão na observação do explante, apenas três (dos seis com recidiva) pacientes extrapolavam esses critérios após avaliação do fígado explantado; 39,2% dos pacientes com AFP <200 ng/ml extrapolaram estes critérios geralmente devido ao número de nódulos tumorais observados. Notou-se também que 2% apresentavam invasão macrovascular e 18% microvascular, lesões estas não observadas nos exames de imagens anteriores ao transplante.

Os sítios de recorrência tumoral foram: fígado em três pacientes, pulmão em um e múltiplos sítios (pulmão, cérebro, fígado e ossos) em outro paciente.

Em todos os casos o tratamento da recorrência consistiu em mudança da imunossupressão de inibidor de calcineurina para sirolimus e em um paciente foi associado o quimioterápico Sorafenibe^R.

Na Tabela 1 podem ser observadas as médias e frequência das variáveis estudadas. Observa-se também que apenas seis (6,7%) apresentavam AFP acima de 200 ng/ml, não havendo diferença estatística em relação ao aparecimento de recidiva.

Apenas um paciente, com diagnóstico de recidiva pós-transplante, apresentou AFP superior a 200 ng/ml e a média de AFP entre esses pacientes foi de 64,58 ng/ml.

O teste de regressão COX evidenciou que o nível de AFP e tamanho do tumor puderam ser considerados como fator independente de risco para sobrevida (risco de óbito de 1% para cada 10u de AFP acima de 200 ng/ml - $p=0,002$; HR=0,0178 - IC 95% = 0,0096-0,356) e 1% de risco de mortalidade para cada mm de tumor

acima de 28 mm ($p=0,04$; HR=0,0169 - IC95%=0,0094-0,299) (Figura 1).

TABELA 1 – Características da amostra estudada de acordo com o nível sanguíneo de alfa-fetoproteína (AFP) em pacientes submetidos a transplante de fígado por carcinoma hepatocelular.

AFP	> 200 ng/ml	< 200 ng/ml
Pacientes	6 (6,7%)	84(93,3%)
Idade (anos)	55,3	50,5
Sexo (feminino /masculino)	1,1% / 83,3%	17,9% / 82,1%
Recidiva (s/n)	16,6% / 83,3 %	5,6% / 94,4%
Invasão vascular(s/n)	16,6% / 83,3%	21,4% / 78,6%
Crterios de Milão (s/n)	50% / 50%	39,2% / 60,7%
Tumor incidental (s/n)	0 / 100 %	44,0 % / 64,0%
Estadio (I /II / III)	0 / 100% / 0	6,0% / 50% / 44%
Tamanho do nódulo (mm)	31,6 (12-50)	12,3 (1- 60)
Sobrevida 1.o ano	35%	68%
Sobrevida 5.o ano	18%	43%*
Recorrência tumoral	16,6%	5,6% (P=0,054)
Média da sobrevida (meses)	11,8	28,1 *

*= $p<0,05$; mm = milímetros; S=sim; N=não

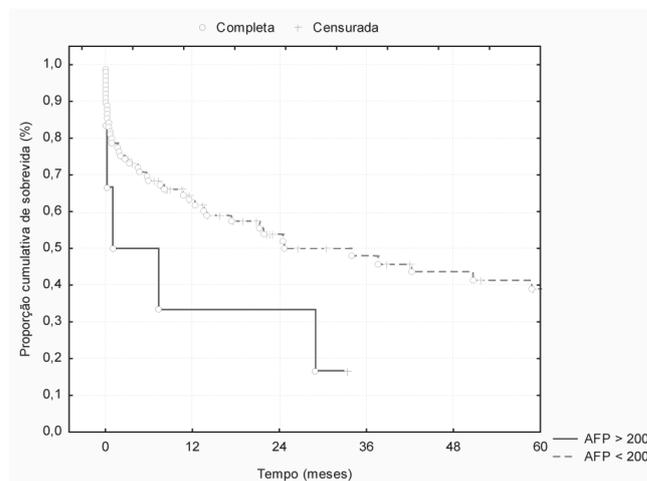


FIGURA 1 – Sobrevida cumulativa em pacientes submetidos a transplante de fígado por carcinoma hepatocelular de acordo com o nível de alfa-fetoproteína (AFP) maior ou menor que 200 ng/ml.

DISCUSSÃO

Alfa-feto proteína caracteriza-se por ser uma glicoproteína fetal associada a crescimento tumoral. Fisiologicamente é uma proteína sintetizada e secretada por hepatócitos fetais, células do trato gastrointestinal e células germinativas, seu nível sérico diminui gradativamente após o nascimento até o primeiro ano de vida quando se mantém estável normalmente abaixo de 10 ng/ml^{1,9,16,19,21}.

AFP vem sendo utilizada amplamente na literatura como marcador tumoral há aproximadamente 40

anos, sedimentando a participação desse marcador na regulação e crescimento de oncogenes, havendo evidência de seu papel promovendo crescimento de hepatócitos^{1,9,16,19,21}. O carcinoma hepatocelular com nível elevado de AFP tem se caracterizado por maior atividade proliferativa celular medida por Ki-67^{1,9,16,19,21}.

No entanto, recentemente estudos vêm definindo a AFP paulatinamente como um marcador com especificidade e sensibilidade deficientes com taxas aproximadas a 60% de sensibilidade e 70% de especificidade suscitando vários esforços em diversos centros em busca de melhores marcadores^{4,12,17,22}. A razão para a baixa sensibilidade e especificidade encontradas vem sendo atribuída ao avanço dos métodos de imagem que hoje conseguem diagnosticar tumores menores dos quais encontrados no passado, normalmente associados a níveis de AFP dentro da normalidade^{9,16}.

Em estudo com 170 pacientes com diagnóstico de CHC, Trevisani, et al.²⁵ demonstraram, mesmo estabelecendo valor de corte de AFP de 200 ng/ml caracterizado por ser o melhor valor no estudo citado, a sensibilidade não ultrapassou de 60%, o que significa 40% de falsos negativos²⁵.

Na ausência de malignidade, o nível de AFP pode aparecer elevado em casos de replicação pelo vírus da hepatite B e C^{7,15}, agentes estes comumente correlacionados à hepatopatia crônica predisponente ao aparecimento de CHC o que pode muitas vezes dificultar a especificidade do método.

Além disso, o nível de AFP pode também aparecer elevado em tumores gastrointestinais que não o CHC, como por exemplo o colangiocarcinoma. Esse fato tem grande relevância visto que o colangiocarcinoma apresenta tratamento e prognóstico diferente ao CHC principalmente no que diz respeito à indicação de transplante hepático⁷.

A indicação de transplante hepático para pacientes cirróticos com diagnóstico de CHC vem se apresentando como uma boa alternativa terapêutica, com sobrevida semelhante ao transplante realizado por outras causas^{2,14,18,20}. No entanto, o índice de recidiva tumoral pós-transplante varia de 3,5% a 26% em alguns estudos^{4,5,10,12,14,23,24} e vem suscitando a necessidade de métodos preditivos de pior recorrência.

O índice de recidiva aqui obtido foi de 5,6%, compatível com a literatura^{3,6,12}.

Entre as variáveis atreladas à piora do índice de recorrência, foi dada principal ênfase à alfa-feto proteína. Para isso, foram estudados índices mediante um corte de alfa-fetoproteína de 200 ng/ml que de acordo com a literatura demonstra ser um fator de pior prognóstico^{1,3,9,16,19,21}.

O presente estudo, com pacientes divididos em dois grupos, AFP acima de 200 ng/ml e AFP menor que 200 ng/ml, confirma esse achado, nos quais os pacientes do primeiro grupo apresentam menor

sobrevida global e menor sobrevida no primeiro e quinto ano pós-transplante.

Neste estudo, avaliando fatores já definidos na literatura como de pior prognóstico como estágio da doença, diferenciação celular, invasão vascular, critérios de Milão e presença de tumor incidental^{5,10,23,24}, não houve diferença estatística entre os grupos com AFP maior ou menor que 200 ng/ml exceto pelo tamanho do nódulo em seu maior diâmetro.

A associação com maior diâmetro pode estar associada à característica de promoção de maior atividade celular da AFP, no entanto, não houve correlação com piora do grau de diferenciação celular^{1,9,16,19,21}.

Não houve também diferença estatística entre os dois grupos em relação à recidiva tumoral, apenas um paciente com recidiva apresentava AFP superior a 200 ng/ml, levando a corroborar a literatura em se encontrar novos métodos mais específicos e sensíveis para predição da recorrência^{4,5,7,10,12,15,17,22,23,24,25}. Observou-se risco de óbito de 1% para cada 10 u de alfa-fetoproteína >200ng/ml e para cada mm da maior medida de tumor acima de 28mm.

A alfa-feto proteína acima de 200 ng/ml apenas foi observada em 6,7% dos pacientes mostrando pouca acurácia no diagnóstico, conforme referendado por diferentes autores^{4,7,12,15,17,22,25}.

CONCLUSÃO

Os fatores de risco associados a pior prognóstico foram AFP e o tamanho do tumor. A dosagem de AFP mostrou ser um marcador precário e novos biomarcadores tumorais devem ser investigados.

REFERÊNCIAS

1. Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, Postnikova ZA, Irlin IS. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatoma. *Transplantation*. 1963 Apr;1:174-80.
2. Bruix J, Llovet JM. Major achievements in hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2009 Feb 21;373(9664):614-6..
3. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*. 2001 Sep;35(3):421-30..
4. Cescon M, Ravaioli M, Grazi GL, Ercolani G, Cucchetti A, Bertuzzo V, Vetrone G, Del Gaudio M, Vivarelli M, D'Errico-Grigioni A, Dazzi A, Di Gioia P, Lauro A, Pinna AD. Prognostic factors for tumor recurrence after a 12-year, single-center experience of liver transplantations in patients with hepatocellular carcinoma. *J Transplant*. 2010; 2010. pii: 904152.
5. De Carlis L, Giacomoni A, Lauterio A, Slim A, Sammartino C, Pirota V, Colella G, Forti D. Liver transplantation for hepatocellular cancer: should the current indication criteria be changed? *Transpl Int*. 2003 Feb;16(2):115-22.
6. Delis S, Biliatis I, Athanasiou K, Dervenis C. Model for end-stage liver disease (MELD) score as a prognostic factor for postoperative morbidity and mortality in cirrhotic patients undergoing hepatectomy for HCC. *Gut* 2006; 55(Suppl V):A 153

7. Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, Everhart JE, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Wright EC, Everson GT, Lindsay KL, Lok AS, Lee WM, Morgan TR, Ghany MG, Gretch DR; HALT-C Trial Group. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol.* 2005;43(3):434-41.
8. El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med.* 1999 Mar 11;340(10):745-50.
9. Forner A, Reig M, Bruix J. Alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis: the demise of a brilliant star. *Gastroenterology.* 2009 Jul;137(1):26-9.
10. Herrero JI, Sangro B, Quiroga J, Pardo F, Herraiz M, Cienfuegos JA, Prieto J. Influence of tumor characteristics on the outcome of liver transplantation among patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2001 Jul;7(7):631-6.
11. Ishak KG, Anthony PP, Sobin LH. Histological typing of tumours in the liver. WHO International Histological Classification of Tumours. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 1994.
12. Jonas S, Bechstein WO, Steinmüller T, Herrmann M, Radke C, Berg T, Settmacher U, Neuhaus P. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology.* 2001 May;33(5):1080-6.
13. Llovet J. Hepatocellular carcinoma. *M, Burroughs A, Bruix J. Lancet.* 2003 Dec 6;362(9399):1907-17.
14. Llovet JM, Bruix J, Fuster J, Castells A, Garcia-Valdecasas JC, Grande L, Franca A, Brú C, Navasa M, Ayuso MC, Solé M, Real MI, Vilana R, Rimola A, Visa J, Rodés J. Liver transplantation for treatment of small hepatocellular carcinoma: the TNM classification does not have prognostic power. *Hepatology* 1998; 27:6: 1572.
15. Lok AS, Lai CL. alpha-Fetoprotein monitoring in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection: role in the early detection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1989 9(1):110-5.
16. Margarit C, Charco R, Hidalgo E, Allende H, Castells L, Bilbao I. Liver transplantation for malignant diseases: selection and pattern of recurrence. *World J Surg.* 2002 Feb;26(2):257-63
17. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Roayaie S, Schwartz ME, Grazi GL, Adam R, Neuhaus P, Salizzoni M, Bruix J, Forner A, De Carlis L, Cillo U, Burroughs AK, Troisi R, Rossi M, Gerunda GE, Lerut J, Belghiti J, Boin I, Gugenheim J, Rochling F, Van Hoek B, Majno P. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol.* 2009 Jan;10(1):35-43.
18. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996 Mar 14;334(11):693-9.
19. Nomura F, Ohnishi K, Tanabe Y. Clinical features and prognosis of hepatocellular carcinoma with reference to serum alpha-fetoprotein levels. Analysis of 606 patients. *Cancer.* 1989 Oct 15;64(8):1700-7.
20. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
21. Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC. High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and beta-catenin mutations. *Int J Cancer.* 2004 Oct 20;112(1):44-50.
22. Ravaioli M, Grazi GL, Piscaglia F, Trevisani F, Cescon M, Ercolani G, Vivarelli M, Golfieri R, D'Errico Grigioni A, Panzini I, Morelli C, Bernardi M, Bolondi L, Pinna AD. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: results of down-staging in patients initially outside the Milan selection criteria. *Am J Transplant.* 2008 Dec;8(12):2547-57.
23. Shetty K, Timmins K, Bressinger C, Furth EE, Rattan S, Sun W, Rosen M, Soulen M, Shaked A, Reddy KR, Olthoff KM. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma validation of present selection criteria in predicting outcome. *Liver Transpl.* 2004 Jul;10(7):911-8.
24. Tamura S, Kato T, Berho M, Misiakos EP, O'Brien C, Reddy KR, Nery JR, Burke GW, Schiff ER, Miller J, Tzakis AG. Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation. *Arch Surg.* 2001 Jan;136(1):25-30.
25. Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, Mazzella G, Accogli E, Caraceni P, Domenicali M, De Notariis S, Roda E, Bernardi M. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol.* 2001 Apr; 34(4):570-5.