

ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITA' DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA

TRAPIANTO DI FEGATO: IMMUNOLOGIA CLINICA E DI BASE ED

IMMUNODEPRESSIONE

XIX CICLO – S.S.D. MED 18/CHIRURGIA GENERALE

TESI DI DOTTORATO

**UTILIZZO DELLA RAPAMICINA COME FARMACO
IMMUNOSOPPRESSORE IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A
TRAPIANTO DI FEGATO PER EPATOCARCINOMA**

DOTT. MATTEO CESCONE

Coordinatore del corso

Chiar.mo Prof. Roberto Bellusci

Relatore

Chiar.mo Prof. Gian Luca Grazi

ANNO ACCADEMICO 2006/2007

INDICE

Introduzione.....	3
- Sirolimus.....	4
- Scopo dello studio.....	12
Pazienti e metodi.....	13
- Indagini pre-operatorie.....	13
- Trattamenti pre-operatori.....	14
- Trattamenti post-operatori.....	14
- Analisi istologica del tumore.....	14
- Immunosoppressione.....	15
- Variabili analizzate ed obiettivi dello studio.....	16
- Valutazione statistica.....	17
- Caratteristiche della popolazione di studio e del gruppo di controllo..	18
Risultati.....	23
- Analisi dei fattori di rischio di recidiva dell'HCC.....	30
Discussione.....	33
Bibliografia	36

INTRODUZIONE

Il trapianto di fegato per epatocarcinoma (HCC) conduce ad ottimi risultati in termini di sopravvivenza globale del paziente e sopravvivenza libera da recidiva se eseguito secondo criteri ben definiti, i cosiddetti criteri di Milano (1). Nonostante il rispetto di tali principi, la recidiva dell'HCC è un rischio sempre presente, in particolare nei casi abbastanza frequenti in cui l'esame istologico del fegato nativo asportato evidenzia una neoplasia ad uno stadio più avanzato rispetto a quanto descritto dalle indagini strumentali preoperatorie (2). I fattori maggiormente correlati alla recidiva, escluse le dimensioni ed il numero dei noduli per i quali, come detto, si è da ormai dieci anni giunti ad una chiara definizione, sono l'elevato livello di alfa-fetoproteina (α -FP) preoperatoria, il basso grado di differenziazione e la presenza di invasione microvascolare (3-8).

Il nostro gruppo ha recentemente evidenziato l'importanza di elevati livelli di immunosoppressione nell'innalzare il rischio di recidiva in serie di pazienti sottoposti a trapianti di fegato ed immunosoppressi con ciclosporina (CsA) (9-10).

Al momento, poco si conosce sugli effetti cancerogeni dei principali agenti immunosoppressivi utilizzati per la prevenzione del rigetto negli allotrapianti.

L'osservazione clinica dell'aumento di incidenza del cancro nei pazienti sottoposti a trapianto ha contribuito a creare il dogma che gli agenti immunosoppressivi sono in genere cancerogeni o perlomeno aumentano il rischio neoplastico.

Gli studi clinici sui trapianti suggeriscono che la CsA possa determinare un aumento dell'incidenza di tumore. La CsA utilizzata per altre malattie, ad esempio per la cura della psoriasi, è associata ad un alto rischio di tumori cutanei (11). Questa associazione

è sostenuta da dati sperimentali che dimostrano che la CsA favorisce la crescita delle cellule tumorali (12) ed inibisce i meccanismi di riparazione del DNA (13). E' stato inoltre dimostrato che la CsA favorisce l'angiogenesi nei tumori in fase di sviluppo, facilitandone la crescita (14). Studi sperimentali recenti dimostrano inoltre una maggiore proliferazione di cellule di HCC umane in presenza di tacrolimus (15).

Alcuni agenti immunosoppressivi non promuovono la crescita del tumore, ma al contrario possono svolgere attività antineoplastiche. In particolare è stato verificato che dosi immunosoppressive di rapamune hanno potenti proprietà antiangiogeniche che inibiscono la crescita tumorale (14). Quest'azione antiangiogenica è dovuta all'inibizione del *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (15). Oltre ad inibire l'angiogenesi, il rapamune inibisce direttamente la crescita delle cellule tumorali bloccando il ciclo cellulare ed aumentando l'espressione di E-caderina. L'HCC, in particolare, sembra essere particolarmente sensibile all'azione del rapamune.

Uno studio pilota di Kneteman et al. ha dimostrato che il passaggio da immunosoppressione con inibitori della calcineurina a sirolimus in pazienti trapiantati per HCC ad alto rischio (ovvero oltre i criteri di Milano) può condurre ad un tasso di recidiva (10.3%) e di sopravvivenza (79%) simile a quello dei pazienti con HCC a rischio convenzionale e nettamente migliore rispetto ai dati attesi nei gruppi storici di pazienti ad alto rischio (16).

Sirolimus (Rapamicina)

Il sirolimus è un lattone macrociclico caratterizzato da potente attività antiproliferativa ed immunosoppressiva. Questo farmaco blocca l'attivazione dei linfociti T ad uno

stadio più avanzato rispetto a quello degli inibitori della calcineurina (CsA e tacrolimus), inattivando l'enzima *Mammalian Target Of Rapamicine* (m-TOR) ed inibendo i segnali mediati dall'interleuchina 2 (IL-2), con arresto del ciclo cellulare in fase G1 (17, 18). Una raffigurazione schematica dei meccanismi d'azione degli inibitori della calcineurina e della rapamicina è riportato nella figura 1.

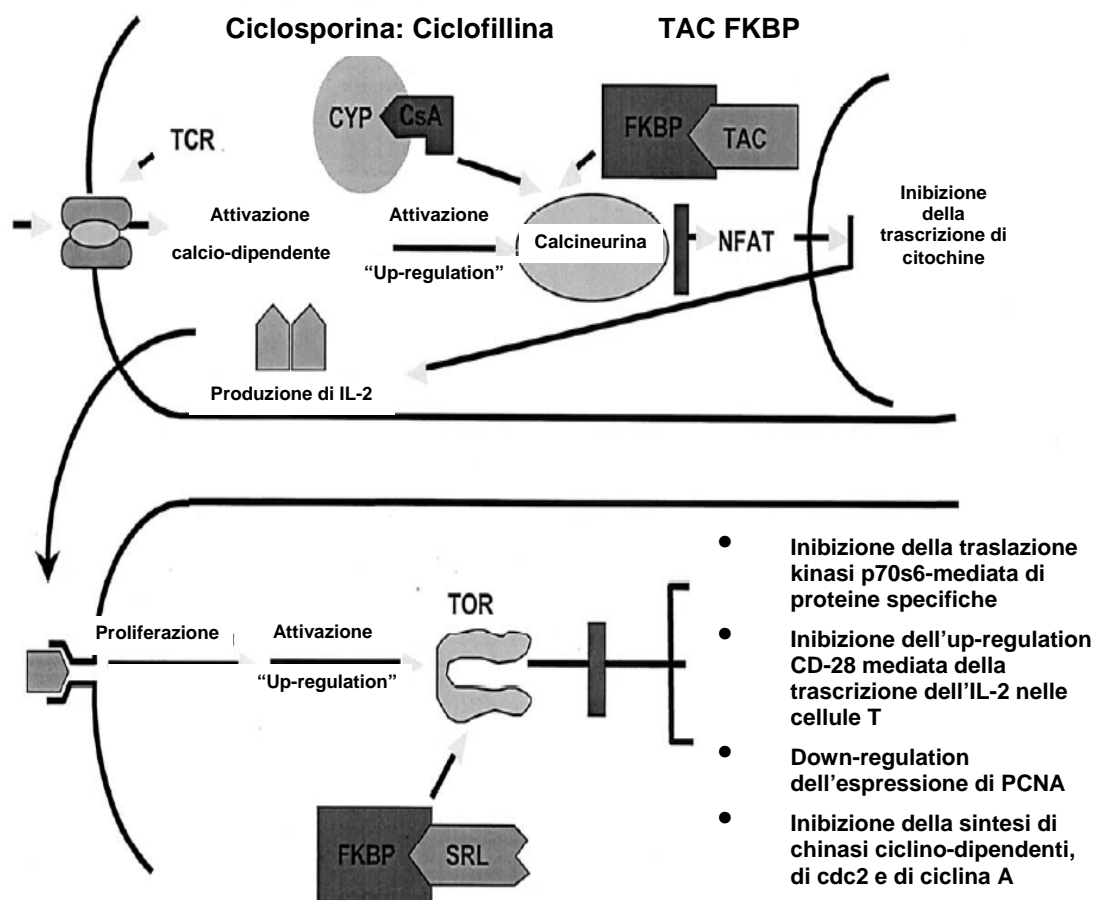


Figura 1 – Meccanismo d'azione di ciclosporina (CyA), tacrolimus (TAC) e sirolimus (SRL). I complessi CyA-ciclofillina (CYP) e TAC-FK binding protein 12 (FKBP) interagiscono con la calcineurina, una fosfatasi calmodulina-calcio-dipendente

necessaria per defosforilare il fattore nucleare di attivazione delle cellule T NFAT. La defosforilazione induce la traslocazione dell'NFAT nel nucleo e di conseguenza l'iniziazione della trascrizione di IL-2. L'inattivazione della calcineurina blocca la trascrizione delle interleuchine. Il complesso SRL-FKBP non ha effetto sulla calcineurina, ma blocca l'attivazione dell'm-TOR, una chinasi con un ruolo centrale nel ciclo replicativo cellulare, che viene bloccato nella fase G1. Da: Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transpl Proc* 2003; 35 (Suppl 3A): 7S-14S.

L'utilizzo di inibitori dell'm-TOR è anche associato ad un ridotta attività fibroblastica (19), che potrebbe interferire con la cicatrizzazione in vari tessuti (20-22).

Il sirolimus è approvato, anche in Italia, per la profilassi del rigetto acuto nell'allogranto di rene. L'efficacia del sirolimus in associazione con CsA e prednisone è stata dimostrata in due trial clinici multicentrici randomizzati controllati, di fase III, in doppio cieco (Studi Wyeth 301 e 302), che sono stati alla base della prima approvazione del prodotto. Il primo studio (Studio Wyeth 301) paragonava l'efficacia di due diversi dosaggi di sirolimus (2 e 5 mg/die) con l'azatioprina (AZA) usata come comparatore attivo. Il secondo studio (Studio Wyeth 302) paragonava l'efficacia delle stesse due dosi di sirolimus e nei confronti del placebo. Le percentuali di fallimento erano statisticamente più basse per entrambi i gruppi trattati con sirolimus nei due studi. Nel primo studio (Studio Wyeth 301) il tasso di fallimento a 6 mesi risultava diminuito dal 32.3% con l'utilizzo di AZA al 18.7% ed al 16.8% rispettivamente con le dosi di 2 e 5 mg di sirolimus. Nel secondo studio, il tasso di fallimento era del 47.7%, del 30% e del 25,8% rispettivamente nei gruppi che utilizzavano il placebo, 2 mg di sirolimus o 5

mg di sirolimus. La sopravvivenza a 1 anno del paziente e del graft erano simili nei tre gruppi di trattamento.

In un altro studio Wyeth (Studio 310, randomizzato ed in aperto) usando la formulazione in compresse, venivano comparate le percentuali di sopravvivenza a 12 mesi con graft funzionante di pazienti trapiantati di rene e sottoposti a trattamento continuativo con CsA e dosi fisse di sirolimus (gruppo A) vs. induzione con CsA e sirolimus, seguita da eliminazione della CsA e mantenimento del sirolimus a concentrazioni controllate (Gruppo B).

Questo studio era anche concepito per comparare l'incidenza del rigetto acuto a 6 e 12 mesi e la sopravvivenza del paziente e del graft a 24, 36, 48 e 60 mesi dal trapianto. Erano oggetto di comparazione anche la funzione renale a 6, 12, 24, 36, 48 e 60 mesi e l'incidenza di rigetto cronico a 12 e 36 mesi dal trapianto. Venivano infine paragonate la qualità di vita entro 36 mesi dal trapianto nei diversi gruppi di trattamento.

Considerando i 525 pazienti coinvolti nello studio, la sopravvivenza complessiva del graft a 12, 24 e 36 mesi dal trapianto era rispettivamente dell'89.1%, dell'85.6% e dell'80.4%.

Si ottenevano percentuali simili di sopravvivenza del graft a 12 mesi dal trapianto nei pazienti dei gruppi A (95.8%) e B (97.2%). La sopravvivenza del graft risultava equivalente tra i gruppi di trattamento A e B anche dopo 24 mesi (rispettivamente 91.2% e 93.5%) e 36 mesi (85.1% e 91.2%) . Le percentuali totali di sopravvivenza dei pazienti dopo 12, 24 e 36 mesi erano rispettivamente del 94.9%, 91.2% e 87.2%. Non vi erano differenze significative nelle percentuali di sopravvivenza dei pazienti tra i gruppi di trattamento B ed A dopo 12, 24 o 36 mesi di studio. L'incidenza di rigetto acuto confermato da biopsia era del 18.3% sia a 12 che a 24 mesi di trattamento. L'incidenza

totale del rigetto acuto nell'intera popolazione di studio dopo 12, 24 e 36 mesi era rispettivamente del 20.2%, 21% e 21.3%. Il tasso cumulativo di primo rigetto acuto confermato da biopsia non differiva in maniera significativa tra i gruppi di trattamento a 12, 24 e 36 mesi dal trapianto.

La funzione renale e la pressione sanguigna a 36 mesi erano significativamente migliori nei pazienti con sospensione precoce di CsA (gruppo B). Inoltre, basandosi su dati successivi ai 36 mesi, la sopravvivenza del graft diveniva ancora migliore nel gruppo trattato col sospensione della CsA nei confronti del gruppo con trattamento continuativo con CsA. Sulla base di questi dati, la Wyeth ha ritenuto opportuno interrompere la sperimentazione nei pazienti del gruppo A.

Un trial di fase III (Studio 309) paragonava una soluzione orale di sirolimus alla formulazione in compresse, somministrate in associazione a CsA e corticosteroidi in pazienti sottoposti ad allotrapianto di rene. Il tasso complessivo di fallimento del trapianto a 6 mesi era equivalente dei due gruppi (compresse: 27.2%; soluzione orale: 26.1%).

Una sperimentazione fase II su trapianto del rene (Studio 207) paragonava un'immunosoppressione basata rispettivamente sul sirolimus a concentrazioni controllate e su CsA, entrambe in associazione ad AZA e prednisone. L'incidenza ad 1 anno del rigetto acuto era simile nei due gruppi (41.5% con sirolimus vs. 38.5% con CsA, rispettivamente).

Valori di creatininemia significativamente inferiori ($p=0.033$) a 3 mesi dal trapianto venivano rilevati nel gruppo trattato con sirolimus rispetto al gruppo trattato con CsA. Ad 1 anno, il valore medio di della creatininemia era di 114.9 $\mu\text{mol/L}$ (1.3 mg/dL) nel primo gruppo e di 132.6 $\mu\text{mol/L}$ (1.5 mg/dL) nel secondo.

I principali trial che hanno condotto all'approvazione di sirolimus nel trapianto di rene hanno delineato anche la tossicità di tale farmaco, che include leucopenia, trombocitopenia, anemia, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia, disturbi gastrointestinali, dolori articolari, edemi, linfoceli, infezioni delle ferite chirurgiche, ulcere orali (23-25). Uno dei principali effetti collaterali riguarda i problemi di guarigione delle ferite; questo effetto sarebbe legato alle proprietà antiangiogeniche del sirolimus.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati i risultati di varie sperimentazioni incentrate sull'uso del sirolimus in combinazione con basse dosi di tacrolimus o di CsA microemulsione come terapia de novo, terapia "rescue" od in caso di controindicazioni all'utilizzo di inibitori di calcineurina nell'immunosoppressione primaria nel trapianto di fegato. Nonostante l'attuale mancanza di dati a lungo termine, i trattamenti immunosoppressivi a base di sirolimus nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato hanno condotto a risultati iniziali simili a quelli di protocolli standard includenti tacrolimus o CsA in microemulsione.

Due studi multicentrici di fase II/III hanno comparato inibitori di calcineurina e steroidi con rapamicina, inibitori di calcineurina e steroidi nel trapianto di fegato. Lo Studio Wyeth 211 ha esaminato l'efficacia e la sicurezza di rapamicina + CsA + steroidi nei confronti di tacrolimus + steroidi. Il tasso di fallimento a 60 giorni è stato del 39% nel primo gruppo vs. 48% nel secondo, con corrispondente incidenza di rigetto acuto del 30% e del 50%. La sopravvivenza del graft a 6 mesi è stata dell'85% nel primo gruppo e del 90% nel secondo, mentre quella del paziente è stata del 90% nel primo e del 92% nel secondo (26).

Un successivo studio randomizzato di fase II/III ha comparato un protocollo immunosoppressivo con rapamicina + dose ridotte di tacrolimus + steroidi con un protocollo costituito da tacrolimus + steroidi (Studio Wyeth 220) (27). E' stata osservata un'incidenza ridotta di rigetto acuto nel primo gruppo, ma una incidenza più elevata di perdita del graft a 30 giorni, con 6 casi di trombosi dell'arteria epatica nel primo e solo 1 nel secondo gruppo. Anche se l'incidenza di trombosi dell'arteria epatica non differiva significativamente dal dato storico del 4% e solo tre casi sono stati giudicati come potenzialmente collegati all'utilizzo di rapamicina, lo studio è stato interrotto.

Diversi studi monocentrici hanno descritto l'utilizzo clinico della rapamicina nel trapianto di fegato. In uno di questi, comprendente 56 pazienti, il livello ematico "target" di rapamicina era 7 ng/ml, mentre quello di tacrolimus era 5 ng/ml. Si sono osservati tassi di rigetto molto bassi (14%), con una sopravvivenza complessiva del 93% ad un follow-up mediano di 23 mesi, con un solo caso di trombosi dell'arteria epatica ed il 12% di complicanze a carico della ferita chirurgica (28).

In un altro studio sono stati comparati 170 pazienti trattati con rapamicina e basse dosi di inibitori di calcineurina (senza steroidi) con 180 pazienti di un gruppo di controllo storico. E' stata osservata una riduzione dell'incidenza di rigetto acuto nel primo gruppo, mentre l'incidenza di trombosi dell'arteria epatica è stata del 5,3% nel primo vs. 8,3% nel secondo gruppo (29). In generale, le più recenti esperienze di utilizzo della rapamicina nel trapianto di fegato non hanno confermato il dato di una maggior incidenza di complicanze vascolari nei pazienti trattati con tale farmaco.

Uno dei maggiori benefici degli inibitori dell'm-TOR è l'assenza di nefrotossicità. Molti studi hanno esaminato l'impatto della conversione dei pazienti con insufficienza renale cronica a diversi mesi dal trapianto dall'immunosoppressione standard con

inibitori di calcineurina a rapamicina. Fairbanks e colleghi hanno descritto l'outcome di 21 riceventi convertiti da inibitori di calcineurina a rapamicina ad una media di 6 anni dopo il trapianto di fegato. Ad un follow-up di 1 anno, il 71% dei pazienti hanno evidenziato un aumento della filtrazione glomerulare (30).

La questione dell'inibitore della calcineurina più indicato per l'abbinamento con sirolimus è stata sollevata da Trotter (20), il quale ha rilevato che una normale creatinina sierica era presente solo nel 6% dei pazienti trattati contemporaneamente con CsA rispetto al 67% di quelli trattati con tacrolimus. Le cause più probabili di questa accresciuta nefrotossicità sono un'aumentata concentrazione intrarenale di CsA e/o un'interazione tra CsA e rapamicina, con aumentata esposizione a CsA per un'inibizione competitiva dell'attività del citocromo P450.

In generale, nei protocolli di terapia combinati gli effetti collaterali legati agli inibitori di calcineurina possono essere ridotti grazie al mantenimento di bassi livelli ematici degli stessi inibitori di calcineurina (tacrolimus 5-7 ng/mL; CsA 100 ng/mL).

Non esistono ad oggi studi clinici che dimostrino un impatto del sirolimus sulla recidiva dell'epatite C nei pazienti HCV-positivi sottoposti a trapianto di fegato. E' stato tuttavia dimostrato che la rapamicina inibisce la proliferazione delle cellule stellate epatiche con limitazione della fibrogenesi (31). Questo dato supporterebbe l'utilizzo degli inibitori dell'm-TOR per ridurre la progressione della fibrosi nei pazienti trapiantati per epatopatia cronica HCV-relata.

Scopo dello studio

La rapamicina è stata per la prima volta introdotta nella pratica clinica del Centro Trapianti di Bologna nel 2003. La principale indicazione al suo utilizzo è stata la comparsa di effetti collaterali indotti dagli inibitori della calcineurina.

L'oggetto del presente studio è la valutazione retrospettiva della sicurezza e dell'efficacia del sirolimus nei pazienti trapiantati per HCC dal 2003 al 2006.

PAZIENTI E METODI

Dal gennaio 2003 al maggio 2006, 97 pazienti sono stati sottoposti a trapianto ortotopico di fegato (OLT) presso il Centro Trapianti di Bologna con indicazione data da HCC e conferma della presenza di HCC all'esame istologico del fegato nativo espiantato. La popolazione in oggetto comprendeva 84 uomini (87%) e 13 (13%) donne. L'età media al momento del trapianto era di 56 ± 7 (38 – 67) anni.

Indagini pre-operatorie

Tutti i pazienti inseriti in lista d'attesa per trapianto sono stati sottoposti a tomografia computerizzata (TC), ecografia addominale, scintigrafia ossea e, in alcuni casi, a risonanza magnetica (RM) e/o ad arteriografia selettiva del tripode celiaco e dell'arteria mesenterica superiore. In tutti i casi è stato ottenuto un livello ematico di α -FP. Una biopsia delle lesioni sospette per HCC è stata eseguita solo qualora persistessero dubbi sulla natura dei noduli.

L'inserimento in lista d'attesa per trapianto è stato vincolato al rispetto dei criteri di Milano (1). Secondo un protocollo definito di “down-staging”, approvato all'interno del Centro Trapianti di Bologna, pazienti di età non superiore ai 65 anni, inizialmente al di fuori dei criteri di Milano, che presentassero un nodulo di HCC di diametro ≤ 8 cm, o fino a due noduli, il maggior dei quali ≤ 5 cm, o fino a 5 noduli, il maggiore dei quali < 4 cm, senza infiltrazione vascolare o biliare macroscopica, e che fossero rientrati all'interno dei criteri di Milano dopo procedure ablative percutanee,

chemioembolizzazione o resezione epatica, sono stati ugualmente inseriti in lista d'attesa per trapianto.

Un'ecografia epatica ed eventualmente una TC od una RM, insieme al livello ematico di α -FP, sono stati eseguiti ogni tre mesi durante il tempo d'attesa in lista. La diagnosi di recidiva di HCC è stata confermata con le stesse tecniche di imaging utilizzate nello studio pre-trapianto, con eventuale esecuzione di tomografia ad emissione di positroni (PET).

Trattamenti pre-operatori

I trattamenti preoperatori sono consistiti in chemioembolizzazione, alcolizzazione, termoablazione e, in casi selezionati di adeguata funzione epatica, resezione epatica, in base a discussione collegiale caso per caso, secondo le indicazioni correnti della letteratura scientifica.

Trattamenti post-operatori

In nessuna caso è stata eseguita una chemioterapia adiuvante. Trattamenti chemioterapici sono stati eseguiti solo in pazienti con recidiva dimostrata di HCC secondo protocolli individualizzati.

Analisi istologica del tumore

L'analisi istologica del tumore ha preso in esame i seguenti parametri: numero e diametro dei noduli, presenza di capsula tumorale, di noduli satelliti, di invasione microvascolare e grado di differenziazione secondo la classificazione di Edmonson (5).

Immunosoppressione

L'immunosoppressione iniziale è consistita in inibitori della calcineurina associati a steroidi in tutti i casi. In 82 pazienti (84%) è stato utilizzato il tacrolimus (Prograf[®]), mentre in 15 pazienti (16%) è stata utilizzata la CyA in microemulsione (Sandimmun Neoral[®]). In 6 casi (6%) sono stati usati anticorpi monoclonali in induzione (daclizumab, basiliximab o alemtuzumab).

In 20 pazienti (21%), la rapamicina è stata introdotta nella terapia immunosoppressiva principalmente per la comparsa di effetti collaterali collegati all'utilizzo di inibitori della calcineurina, riducendo il dosaggio di questi ultimi od interrompendone la somministrazione. Questi 20 pazienti costituiscono la popolazione dello studio, mentre i rimanenti 77 pazienti (79%) in cui non è stata utilizzata la rapamicina costituiscono il gruppo di controllo.

Le ragioni dell'introduzione della rapamicina sono state: neurotossicità (7 casi, 35%); insufficienza renale acuta o cronica (5 casi, 25%); presenza di HCC con caratteristiche di aggressività (G3-4 sec. Edmonson con invasione microvascolare o al di fuori dei criteri di Milano all'esame istologico; 6 casi, 30%); rigetto cronico del graft (2 casi, 10%).

Nello popolazione in studio, la somministrazione di rapamicina ha avuto inizio ad una media di 68 ± 100 giorni dal trapianto (mediana: 28; range: 2 – 402), utilizzando una dose di carico e mantenendo successivamente i livelli ematici tra 3 e 8 ng/mL.

In 16 casi (80%), il dosaggio degli inibitori della calcineurina è stato ridotto in modo da mantenere livelli ematici inferiori a quelli utilizzati per i protocolli standard. In 4 casi (20%), la somministrazione di inibitori della calcineurina è stata interrotta e la rapamicina mantenuta come unico farmaco immunosoppressore, in associazione o meno agli steroidi, fino alla loro sospensione a 6 mesi dal trapianto.

In 5 casi (25%), la somministrazione di rapamicina è stata interrotta dopo una media di 172 ± 95 giorni (mediana: 180; range: 75 – 271) dal trapianto per comparsa di effetti collaterali non risolvibili con riduzione del dosaggio (due casi di anemia ed uno di importanti edemi declivi) o per insorgenza di complicazioni con possibile legame con l'utilizzo di rapamicina (fistola biliare e cardiopatia dilatativa).

Variabili analizzate ed obiettivi dello studio

Sono state analizzate e confrontate tra gruppi le caratteristiche demografiche (età e sesso) e cliniche (epatopatia di base e funzione epatica, espressa come MELD - Model for End-stage Liver Diseases [32] – score e come Child-Pugh score). Sono inoltre state confrontate le caratteristiche istologiche dell'HCC (numero di noduli, diametro, invasione microvascolare, grado secondo Edmonson, eventuale necrosi intratumorale, presenza di capsula, appartenenza o meno ai criteri di Milano), i livelli pre-operatori di α -FP e gli eventuali trattamenti pre-operatori.

La valutazione della recidiva tumorale e della sopravvivenza libera da recidiva hanno costituito l'obiettivo principale dello studio. Gli obiettivi secondari sono stati la valutazione e la comparazione tra gruppi dell'incidenza di rigetto acuto (definito come numero di pazienti che abbiano presentato almeno un episodio dimostrato tramite biopsia [33]), di infezioni (definite come comparsa di segni clinici di infezione associati ad isolamento di microrganismi nelle colture o a positivizzazione degli esami virologici), della funzione renale (espressa come valori di creatininemia) e della sopravvivenza del paziente.

Valutazione statistica

I risultati sono stati espressi come medie (e/o mediane) \pm deviazione standard (D.S.) e range. Le differenze tra variabili continue e variabili categoriche sono state valutate rispettivamente con il test di Mann-Whitney e con il test del chi-quadrato od il test esatto di Fisher. Per l'analisi delle sopravvivenze è stato utilizzato il metodo di Kaplan-Meier, mentre le differenze tra i gruppi sono state valutate con il log-rank test. La sopravvivenza libera da recidiva è stata calcolata dalla data del trapianto alla data corrispondente al sospetto iniziale di neoplasia (in base alla diagnostica per immagini) o dell'ultima visita di follow-up, mentre la sopravvivenza del paziente è stata considerata dalla data del trapianto alla data del decesso ritrapianto o dell'ultima visita di follow-up. Le variabili con un impatto significativo sulla recidiva all'analisi univariata sono state utilizzate nell'analisi multivariata, condotta con il modello di Cox. Un valore di P inferiore a 0.05 è stato considerato come statisticamente significativo. L'analisi

statistica è stata condotta con il programma di software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL), versione 13.0.

Caratteristiche della popolazione di studio e del gruppo di controllo

Le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione dello studio (Gruppo 1) e del gruppo di controllo (Gruppo 2) sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1 – Caratteristiche dei pazienti trattati con (Gruppo 1) e senza (Gruppo 2) rapamicina.

	Gruppo 1 (20 pazienti)	Gruppo 2 (77 pazienti)	P
Età (anni)	55 ± 6 (44 - 67)	56 ± 8 (38 - 66)	NS
Sesso (M/F)	19/1	65/12	NS
Epatopatia di base			
Cirrosi HCV+	11 (55%)	50 (65%)	NS
Cirrosi HBV+	5 (25%)	15 (19%)	
Altro	4 (20%)	12 (16%)	
MELD score	19 ± 7 (9 – 31)	17 ± 6 (6 – 39)	NS
Child-Pugh score			
A	-	5 (6%)	NS
B	6 (30%)	36 (47%)	
C	14 (70%)	36 (47%)	

MELD = Model for End-stage Liver Diseases. Le variabili continue sono espresse come media ± D.S. e range.

Non si sono osservate differenze significative tra gruppi per tutte le variabili analizzate.

Le caratteristiche istologiche dell'HCC, il tipo di trattamento pre-operatorio ed i valori pre-operatori di α -FP sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2 – Caratteristiche istologiche dell'HCC, trattamenti pre-operatori e valori pre-operatori di α -FP dei pazienti trattati con (Gruppo 1) e senza (Gruppo 2) rapamicina.

	Gruppo 1 (20 pazienti)	Gruppo 2 (77 pazienti)	P
α-FP preoperatoria > 30 ng/mL	5 (25%)	22 (29%)	NS
Trattamenti preoperatori	11 (55%)	61 (79%)	0.02
Chemioembolizzazione	9 (45%)	51 (66%)	NS
Numero noduli	3.3 \pm 2.6 (1 – 9)	2.5 \pm 1.8 (1 – 6)	NS
Diametro nodulo maggiore (cm)	3.1 \pm 1.6 (0.8 – 6.0)	2.7 \pm 1.2 (0.6 – 5.8)	NS
Diametro complessivo (cm)	5.5 \pm 3.3 (0.8 – 11.5)	4.4 \pm 2.7 (0.6 – 12.0)	NS
Invasione microvascolare	13 (65%)	32 (42%)	NS
Grado sec. Edmonson G3-4	13 (65%)	45 (58%)	NS
Invasione microvascolare + G3-4	9 (45%)	29 (38%)	NS
Necrosi intratumorale			
Totale	1 (5%)	19 (25%)	NS
Parziale	10 (50%)	32 (42%)	
Assente	9 (45%)	26 (34%)	
Criteri di Milano			
In	9 (45%)	55 (71%)	0.02
Out	11 (55%)	22 (29%)	

α -FP = alfa-fetoproteina. Le variabili continue sono espresse come media \pm D.S. e range.

I due gruppi sono risultati comparabili per quanto riguarda i casi con α -FP preoperatoria > 30 ng/mL, il numero ed il diametro dei noduli, il tasso di invasione microvascolare, l'incidenza di un grading elevato (G3 o G4) e la somma di queste due ultime variabili. Sono tuttavia emerse caratteristiche di maggiore aggressività degli HCC nel Gruppo 1, mentre i criteri di Milano all'esame istologico apparivano rispettati in un numero significativamente maggiore di casi nel Gruppo 2. Infine, sebbene il numero di pazienti sottoposti a procedure di chemioembolizzazione preoperatoria sia stato comparabile nei due gruppi, i trattamenti preoperatori (includendo quindi anche le ablazioni percutanee e le resezioni epatiche) nel complesso sono stati superiori nel Gruppo 2.

RISULTATI

Il follow-up mediano dell'intera popolazione in esame è stato di 21 mesi (range: 1 – 50), senza una differenza significativa tra il Gruppo 1 ed il Gruppo 2 (rispettivamente 19 mesi, range: 8 - 34 vs. 22 mesi, range: 1 – 50).

Due pazienti nel Gruppo 1 (10%) e 13 pazienti nel Gruppo 2 (17%) sono andati incontro a recidiva di HCC (P = NS). Le recidive si sono verificate ad una mediana di 10 mesi (range: 3 – 24) dal trapianto, manifestandosi primariamente a livello epatico in 10 casi, osseo in 3 casi, polmonare in un caso e cutaneo in un caso. Nella figura 2 è riportato un esempio di recidiva intraepatica.

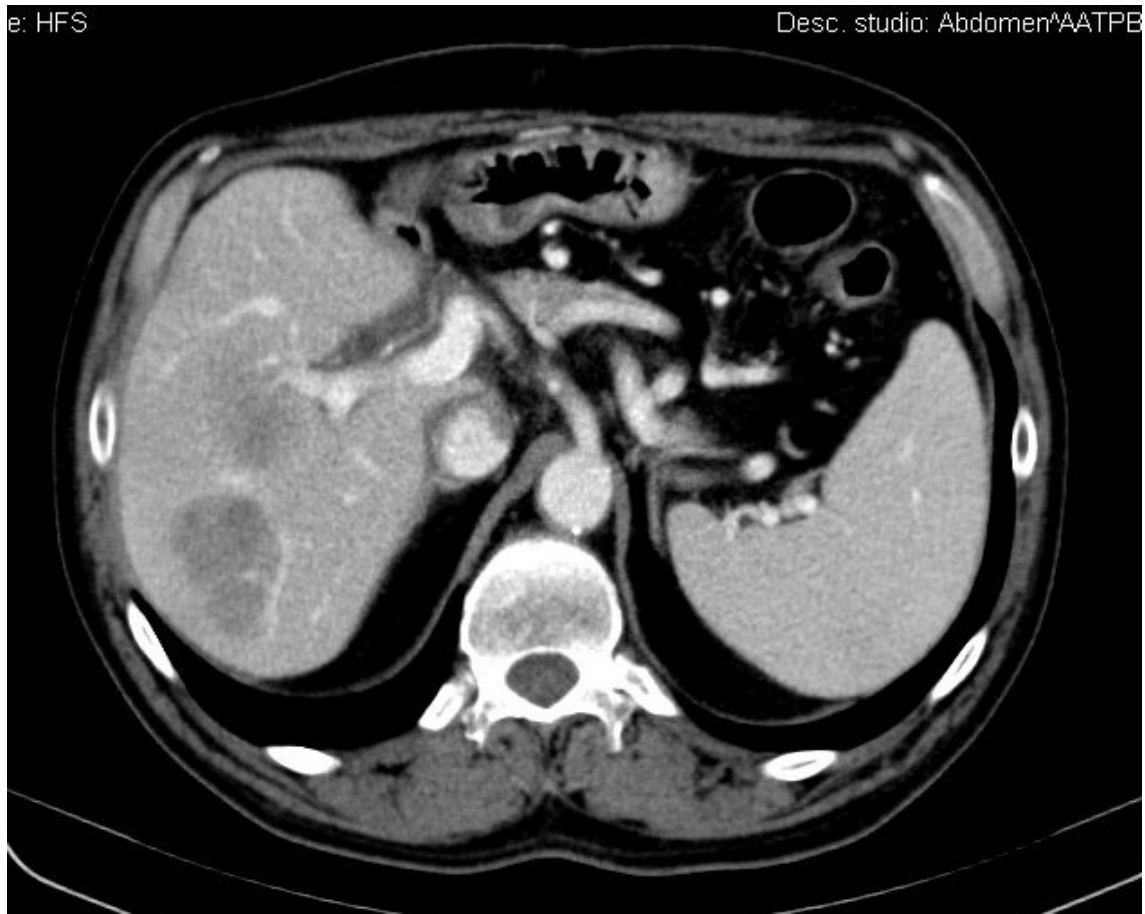


Figura 2 – Immagine TC di recidiva intraepatica multifocale di HCC ad 8 mesi dal trapianto in paziente sottoposto ad immunosoppressione standard (tacrolimus + steroidi).

In tutti i pazienti con recidiva l'immunosoppressione è stata ridotta o interrotta. Nove pazienti con recidiva (60%), di cui uno nel Gruppo 1, sono stati sottoposti a chemioterapia. Cinque pazienti nel Gruppo 2 (38%) sono stati trattati con rapamicina, associata o meno a chemioterapia, in seguito alla diagnosi di recidiva. Complessivamente 6 pazienti su 15 (40%) con recidiva di HCC (tutti appartenenti al Gruppo 2) sono deceduti a causa della recidiva stessa, mentre i rimanenti 9 (60%) sono tuttora viventi. In tre di questi pazienti, inclusi i due appartenenti al Gruppo 1, la recidiva è stata documentata di recente e non è dunque al momento possibile stabilirne o meno la progressione. In un paziente appartenente al Gruppo 2 e trattato con sola rapamicina, la recidiva è rimasta stabile, mentre in 5 pazienti, 4 dei quali trattati con rapamicina associata o meno a chemioterapia dopo la diagnosi di recidiva, si è assistito ad una progressione della recidiva stessa.

La sopravvivenza libera da neoplasia ad 1 e 3 anni è stata del 90% nel Gruppo 1, e rispettivamente dell'86% e dell'82% nel Gruppo 2 (P = NS) (Figura 3).

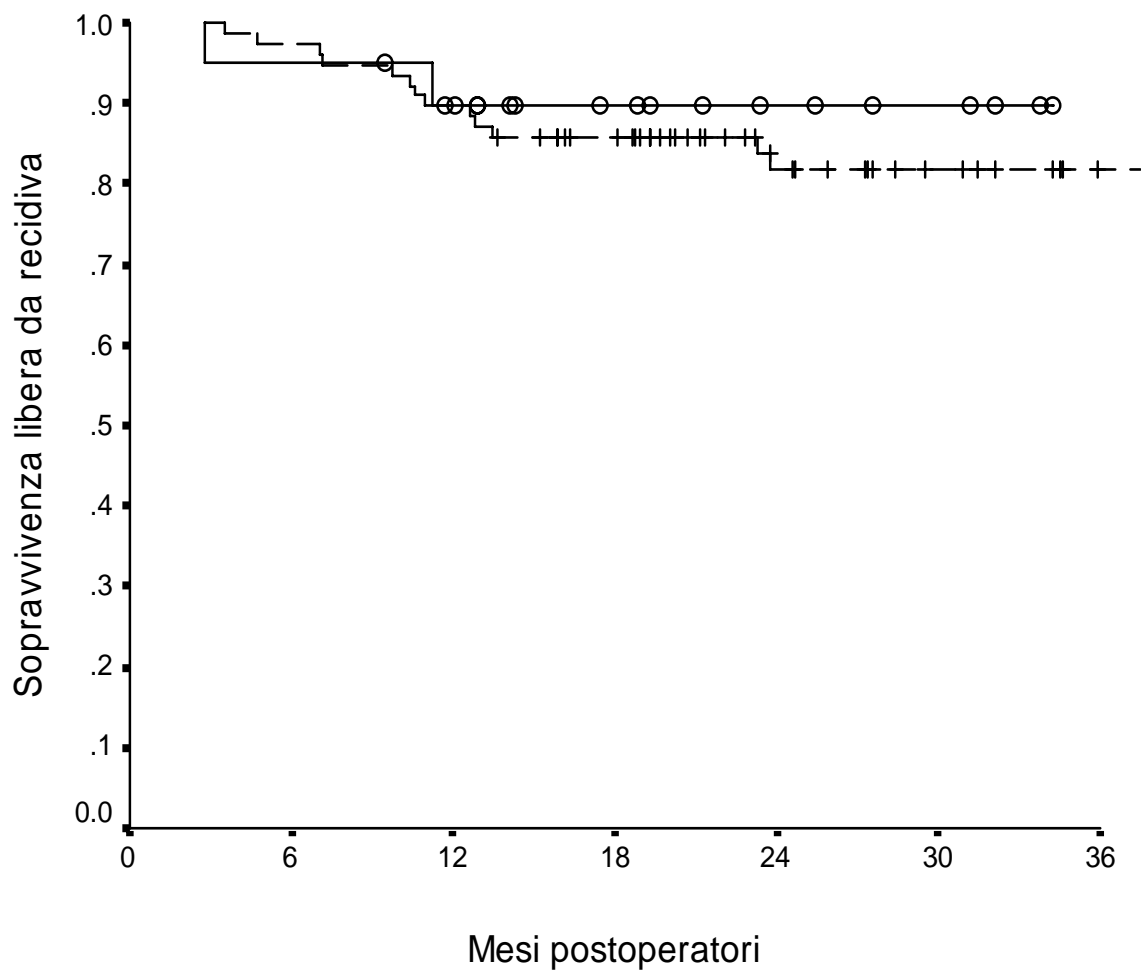


Figura 3 – Sopravvivenza libera da recidiva. Linea continua: Gruppo 1. Linea tratteggiata: Gruppo 2. P = NS.

Nessun paziente del Gruppo 1 è andato incontro ad episodi di rigetto acuto, mentre tale evenienza si è manifestata in 8 pazienti del Gruppo 2 (10%; P = NS)

Dieci pazienti del Gruppo 1 (50%) e 10 del Gruppo 2 (13%) sono andati incontro ad almeno un episodio infettivo (P = 0.001). Con l'eccezione di 2 casi di infezione da citomegalovirus, in tutti si è trattato di un'infezione batterica. In nessun caso si è osservata un'infezione della ferita chirurgica.

I valori di creatininemia sono risultati significativamente superiori nel Gruppo 1 rispetto al Gruppo 2 a 3, 7 e 14 giorni dal trapianto (2.1 ± 0.5 vs. 1.4 ± 0.6 ; 2.3 ± 0.6 vs. 1.3 ± 0.7 ; 2.0 ± 0.9 vs. 1.1 ± 0.8 ; P < 0.05). Non vi sono state differenze significative tra i gruppi a partire dalla seconda settimana fino ad un anno dal trapianto (Figura 4).

Non si sono osservate differenze significative tra gruppi per quanto riguarda l'incidenza di complicanze arteriose (nessun caso nel Gruppo 1 ed un caso nel Gruppo 2 - 1%) e biliari (un caso nel Gruppo 1 - 5% - e 4 casi nel Gruppo 2 - 5.2%).

Complessivamente 21 pazienti (20%) sono deceduti, 2 (10%) nel Gruppo 1 e 19 (25%) nel Gruppo 2. Nel Gruppo 1, entrambi i pazienti sono deceduti per recidiva dell'epatite C. Nel Gruppo 2, 8 pazienti sono deceduti per insufficienza multiorgano/sepsi, 6 per recidiva di HCC e 5 per recidiva dell'epatite C.

La sopravvivenza del paziente ad 1 e 3 anni è stata del 90% nel Gruppo 1 e, rispettivamente, dell'86% e del 78% nel Gruppo 2 (P = NS) (Figura 5).

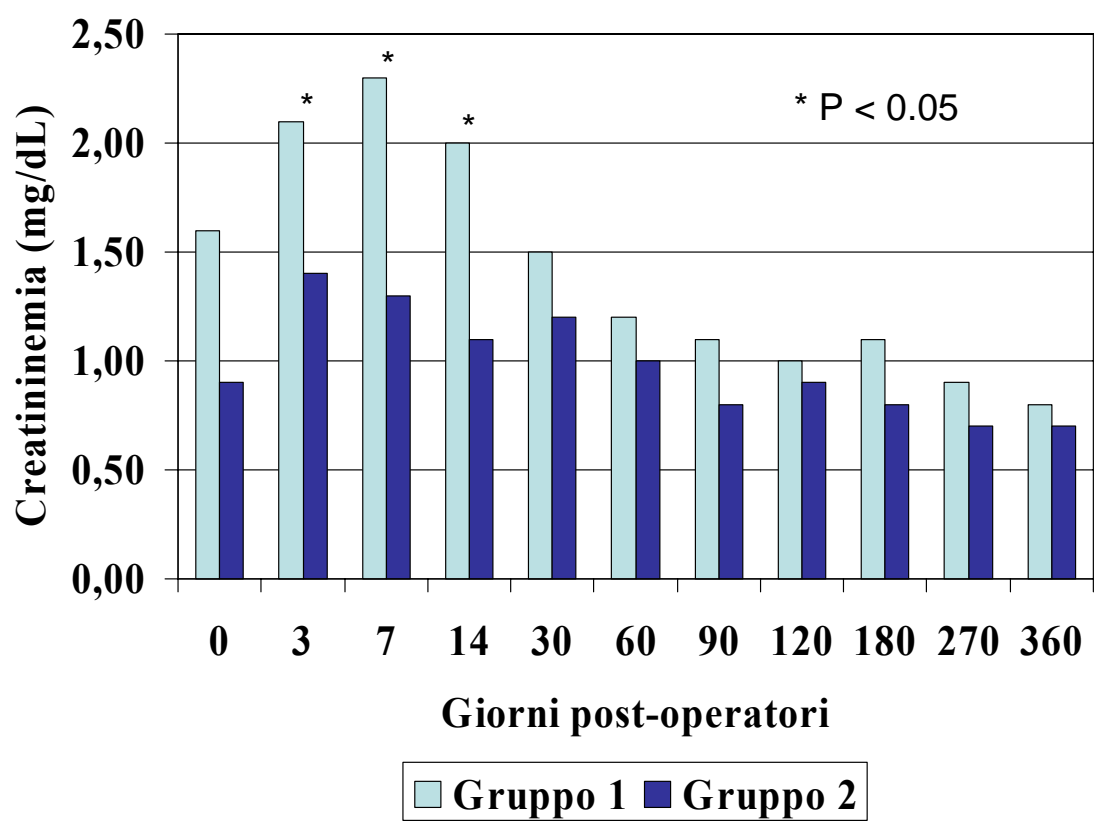


Figura 4 – Creatininemia post-operatoria nei pazienti trattati (Gruppo 1) e non (Gruppo 2) con rapamicina.

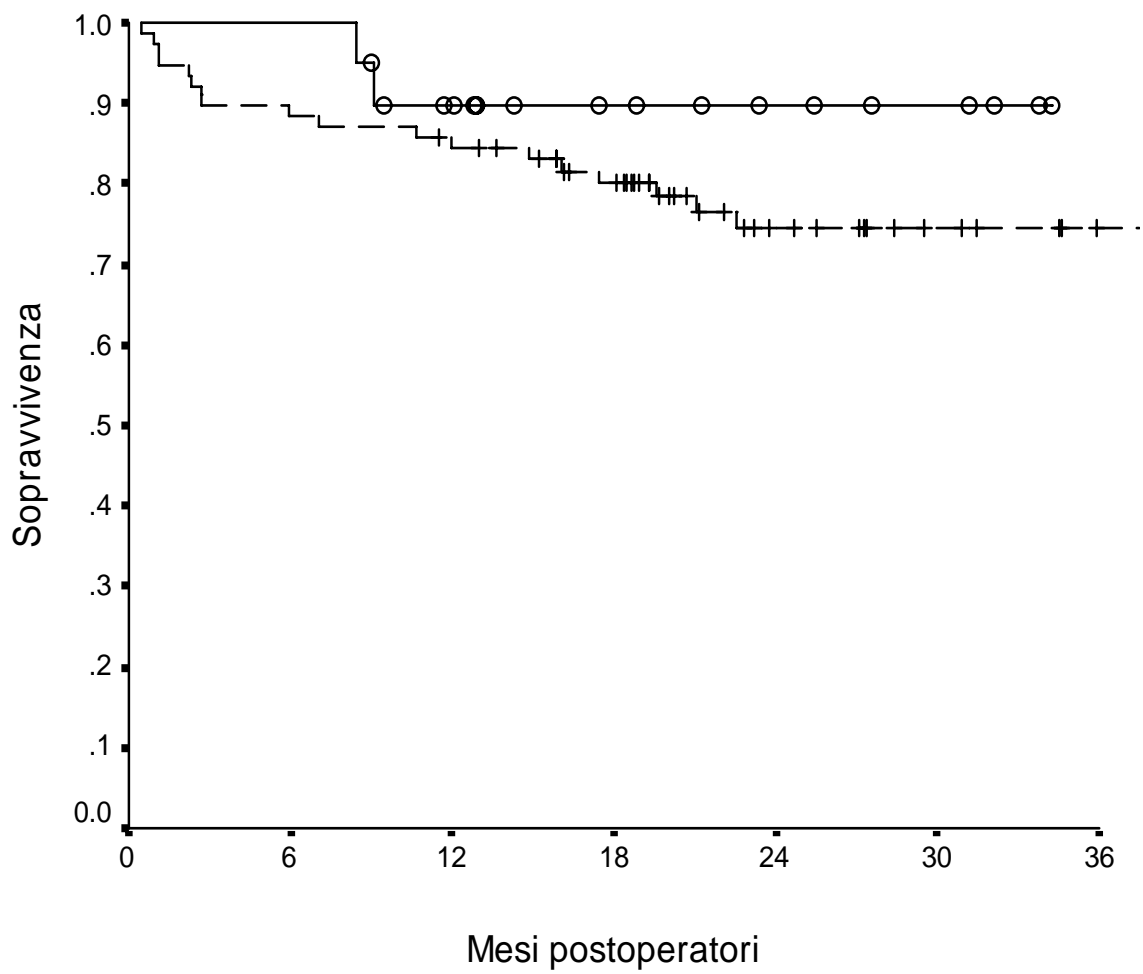


Figura 5 – Sopravvivenza del paziente. Linea continua: Gruppo 1. Linea tratteggiata: Gruppo 2. P = NS.

Analisi dei fattori di rischio di recidiva di HCC

All'analisi univariata, i fattori correlati ad una sopravvivenza libera da recidiva significativamente inferiore sono risultati essere un livello di α -FP preoperatoria > 30 ng/mL, la presenza di invasione microvascolare, il grading elevato (G3 o G4), la combinazione di queste ultime variabili e la fuoriuscita dai criteri di Milano all'esame istologico del fegato nativo asportato (Tabella 3).

All'analisi multivariata, i fattori correlati in maniera indipendente con la recidiva sono risultati essere un livello pre-operatorio di α -FP preoperatoria > 30 ng/mL (ExpB = 3.54; C.I. 95% = 1.22 – 10.22; P = 0.01) e la combinazione di invasione microvascolare e grading elevato (ExpB = 5.74; C.I. 95% = 1.46 – 22.45; P = 0.01).

Tabella 3 – Analisi univariata dei fattori correlati con la sopravvivenza libera da recidiva.

Variabile	Sopravvivenza libera da recidiva		P
	1 anno	3 anni	
α-FP preoperatoria			
> 30 ng/mL (n = 27)	70%	63%	0.001
≤ 30 ng/mL (n = 70)	93%	90%	
Trattamenti preoperatori			
Si (n = 72)	89%	84%	0.2
No (n = 25)	92%	92%	
Chemioembolizzazione			
Si (n = 60)	85%	77%	0.1
No (n = 37)	92%	92%	
Numero noduli			
Singoli (n = 39)	95%	91%	0.06
Multipli (n = 58)	84%	77%	
Diametro nodulo maggiore			
< 3 cm (n = 51)	92%	86%	0.3
3 – 5 cm (n = 36)	78%	78%	
> 5 cm (n = 7)	83%	83%	
Invasione microvascolare			
Assente (n = 52)	96%	93%	0.004
Presente (n = 45)	80%	72%	
Grado sec. Edmonson			
G1 – G2 (n = 39)	100%	100%	0.001
G3 - G4 (n = 58)	83%	72%	
Invasione microvascolare + G3 – G4			
Assente (n = 59)	97%	93%	< 0.0001
Presente (n = 38)	76%	67%	
Necrosi intratumorale			
Totale (n = 20)	100%	100%	0.1

Parziale (n = 42)	83%	78%	
Assente (n = 35)	83%	79%	
Criteria di Milano istologici			
In (n = 64)	94%	89%	0.01
Out (n = 33)	75%	72%	

α -FP = Alfa-fetoproteina.

DISCUSSIONE

Il presente studio riporta i risultati dell'utilizzo della rapamicina nel periodo 2003-2006 nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato per HCC su cirrosi presso il Centro Trapianti di Bologna. La rapamicina è stata somministrata a 20 pazienti nel periodo postoperatorio, con varie indicazioni, ma principalmente per effetti collaterali dovuti agli inibitori della calcineurina, il cui dosaggio è stato ridotto nell'80% dei casi. Nel 20% dei pazienti trattati con rapamicina, gli inibitori della calcineurina sono stati invece sospesi. Il livello ematico è stato mantenuto tra 3 ed 8 ng/mL, sensibilmente più basso rispetto a quanto riportato nella maggior parte degli studi (16, 20, 25, 27, 28, 30). Sebbene l'esiguo numero di pazienti ed un follow-up mediano inferiore ai 2 anni condizionino i risultati, alcuni dati forniti dall'analisi condotta sembrano interessanti.

Il sirolimus si è dimostrato un farmaco efficace, come dimostrato dall'assenza di episodi di rigetto nei pazienti trattati.

Il farmaco sembra essere anche discretamente tollerato, in particolare per quanto riguarda l'assenza di complicanze arteriose, a riprova che le osservazioni iniziali di aumentata incidenza di queste complicanze nei pazienti trattati con rapamicina era verosimilmente solo un evento casuale.

Considerando che la funzione renale, espressa come livelli di creatininemia, era inizialmente peggiore nei pazienti del Gruppo 1, mentre a partire dalla seconda settimana post-operatoria è risultata comparabile a quella dei pazienti del Gruppo 2, sembrerebbe confermato l'effetto positivo del sirolimus sulla funzione renale stessa.

Viceversa, va notato che i pazienti in rapamicina hanno evidenziato una più alta incidenza di complicanze infettive, in particolare batteriche, rispetto ai pazienti

sottoposti ad immunosoppressione convenzionale. Va inoltre sottolineato che nel 25% dei casi la somministrazione di rapamicina è stata interrotta per comparsa di effetti collaterali.

Per quanto riguarda l'effetto specifico sull'HCC, con le limitazioni inerenti alla lunghezza del periodo di osservazione ed alla scarsa numerosità della popolazione dello studio già riportate, è stata dimostrata una tendenza ad una minore incidenza di recidiva e ad una più prolungata sopravvivenza libera da recidiva nel Gruppo 1, sebbene senza significatività statistica nei confronti del Gruppo 2 (rispettivamente 10% vs. 17% e 90% vs. 82% a 3 anni), nonostante le neoplasie nei pazienti del primo gruppo esibissero una maggiore tendenza all'invasione microvascolare, un grading tumorale più elevato ed un numero maggiore di casi al di fuori dei criteri di Milano all'esame istologico definitivo.

I risultati descritti possono essere assimilati a quelli riportati da Kneteman et al. (16), e pertanto la rapamicina è un farmaco sicuramente indicato nei casi di HCC ad alto rischio. D'altra parte, non abbiamo potuto dimostrare un particolare effetto antineoplastico nei pazienti convertiti a rapamicina dopo diagnosi di recidiva neoplastica, come invece riportato da altri gruppi (34). La progressione della malattia dopo recidiva è stata infatti molto spesso estremamente rapida, indipendentemente dai protocolli terapeutici adottati.

Infine, tra i vari parametri analizzati, il livello pre-operatorio di α -FP e la combinazione di invasione microvascolare e grading elevato sono risultati essere gli unici con effetto indipendente sulla recidiva di HCC, dato già ampiamente riportato in letteratura (4-5).

In conclusione, il presente studio dimostra che la rapamicina può essere considerato un farmaco efficace e discretamente tollerato, utilizzabile sia in seguito alla comparsa di

effetti collaterali da inibitori della calcineurina, sia come farmaco di elezione nel trapianto di fegato per HCC.

BIBLIOGRAFIA

1. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-699.
2. Ravaioli M, Ercolani G, Cescon M. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: further considerations on selection criteria. *Liver Transpl* 2004; 10: 1195-202.
3. Jonas S, Bechstein WO, Steinmuller T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001; 33: 1080–1086.
4. Llovet JM, Bruix J, Fuster J, et al. Liver transplantation for small hepatocellular carcinoma: the tumor-node-metastasis classification does not have prognostic power. *Hepatology* 1998; 27: 1572–1577.
5. Klintmalm GB. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a registry report of the impact of tumor characteristics on outcome. *Ann Surg* 1998; 228: 479–490.
6. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: A study of 100 cases among 48900 necropsies. *Cancer* 1954; 7: 462–503.
7. Cillo U, Vitale A, Bassanello M, et al. Liver transplantation for the treatment of moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2004; 239: 150-159.
8. Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, et al. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2005; 11: 1086-1092.

9. Vivarelli M, Bellusci R, Cucchetti A, et al. Low recurrence rate of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: Better patient selection or lower immunosuppression? *Transplantation* 2002; 74: 1746–1751.
10. Vivarelli M, Cucchetti A, Piscaglia F, et al. Analysis of risk factors for tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: key role of immunosuppression. *Liver Transpl* 2005; 11: 497-503.
11. Marcil I, Stern RS. Squamous-cell cancer of the skin in patients given PUVA and ciclosporin: nested cohort crossover study. *Lancet* 2001; 358:1042-1045.
12. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cellautonomous mechanism. *Nature* 1999; 397:530-534.
13. Herman M, Weinstein T, Korzets A, et al. Effect of cyclosporin A on DNA repair and cancer incidence in kidney transplant recipients. *J Lab Clin Med* 2001; 137: 14-20.
14. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002; 8: 128-135.
15. Schumacher G, Oidtmann M, Rosewicz S, et al. Sirolimus inhibits growth of human hepatoma cells in contrast to tacrolimus which promotes cell growth. *Transplant Proc* 2002; 34: 1392-1393.
16. Kneteman NM, Hoberholzer J, Al Saghier M, et al. Sirolimus-based immunosuppression for liver transplantation in the presence of extended criteria for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2004; 10: 1301-1311.
17. Neuhaus P, Klupp J, Langrahr JM. MTOR inhibitors: an overview. *Liver Transpl* 2001; 6: 473-484.

18. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003; 35(3 Suppl):7S-14S
19. Sala-Prato M, Assalian A, Mehdi AZ, et al. Inhibition of rapamycin of PDGF- and TGF- β induced human tenon fibroblast proliferation in vitro. *J Glaucoma* 1995; 5: 54-59.
20. Trotter JF. Sirolimus in liver transplantation. *Transpl Proc* 2003; 35(Suppl 3A): 193S-200S.
21. Groth CG, Backman L, Morales JM, et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporin. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 1999; 67: 1036-1042.
22. King-Biggs MB, Cunitz JM, Park SJ, et al. Airway anastomotic dehiscence associated with the use of sirolimus immediately after lung transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1437-1443.
23. MacDonald AS, for the Rapamune Global Study Group. A worldwide, phase III, randomised, controlled, safety and efficacy study of sirolimus/cyclosporin regimen for prevention of acute cellular rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001; 71: 271-280.
24. Van Gelder T, Ter Menlen CG, Hene R, et al. Oral ulcers in kidney transplant recipients treated with sirolimus and mycophenolate mofetil. *Transplantation* 2003; 75: 788-791.
25. Neff GW, Montalbano M, Tzakis AG. Ten years of sirolimus therapy in orthotopic liver transplant recipients. *Transpl Proc* 2003; 35(Suppl 3A): 209S-216S.

26. Wiesner R, Klintmalm G, McDiarmid S, the Rapamune Liver Transplant Study Group. Sirolimus immunotherapy results in reduced rates of acute rejection in *de novo* orthotopic liver transplant recipients Am J Transpl 2002; 2: 464 (Abstract).
27. Wiesner R, for the Rapamune Liver Transplant Study Group. The safety and efficacy of sirolimus and low-dose tacrolimus versus tacrolimus in *de novo* orthotopic liver transplant recipients. Results from a pilot study. Hepatology 2002; 36: 208A (Abstract).
28. McAlister VC, Peltekian KM, Malatjalian DA, et al. Orthotopic liver transplantation using low-dose tacrolimus and sirolimus. Liver Transl 2001; 7: 701-708.
29. Trotter JF, Wachs M, Bak T, et al. Liver transplantation using sirolimus and minimal corticosteroids (3-day taper). Liver Transpl 2001; 7: 343-351.
30. Fairbanks KD, Eustace JA, Fine D, et al. Renal function improves in liver transplant recipients when switched from a calcineurin inhibitor to sirolimus. Liver Transpl 2003; 9: 1079-1085.
31. Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. Gastroenterology 1999;117:1198-204.
32. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, et al. United network for organ sharing liver disease severity score committee. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. Gastroenterology 2003; 124: 91-96.
33. Demetris A, Batts K, Dhillon A, Whigt D, Williams J, Yamabe H. Banff schema for grading liver allograft rejection: An international consensus document. Hepatology 1997; 25: 658-663.

34. Stippel DL, Kasper HU, Schleimer K, et al. Successful use of sirolimus in a patient with bulky ovarian metastasis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37:2185-2187.