

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**TRAPIANTO DI FEGATO: IMMUNOLOGIA CLINICA  
E DI BASE ED IMMUNOSOPPRESSIONE**

**XX CICLO - SETTORE DISCIPLINARE: MED 18 CHIRURGIA GENERALE**

**TESI DI DOTTORATO**

**STUDI DI SICUREZZA ED EFFICACIA DI REGIMI  
IMMUNOSOPPRESSIVI A BASE DI INIBITORI DI  
mTOR E SOSPENSIONE DEGLI INIBITORI DELLE  
CALCINEURINE IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A  
TRAPIANTO DI FEGATO**

**DR. ROBERTO MONTALTI**

**Coordinatore Dottorato**

**Chiar.mo Prof.  
MASSIMO CAMPIERI**

**Relatore**

**Chiar.mo Prof.  
ROBERTO BELLUSCI**

**ESAME FINALE ANNO 2008**

## INDICE

INDICE.....	2
INTRODUZIONE .....	5
CONCETTI DI TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA.....	6
RIGETTO .....	8
IMMUNOSOPPRESSIONE CLINICA .....	10
RISCHIO DI INFEZIONI .....	10
RISCHIO DI NEOPLASIE MALIGNHE.....	10
RISCHIO DI MALATTIE CARDIOVASCOLARI .....	11
FARMACI INDUTTIVI.....	11
MISURE DI DEPLEZIONE LINFOCITARIA .....	12
Sieri anti-linfocitari.....	12
Anticorpi monoclonali OKT3.....	13
Inibitori del recettore IL-2 .....	13
CORTICOSTEROIDI.....	15
FARMACI ANTIPROLIFERATIVI.....	17
Azatioprina .....	17
Micofenolato Mofetile.....	18
INIBITORI DELLE CALCINEURINE .....	18
Ciclosporina.....	18
Tacrolimus .....	20
INIBITORI mTOR .....	21
Sirolimus .....	21
Everolimus.....	23
BIBLIOGRAFIA .....	26
SIROLIMUS IN MONOTERAPIA DOPO TRAPIANTO DI FEGATO .....	30
INTRODUZIONE .....	30
MATERIALI E METODI .....	31
RISULTATI.....	32
DISCUSSIONE .....	34
BIBLIOGRAFIA .....	36
UTILIZZO DEL SIROLIMUS NEL TRATTAMENTO DELLA INSUFFICIENZA RENALE DA INIBITORI DELLA CALCINEURINA DOPO TRAPIANTO DI FEGATO.....	37
INTRODUZIONE .....	37
MATERIALI E METODI .....	38
Analisi statistica.....	39
RISULTATI.....	40
DISCUSSIONE .....	45

BIBLIOGRAFIA .....	47
PROTOCOLLO IMMUNOSOPPRESSIVO A BASE DI EVEROLIMUS (CERTICAN) IN MONOTERAPIA, SENZA INIBITORI DELLE CALCINEURINE, IN TRAPIANTO DI FEGATO DE NOVO.....	49
INTRODUZIONE .....	49
MATERIALI E METODI .....	51
Disegno dello studio .....	51
Periodo di Screening:.....	51
Obiettivi .....	52
Etica .....	53
Criteri di inclusione/esclusione .....	53
Sicurezza, tollerabilità ed efficacia.....	53
Dosaggio dell'Evr.....	54
Analisi statistica.....	54
RISULTATI.....	56
Anagrafica e condizioni pre-LT .....	56
Sopravvivenza e cause di morte .....	57
Funzione renale.....	58
Sicurezza e tollerabilità .....	60
Rigetto.....	61
Parametri ematologici e di funzione epatica .....	61
Dislipidemia.....	62
Infezioni .....	63
DISCUSSIONE .....	64
BIBLIOGRAFIA .....	67
EFFETTI DELLA MONOTERAPIA CON EVEROLIMUS SUI PARAMETRI EMATOLOGICI E DEL FERRO NEL TRAPIANTO DI FEGATO DE NOVO: RISULTATI PRELIMINARI.....	70
INTRODUZIONE .....	70
MATERIALI E METODI .....	71
Analisi statistica.....	72
RISULTATI.....	73
DISCUSSIONE .....	76
BIBLIOGRAFIA .....	77
CONCLUSIONI .....	78
RINGRAZIAMENTI.....	81



## INTRODUZIONE

Il trapianto d'organo solido è divenuto il trattamento di prima scelta per gli stadi avanzati di diverse malattie renali, epatiche, cardiache, polmonari, pancreatiche. Dagli anni '60 vi sono stati sensibili progressi in questo campo, principalmente grazie allo sviluppo di farmaci immunosoppressori più sicuri ed efficaci. La principale acquisizione che ha consentito il successo del trapianto clinico di organi fra individui non consanguinei, è stato lo sviluppo di farmaci immunosoppressivi capaci di prevenire e controllare il rigetto. Nel 1962, l'associazione di azatioprina e corticosteroidi si è dimostrata il primo regime immunosoppressivo clinicamente efficace dopo trapianto renale ed è ancora utilizzato in alcuni pazienti.

L'introduzione nel 1978 della ciclosporina, un immunosoppressore specifico e non mielotossico, ha permesso di passare dal piano della ricerca a quello della pratica clinica ed ha contribuito in maniera determinante al successo del trapianto d'organo. Continui miglioramenti nel controllo del rigetto sia a livello molecolare che cellulare sono stati possibili grazie alle nuove conoscenze sulla complessità del sistema immunitario e degli eventi che costituiscono il fenomeno del rigetto.

La nuova classe di farmaci immunosoppressori utilizzata nei trapianti d'organo è rappresentata dai cosiddetti mTOR (Rapamicina ed Everolimus) che presentano ottima efficacia antirigetto con minore esposizione dei pazienti ai più comuni effetti collaterali degli immunosoppressori inibitori delle calcineurine.

## CONCETTI DI TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA (1)

I linfociti hanno un ruolo essenziale nella risposta immunitaria e ne mediano la specificità. La reazione di rigetto inizia quando i linfociti T riconoscono gli antigeni estranei di istocompatibilità espressi dalle cellule del tessuto trapiantato. Si ritiene che l'antigene estraneo sia presentato direttamente ai linfociti dell'ospite, dalle cellule dendritiche del donatore o, alternativamente, dai macrofagi dell'ospite, che fagocitano e in seguito espongono l'epitopo antigenico sulla loro superficie. Qualsiasi sia la cellula presentante l'antigene (APC), la capacità di differenziare fra il self e il non self, risiede nei linfociti. Nelle fasi precoci dello sviluppo del sistema immune, i gruppi o cloni di linfociti si differenziano in modo da avere una discreta specificità di bersaglio. Un linfocita, quindi, può riconoscere solo uno o pochi antigeni. La specificità immunologica è acquisita durante le fasi iniziali dello sviluppo. Tra l'enorme varietà di antigeni che possono essere riconosciuti vi sono gli antigeni estranei controllati dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). La stimolazione di un linfocita quiescente, da parte di un antigene per il quale sia specifico, ne determina la trasformazione in una grande cellula attiva che secerne messaggeri chimici intercellulari chiamati citochine. Questi sono proteine o glicoproteine solubili che agiscono a breve distanza e che, a loro volta, amplificano la risposta e attivano altre cellule. Tuttavia prima che l'antigene sia eliminato, avvengono miriadi di eventi cellulari e subcellulari. Questi eventi sono riportati in modo semplificato nella Figura 1

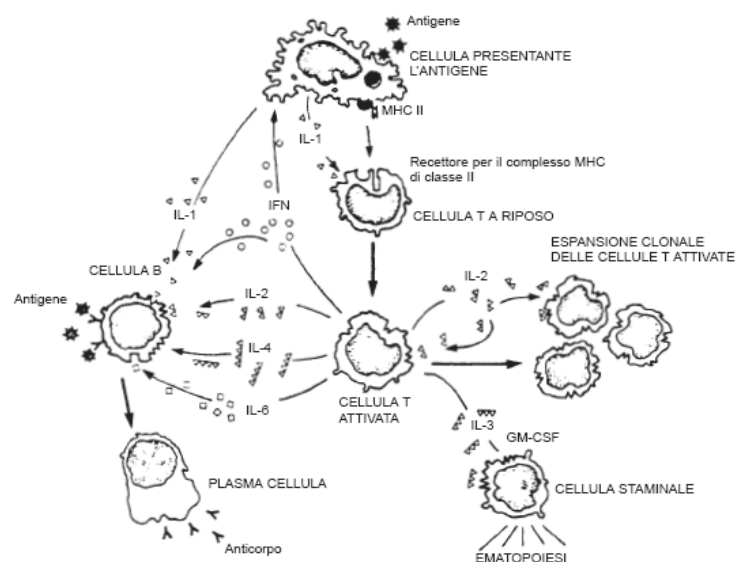


Figura 1. Ruoli delle varie citochine prodotte durante la stimolazione antigenica.

L'interferenza in una o più fasi di questa complessa cascata ad uno o più livelli, offre molte opportunità per interventi terapeutici mirati a sopprimere la risposta di rigetto. Per il

paziente che viene sottoposto a trapianto, l'incontro dell'APC con il linfocita T è generalmente considerato il primo punto di un possibile attacco immunosoppressivo. Teoricamente vi è la possibilità di distruggere tutti i tessuti linfatici e di forzare l'organismo a ristabilire la discriminazione fra self e non self. Una volta che il linfocita ha risposto all'antigene estraneo ed è stato attivato, la terapia immunosoppressiva è meno efficace. Molte cellule e molte molecole sono coinvolte. È difficile sopprimere gli effettori specifici come anticorpi preformati, linfociti killer attivati (citotossici) ed agenti aspecifici quali piastrine, neutrofili, complemento e fattori della coagulazione. La soppressione di uno solo o due effettori è inefficace.

Agli albori della trapiantologia, il problema principale era la soppressione del rigetto acuto dell'allotrapianto. I farmaci immunosoppressivi, il cui uso è oggi assai diffuso, agiscono sopprimendo la risposta immune in modo aspecifico, e quindi condizionano un aumentato rischio di infezioni opportunistiche e sviluppo di tumori. Una immunosoppressione aspecifica efficace può invalidare la risposta dell'ospite alle infezioni o sopprimere altre cellule in fase di proliferazione (cellule del midollo osseo e della mucosa intestinale). Agenti infettanti come il citomegalovirus (CMV) e lo *Pneumocystis carinii*, che non costituiscono un pericolo per la vita di individui normali, possono divenire letali per il paziente trapiantato. Attualmente, l'immunosoppressione clinica si fonda essenzialmente su tre metodi.

Il primo consiste nella semplice deplezione dei linfociti circolanti per mezzo della loro distruzione.

Il secondo è basato sull'uso di un inibitore dell'attivazione linfocitaria (Ciclosporina o Tacrolimus) interferendo nelle fasi iniziali dell'attivazione antigene-indotta dei linfociti T, bloccando la produzione di citochine, cruciale per la successiva cascata di eventi immunologici che conducono al rigetto dell'organo trapiantato.

La terza consiste nell'uso di vari inibitori metabolici (per esempio Azatioprina, Micofenolato Mofetile) che interferiscono con la proliferazione linfocitaria essenziale per amplificare la risposta. Questi farmaci sono biochimicamente specifici, ma non distinguono tra linfociti o altre cellule in proliferazione.

I futuri progressi nella terapia immunosoppressiva riguardano lo sviluppo di un approccio antigene-specifico nel quale l'obiettivo è quello di indurre una non reattività donatore-specifica (tolleranza immunologica) duratura, che rispetti al contempo l'immunocompetenza dell'ospite.

Il successo pieno del trapianto non sarà conseguito finché il problema del rigetto non sarà superato in modo specifico e sicuro, nel pieno rispetto dell'integrità del sistema immunitario. La tolleranza del ricevente verso gli organi trapiantati senza la necessità di un'immunosoppressione aspecifica è l'obiettivo finale nell'ambito del trapianto clinico.

## **RIGETTO**

Il rigetto dell'organo trapiantato richiede la partecipazione di varie combinazioni di cellule specifiche ed aspecifiche dal punto di vista immunologico. Si riconoscono tre tipi di rigetto del trapianto.

Il rigetto iperacuto, che avviene entro minuti o ore dal trapianto ed è mediato principalmente da anticorpi preformati. Questo tipo di rigetto si previene con uno screening per anticorpi preformati e non risponde ai classici farmaci antirigetto. Il rigetto iperacuto è mediato da anticorpi preformati che si legano all'endotelio e in seguito attivano il complemento. Questo rigetto è caratterizzato da una rapida occlusione trombotica del sistema vascolare dell'organo trapiantato. La risposta trombotica avviene entro minuti od ore dopo che l'organo trapiantato viene rivascularizzato. Il rigetto iperacuto dopo allotrapianto è mediato prevalentemente da anticorpi IgG diretti verso molecole proteiche estranee, come le molecole MHC. Questi anticorpi IgG sono il risultato di una precedente esposizione ad alloantigeni da trasfusioni sanguigne, gravidanza o precedente trapianto.

Il rigetto acuto, mediato soprattutto dai linfociti T, si verifica in genere tra 5 giorni e 3 settimane dopo il trapianto di organo solido. Episodi di rigetto acuto sono più comuni nei primi 6 mesi dopo il trapianto, ma si possono presentare in ogni epoca. Il rigetto acuto, se non trattato, può distruggere velocemente un organo. I nuovi farmaci immunosoppressivi hanno reso il rigetto acuto un evento sempre meno frequente e preoccupante. Ci sono due forme di rigetto acuto: rigetto acuto vascolare e rigetto acuto cellulare. Il rigetto acuto vascolare è la forma più severa, con un maggior rischio di complicazioni a lungo termine per il graft. Lo sviluppo del rigetto acuto vascolare è mediato da molecole IgG che si sviluppano dopo il trapianto contro gli antigeni endoteliali del graft e che attivano il complemento. Anche le cellule T contribuiscono all'episodio di rigetto vascolare acuto. Questa risposta conduce alla lisi diretta delle cellule endoteliali o alla produzione di citochine che ulteriormente reclutano e attivano cellule infiammatorie. Il risultato finale è la necrosi endoteliale. Questo processo avviene entro la prima settimana dal trapianto di organo allogenico in assenza di immunosoppressione. Nello sviluppo del rigetto acuto cellulare, si riscontra necrosi delle cellule parenchimali causata dall'infiltrazione di cellule T e macrofagi. L'esatto meccanismo che sottende a questo processo non è stato completamente chiarito. Il meccanismo effettore della lisi mediata dai macrofagi è simile ad una risposta di ipersensibilità ritardata. Il meccanismo effettore delle cellule T è mediato da una lisi citotossica da linfociti (CTL-mediata). Molti dei dati emergenti hanno chiamato in



causa i CTL CD8+ alloreattivi. IL CTL CD8+ riconosce e lisa cellule estranee. A supporto di questa ipotesi sta la presenza di infiltrato cellulare arricchito di CTL CD8+.

Il rigetto cronico può intercorrere mesi o anni dopo il trapianto ed è la più comune causa di perdita del graft dopo 1 anno. Dal punto di vista immunologico, il rigetto cronico è mediato da risposte di linfociti T e B. Il meccanismo del rigetto cronico è meno chiaramente definito ed è oggetto di studi approfonditi. Il rigetto cronico si manifesta come fibrosi e retrazione cicatriziale degli organi attualmente trapiantati, anche se la lesione istopatologica che si riscontra varia a seconda dell'organo. Il rigetto cronico si manifesta come danno destruento sui dotti biliari nel trapianto di fegato, e fibrosi e glomerulopatia nel trapianto di rene. È improbabile che il rigetto cronico sia solamente un fenomeno immunologico: ischemia e infiammazione, tra altri fattori, giocano anch'essi un ruolo. Date le basi multifattoriali del rigetto cronico, il trapianto non risulta completamente protetto dalle terapie immunosoppressive attualmente disponibili, anche se la loro incontestabile efficacia nel prevenire il rigetto acuto comporta altrettanto sicuri benefici sull'incidenza del rigetto cronico. Il rigetto acuto risulta oggi meglio controllabile.

Tuttavia nuovi farmaci immunosoppressivi sono oggi in valutazione non solo per meglio prevenire gli episodi di rigetto acuto, ma per migliorarne il profilo di sicurezza ed in definitiva migliorare la qualità di vita stessa del paziente trapiantato. La diminuzione degli effetti collaterali raggiunta con i nuovi farmaci può migliorare l'accettazione della terapia immunosoppressiva da parte del paziente.

## **IMMUNOSOPPRESSIONE CLINICA**

I farmaci immunosoppressivi sono essenziali per la sopravvivenza del graft. Le infezioni, in particolare virali e l'insorgenza di neoplasie maligne rimangono un problema insoluto per i pazienti trapiantati che necessitano di terapia immunosoppressiva. Oltre ai problemi legati all'immunosoppressione in quanto tale, i singoli farmaci possiedono una tossicità specifica.

### **RISCHIO DI INFEZIONI**

La prevenzione del rigetto è possibile, ma il prezzo per la prevenzione, in termini di aumentato rischio di infezioni e tumori maligni, rimane molto alto. È possibile indurre una completa "anergia" della risposta immune, ma l'ospite morirebbe sicuramente di sepsi fulminante. I farmaci immunosoppressivi non bloccano specificamente l'alloreattività, e un certo grado di aumentata suscettibilità alle infezioni affligge tutti i pazienti trapiantati. Questo aumentato rischio è causato non solo dai patogeni dell'ambiente circostante ma anche dalla riattivazione di patogeni interni in precedenza sotto controllo. Un esempio su tutti è l'infezione da citomegalovirus (CMV). Una infezione da CMV può esitare in polmoniti, epatiti, pancreatiti e gastroenteriti nei pazienti trapiantati. Il rischio di riattivazione è maggiore approssimativamente da 6 a 12 settimane dopo il trapianto, ma anche in periodi successivi se il paziente viene molto immunosoppresso per episodi di rigetto. La prevenzione della riattivazione del CMV è una consolidata prassi terapeutica durante il primo anno dopo trapianto. E non solo per l'infezione citomegalica: la vaccinazione contro lo pneumococco, il vaccino per l'epatite B, il trimethoprim-sulfamidico per la polmonite da *Pneumocystis carinii* (nebulizzatori di pentamidina possono sostituire il sulfamidico nei pazienti allergici), la nistatina per le infezioni fungine orali ed esofagee. Nonostante la profilassi, le infezioni rimangono uno dei problemi più importanti dopo il trapianto.

### **RISCHIO DI NEOPLASIE MALIGNI**

Anche lo sviluppo di neoplasie maligne è una complicanza temibile della terapia immunosoppressiva cronica. Tumori mediati da virus sono riscontrati frequentemente,

analogamente a quanto riscontrato in pazienti affetti da AIDS. Il virus del papilloma umano è associato con il cancro della cervice, l'epatite C e B con gli epatocarcinomi e l'herpes virus umano 8 con il sarcoma di Kaposi. I linfomi, particolarmente quelli associati ad EBV, hanno un'aumentata incidenza nei pazienti immunosoppressi. I linfomi EBV-correlati sono spesso associati a malattie linfoproliferative post-trapianto (PTLD) per meglio distinguere le differenze nell'eziologia e nel trattamento con i linfomi nelle popolazioni non immunocompromesse. Le malattie linfoproliferative post-trapianto variano nella loro espressione clinica da un livello asintomatico ad un livello pericoloso per la vita del paziente ed il trattamento varia dalla riduzione sino alla sospensione dell'immunosoppressione, per arrivare al trattamento con farmaci antivirali e chemioterapici. I farmaci immuno soppressori possono stimolare la recidiva di epatocarcinoma (HCC) su cirrosi dopo trapianto di fegato.

## **RISCHIO DI MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

La patologia cardiovascolare rimane una causa significativa di morbidità e mortalità nei trapiantati. Il rischio di malattie cardiovascolari è esacerbato dai farmaci immunosoppressivi. La mortalità dopo il primo anno è dovuta in maggior misura ad accidenti cardiovascolari, anche se le infezioni hanno un ruolo critico. Ciclosporina e Corticosteroidi, in particolare, sono associati a patologie arteriose coronariche. Dovrebbe essere adeguata caso per caso la terapia immunosoppressiva per i pazienti ad alto rischio. Per esempio, la conversione da Ciclosporina a Tacrolimus dovrebbe essere presa in considerazione allorquando una limitazione dell'uso degli steroidi (o eliminazione) sia auspicabile in pazienti selezionati. Inibitori della HMG-CoA reduttasi possono favorire livelli ematici di lipidi più bassi dopo trapianto e potrebbero potenzialmente fungere da immunosoppressori. L'esercizio fisico e la cessazione del fumo dovrebbero essere raccomandati.

## **FARMACI INDUTTIVI**

I farmaci immunosoppressivi sono divisi in due gruppi: quelli usati come induzione della immunosoppressione immediatamente dopo il trapianto (spesso usati anche per il trattamento del rigetto) e i farmaci impiegati per la terapia di mantenimento.

## MISURE DI DEPLEZIONE LINFOCITARIA

Molti farmaci immunosoppressivi clinicamente rilevanti esercitano la loro azione provocando una deplezione linfocitaria dell'ospite. Si ritiene che i sieri anti-linfocitari, le radiazioni e gli anticorpi monoclonali tradizionali agiscano mediante una deplezione o inattivazione dei linfociti relativamente non selettiva. La marcata immunosoppressione che si ottiene dopo somministrazione di immunoglobuline anti-linfocitarie (ALGs) o OKT3 aumenta il rischio di sviluppare infezioni opportunistiche e/o linfomi. Per tali motivi l'uso di ALG o OKT3 è usualmente limitato.

### **Sieri anti-linfocitari**

ALGs sono sieri policlonali ottenuti iniettando linfociti umani in animali di specie differenti. L'azione dell'ALG sembra essere diretta principalmente verso le cellule T; l'uso di timociti, quindi, crea i sieri più efficaci. La soppressione prodotta dall'ALG può essere almeno parzialmente bloccata dalle cellule T, ma non dalle cellule del midollo osseo. Come prevedibile, la somministrazione di ALG interferisce principalmente con le reazioni cellulo-mediate: il rigetto del trapianto, la sensibilità alla tubercolina e la reazione del trapianto verso l'ospite (Graft Versus Host - GVH). L'ALG può abolire reazioni preesistenti di ipersensibilità ritardata. L'ALG ha un effetto minore sulla produzione degli anticorpi da parte di cellule T. I linfociti "target" dell'ALG sono lisati o eliminati dalle cellule reticolo-endoteliali del fegato e della milza. L'ALG può essere somministrato come profilassi subito dopo il trapianto o impiegato per trattare un rigetto acuto in corso. I risultati favorevoli dipendono da una somministrazione refratta in più giorni, piuttosto che da una singola dose. Il pre-trattamento con ALG del ricevente è efficace nel sopprimere la risposta contro le cellule del donatore e per fare spazio nel midollo. Inoltre L'ALG può essere utile nel prevenire le reazioni GVH, che si possono manifestare in questi pazienti. La tossicità del siero eterologo preparato contro tessuti umani dipende da due fattori: (1) dalla sua reattività crociata contro altri antigeni tissutali e (2) dalla capacità del paziente di produrre anticorpi contro le proteine estranee. Anemia e trombocitopenia possono verificarsi a causa di una reazione tra ALG ed eritrociti e piastrine dell'ospite. I problemi clinici più comuni associati all'uso dell'ALG sono le reazioni allergiche all'antisiero. L'orticaria, le reazioni anafilattoidi, la malattia da siero tra cui dolori articolari, febbre e malessere seguono lo sviluppo dell'immunità verso le immunoglobuline eterologhe. Tuttavia, queste reazioni diminuiscono in presenza di altri farmaci immunosoppressori.

### **Anticorpi monoclonali OKT3**

Nel 1975, Kohler e Milstein svilupparono la tecnica dell'ibridizzazione della cellula somatica (hibridoma formation) che dà origine a linee immortalizzate di linfociti B, ciascuna secernente un solo anticorpo o monoclonale, in quantità illimitate. In seguito sono stati prodotti anticorpi monoclonali che reagiscono con cellule T in generale (OKT3, anti-CD3) e a vari sottogruppi di cellule T (OKT4, anti-CD4; OKT8, anti-CD8). L'OKT3, usato per la prima volta clinicamente nel 1980, è divenuto l'anticorpo monoclonale maggiormente impiegato in clinica. Esso è utilizzato nel trattamento di episodi di rigetto acuto resistente agli steroidi nel rene, nel fegato, nel cuore. L'OKT3 si lega ad un sito associato con il TCR (CD3) e ha la funzione di modulare il recettore ed inattivare la funzione della cellula T. Interferendo con il complesso TCR, l'OKT3 blocca non solo la funzione delle semplici cellule T nascenti, ma anche la funzione delle cellule T citotossiche già costituite, bloccando quindi la citotossicità cellulomediata. L'OKT3 blocca le funzioni effettrici delle cellule T coinvolte nel rigetto del trapianto. Dopo la somministrazione endovenosa, l'OKT3 si lega alle cellule T. Queste vengono poi rimosse da cellule reticolo-endoteliali che risiedono nel fegato e nella milza. Le cellule T circolanti diminuiscono bruscamente (30-60 minuti) dopo la prima iniezione di OKT3. Quando cessa l'azione dell'OKT3, le cellule CD3+ tornano rapidamente al loro livello normale, probabilmente come risultato della riespressione del complesso TCR sulla superficie cellulare. La maggior limitazione all'uso di OKT3 è la sua immunogenicità, che può provocare reazioni allergiche. Dopo un uso prolungato OKT3 diviene meno efficace a causa di anticorpi che legano l'OKT3 in circolazione. L'OKT3 può portare ad un eccesso di immunosoppressione; il trattamento non può essere proseguito oltre le 2 settimane per il rischio di infezioni e linfomi.

### **Inibitori del recettore IL-2**

IL-2R è un complesso di numerose catene polipeptidiche transmembrana. Sono state identificate 3 catene che legano IL-2R - alfa (CD25, 55 kD), beta (75 kD), e gamma (64 kD). L'associazione non covalente di queste tre catene forma il sito di legame ad alta affinità per IL-2. La catena alfa è presente solo sulle cellule T attivate, un sottogruppo di cellule B attivate e le cellule APC. Il trattamento anticorpale monoclonale anti-CD25 è quindi diretto contro una popolazione minore di cellule arricchite con cellule T attivate dall'antigene.

Nel 1998 due nuovi farmaci sono divenuti disponibili con il meccanismo di azione di legare la catena alfa del recettore per IL-2. Si ritiene che questi anticorpi monoclonali, Basiliximab e Daclizumab, possano prevenire il rigetto legando il recettore di IL -2 senza

attivarlo. I due farmaci differiscono poiché Daclizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD25, mentre Basiliximab è un anticorpo monoclonale chimerico anti-CD25. L'immunogenicità di queste molecole, come misurato dall'emivita in circolo in vivo e dalla comparsa di anticorpi contro questi farmaci, è significativamente ridotta quando paragonata agli anticorpi monoclonali murini anti-CD25. Studi recenti hanno dimostrato una diminuzione significativa degli episodi di rigetto acuto senza un concomitante aumento delle infezioni o delle neoplasie maligne. Entrambi questi farmaci sono ben tollerati e possono essere somministrati attraverso una via endovenosa periferica. Tutti i summenzionati farmaci sono particolarmente costosi. La comunità dei trapiantologi si sta orientando verso un sempre minore utilizzo di tali farmaci come uso primario. Molte di queste preparazioni di immunoglobuline sono utilizzate invece per la terapia del rigetto acuto.

## **FARMACI DI MANTENIMENTO**

Una regola generale nella gestione dell'immunosoppressione è che nell'immediato periodo dopo trapianto sono necessari maggiori quantità di farmaci, che vengono gradualmente scalati col passare del tempo. Tuttavia un paziente trapiantato raramente rimane libero da terapia anche dopo molti anni. L'attuale prassi terapeutica in un paziente trapiantato è l'immunosoppressione con farmaci per via orale. Prednisone ed azatioprina sono stati usati per molti anni. Agli albori della trapiantologia, tuttavia, era comune il verificarsi di severe complicanze dovute alla terapia ad alte dosi di steroidi. Attualmente sono disponibili molti farmaci, tutti con profili tossici diversi. Le associazioni di diversi farmaci immunosoppressivi con un meccanismo d'azione complementare e talvolta sinergico sono utilizzate nella maggior parte dei pazienti trapiantati, allo scopo di diminuire gli effetti collaterali associati a ciascun farmaco se utilizzato in monoterapia in quantità necessaria a prevenire il rigetto.

## CORTICOSTEROIDI

I corticosteroidi sono i farmaci immunosoppressivi più comunemente usati nella pratica clinica. I glicocorticoidi possiedono numerosi effetti antinfiammatori, che li rendono potenti immunosoppressori (Figura 2). Nelle prime sei ore dalla somministrazione di steroidi si

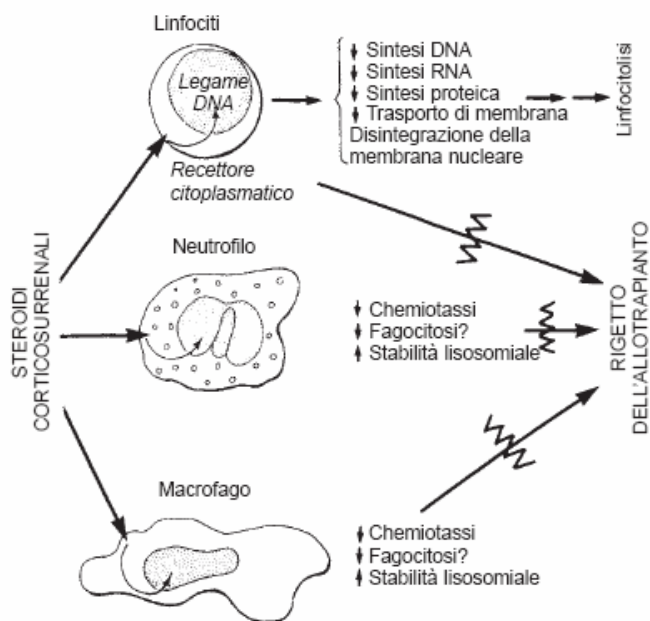


Figura 2. Schema d'azione dei farmaci corticosteroidi

manifesta un grande decremento dei linfociti nel sangue. La diminuzione dei linfociti nel sangue periferico nell'uomo riflette una redistribuzione di queste cellule dallo spazio intravascolare verso i depositi linfatici. I linfociti circolanti (all'incirca i due terzi di tutti i linfociti) sono principalmente cellule T, che viaggiano fra il compartimento intravascolare ed i tessuti linfatici quali la milza, il midollo osseo, il dotto toracico ed i linfonodi. I linfociti sessili, che comprendono alcune cellule T e la maggior parte dei linfociti B, sono all'interno del compartimento linfatico. I glicocorticoidi provocano la migrazione delle cellule T circolanti dal compartimento intravascolare ai tessuti linfoidi con minore effetto sulla distribuzione delle cellule B. Il meccanismo della distribuzione linfocitaria è probabilmente dovuto a modificazioni della superficie cellulare che promuove l'adesione cellulare agli endoteli vascolari. Un effetto maggiore dei corticosteroidi sembra essere l'inibizione della trascrizione del gene e della secrezione delle citochine (IL-1, IL-6 e TNF) da parte dei macrofagi. Inoltre i corticosteroidi sopprimono la produzione delle citochine da parte delle cellule T, che amplificano la risposta dei linfociti e dei macrofagi. Pertanto la produzione di IL-2 e il legame di IL-2 ai suoi recettori viene

inibito dai glicocorticoidi. Inoltre i glicocorticoidi bloccano la capacità dei macrofagi di rispondere ai segnali derivati dai linfociti, quali il fattore di inibizione della migrazione (MIF) e il fattore di attivazione dei macrofagi (MAF). Questo potrebbe essere responsabile della marcata inibizione della reazione di ipersensibilità di tipo ritardato osservata dopo somministrazione di questi farmaci. Un ulteriore loro effetto è la soppressione della sintesi delle prostaglandine. I corticosteroidi hanno un effetto scarso-nullo sulla produzione anticorpale.

Sono stati chiariti alcuni dei meccanismi molecolari attraverso cui i glicocorticoidi esercitano i loro effetti. Gran parte della loro attività inizia a livello subcellulare per mezzo di recettori ormonali. A differenza dei mediatori polipeptidici con recettori sulla superficie cellulare, gli steroidi si muovono liberamente attraverso la membrana delle cellule per legarsi a recettori nel citoplasma, producendo un complesso steroide-recettore. Tale complesso, in seguito, entra nel nucleo dove si lega al DNA. Nel nucleo esso agisce sul gene promotore per attivare o deprimere parte del genoma e determina la trascrizione di messaggeri RNA-specifici. Pertanto la regolazione di alcune sintesi proteiche viene diminuita ed altre vengono stimulate per effetto dei glicocorticoidi. Nei linfociti, nei monociti, nei neutrofili e negli eosinofili normali dell'uomo sono stati identificati recettori specifici intracitoplasmatici per i glicocorticoidi. Inoltre, sono stati riscontrati diversi gradi di densità di recettori per glicocorticoidi in sottopopolazioni di cellule linfatiche. La sensibilità di una particolare sottopopolazione di linfociti è probabilmente correlata alla relativa densità dei recettori intracitoplasmatici per i corticosteroidi. Tali messaggeri possono inibire il DNA, l'RNA e le sintesi proteiche. Vi possono anche essere effetti sul trasporto del glucosio e degli aminoacidi. Nei trapianti d'organo, i corticosteroidi non sono efficaci se usati con intento preventivo in monoterapia, mentre sono efficaci in combinazione con farmaci come gli inibitori delle calcineurine, l'azatioprina, e l'ALG. Gli steroidi ad alte dosi sono molto utili clinicamente per trattare il rigetto acuto, ma il loro uso prolungato porta a seri effetti collaterali, quali ipertensione, aumento di peso, ulcere peptiche ed emorragie gastrointestinali, stati euforici della personalità, formazione di cataratta, iperglicemia che può progredire fino al diabete steroideo, pancreatiti, deperimento muscolare ed osteoporosi con necrosi avascolare della testa del femore. La suscettibilità alle infezioni da piogeni o ad infezioni opportunistiche è il risultato diretto della soppressione fagocitica dei macrofagi e dei neutrofili. Le caratteristiche fisionomiche cushingoidi sono i segni esteriori di questi processi indesiderati.



## **FARMACI ANTIPROLIFERATIVI**

I farmaci antiproliferativi inibiscono la piena espressione della risposta immunitaria interferendo con la differenziazione dei linfociti immunocompetenti dopo il confronto con gli alloantigeni. Essi assomigliano strutturalmente a metaboliti essenziali che, combinandosi con alcune componenti cellulari come il DNA, interferiscono con la funzione molecolare. Gli antimetaboliti del primo gruppo inibiscono gli enzimi che regolano una particolare linea metabolica e vengono incorporati durante la sintesi producendo molecole difettose. Essi comprendono analoghi di purine, pirimidine e dell'acido folico che sono i più efficaci inibitori della proliferazione e differenziazione cellulare. Questi farmaci vengono somministrati al momento del trapianto quando le cellule immunocompetenti sono stimolate per la prima volta, e per tutto il periodo di sopravvivenza dell'organo trapiantato per interferire con la risposta del sistema immunitario.

### **Azatioprina**

Fino a poco tempo fa l'azatioprina, analogo delle purine, era il farmaco più usato dopo trapianto clinico. L'azatioprina è costituita da 6-mercaptopurina (6-MP) più una catena laterale per proteggere il labile gruppo sulfidrico. Nel fegato la catena laterale viene staccata e si forma il composto attivo 6-MP. Il meccanismo di azione di questi due composti è simile, ma l'azatioprina pare avere il vantaggio di una tossicità di poco inferiore. Aggiungendo ribosio-S6-fosforibonucleotide è possibile una piena attività metabolica nelle cellule. La somiglianza strutturale di queste molecole all'inosina monofosfato è ovvia, ed il 6-MP-ribonucleotide inibisce gli enzimi che convertono l'inosin-nucleotide in adenosina e guanosina monofosfato. Inoltre la presenza di 6-Mp-ribonucleotide rallenta l'intero processo della biosintesi delle purine mediante l'inibizione della prima fase con un meccanismo di falso feed-back. La somiglianza sterica ai nucleotidi dell'adenosina o della guanina non è sufficiente a permettere una incorporazione significativa di DNA e RNA e la sintesi di false molecole. Il risultato dell'inibizione di questi numerosi enzimi, tuttavia, è il blocco della sintesi cellulare di DNA, di RNA, di alcuni cofattori e di altri nucleotidi attivi. L'attività biologica dell'azatioprina e del 6-MP è maggiore tanto più è richiesta la sintesi di acidi nucleici<sup>7, 18</sup>. Questi farmaci inibiscono efficacemente lo sviluppo dell'immunità sia umorale che cellulare, interferendo con la differenziazione e la proliferazione dei linfociti sensibili. Quando l'espansione di cellule interamente immunocompetenti è completa, la sintesi degli acidi nucleici è meno importante ed il farmaco è meno efficace. Un ulteriore beneficio

dell'azatioprina risiede nel fatto che può anche ridurre la produzione di neutrofili e l'attivazione di macrofagi, effetti che sopprimono le componenti infiammatorie aspecifiche della reazione immunologica. La tossicità dell'azatioprina deriva dall'azione dello stesso metabolita. L'effetto più importante è la soppressione midollare, che porta a leucopenia. Può verificarsi anche una tossicità epatica, probabilmente a causa dell'alto ritmo di sintesi dell'RNA effettuata dagli epatociti. Poiché la disfunzione epatica non sembra essere correlata con la dose, il meccanismo responsabile rimane non chiaro.

### **Micofenolato Mofetile**

Il Micofenolato Mofetile (MMF) è un altro immunosoppressore con meccanismo d'azione di inibizione del metabolismo purinico. MMF inibisce l'inosina-monofosfato-deidrogenasi e blocca la proliferazione dei linfociti. MMF blocca la proliferazione durante le fasi terminali del ciclo cellulare. Negli ultimi anni il MMF ha sostituito l'azatioprina nella tradizionale triplice terapia immunosoppressiva. Lo studio U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil ha dimostrato che, dopo trapianto renale da donatore cadavere, in tre gruppi di pazienti trattati uno con azatioprina, un altro con MMF 2 g al giorno ed un altro con MMF 3 g al giorno, l'incidenza di rigetto diminuiva dal 38% nel primo gruppo, al 19,8% nel secondo e al 17,5% nel terzo gruppo. Tuttavia il gruppo con dosaggio di 3 g al giorno ha riportato importanti effetti collaterali gastrointestinali. Attualmente la maggior parte dei pazienti trapiantati in trattamento con MMF, riceve 2 g al giorno di farmaco. I principali effetti collaterali di questo farmaco sono la leucopenia e disturbi gastrointestinali, in particolare diarrea.

## **INIBITORI DELLE CALCINEURINE**

### **Ciclosporina**

La scoperta di Borel, nel 1972, delle proprietà immunosoppressive della ciclosporina, un metabolita fungino estratto dal *tolipocladium inflatum*, ha contribuito enormemente alla rapida crescita e al successo clinico del trapianto di organi, in particolare di cuore, fegato e rene. Essa rappresenta una classe completamente nuova ed importante di farmaci immunosoppressivi. Molti dei suoi effetti immunosoppressivi selettivi sulle cellule T sembrano essere correlati all'inibizione selettiva dell'attivazione mediata dal TCR (Figura 3). La ciclosporina inibisce la produzione di citochine da parte delle cellule TH in vitro e inibisce lo sviluppo dei linfociti

CD4+ e CD8+ maturi nel timo. La ciclosporina è un peptide ciclico (11 aminoacidi, peso molecolare di 1202 daltons). Le proprietà immunosoppressive della ciclosporina sono state scoperte nei topi in cui è in grado di sopprimere la produzione di anticorpi. Altre proprietà comprendono la inibizione in vivo della produzione di cellule che formano anticorpi, inibizione della reazione GVH, del rigetto dei trapianti di cute, del rigetto di tipo ritardato degli allotrapianti di organi solidi e delle reazioni di ipersensibilità ritardata. L'assenza di mielo-inibizione è stata il vantaggio principale rispetto agli altri farmaci immunosoppressivi, suggerendo un meccanismo d'azione relativamente specifico per i linfociti. Altre cellule infiammatorie sono molto meno sensibili ai suoi effetti inibitori.

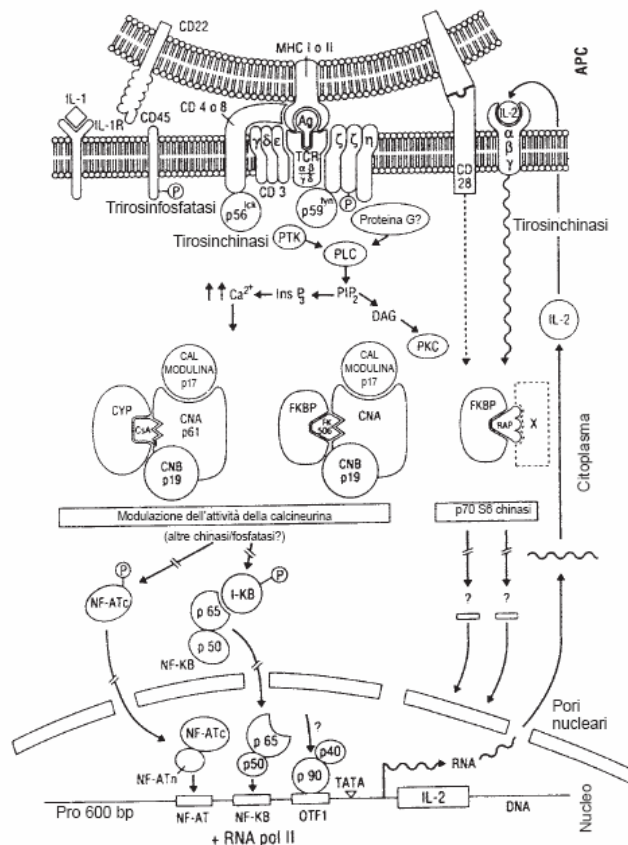


Figura 3. Trasduzione dei segnali nelle cellule T attivate e i siti in cui si ritiene che agiscano la Ciclosporina, il Tacrolimus (FK-506), il Sirolimus.

Gli studi sugli effetti della ciclosporina sui linfociti T hanno dimostrato (1) inibizione dei linfociti T che producono IL-2 e dei linfociti T citotossici, (2) inibizione dell'espressione del gene IL-2 nei linfociti T attivati, (3) non inibizione dei linfociti T attivati in risposta all'IL-2 esogena, (4) inibizione dell'attivazione dei linfociti T a riposo in risposta a linfocine alloantigeniche ed esogene, (5) inibizione della produzione di IL-1 e (6) inibizione dell'attivazione mitogena (concanavalina A) dei linfociti T che producono IL-2. Queste risposte

dei linfociti T coinvolgono linfociti CD4+ (TH) e/o linfociti CD8+ (T citotossici/suppressor) e l'inibizione sembra avvenire a livello dell'attivazione e forse anche della maturazione delle cellule quiescenti. Numerosi esperimenti condotti su trapianti di rene e di altri organi solidi hanno dimostrato che la ciclosporina induce una immunosoppressione potente senza mielosoppressione. L'aggiunta di steroidi ha consentito di abbassare il dosaggio della ciclosporina e ha diminuito la nefrotossicità (il principale effetto collaterale del farmaco). L'introduzione della ciclosporina nella pratica clinica nel 1983 ha prodotto un sostanziale miglioramento dei risultati nei trapianti renali da cadavere e ha consentito il successo clinico dei trapianti di cuore e fegato. La ciclosporina è metabolizzata a livello epatico dagli enzimi del citocromo P-450. I farmaci che aumentano o diminuiscono la funzione del citocromo P-450 possono aumentare o diminuire in maniera importante i livelli ematici di ciclosporina. Antibiotici, farmaci anticonvulsivanti e alcuni calcio- antagonisti possono interferire con la sua biodisponibilità, ma è necessario verificare tutte le interazioni possibili prima di prescrivere un nuovo farmaco ad un paziente trapiantato. I potenziali effetti indesiderati della ciclosporina comprendono la nefrotossicità, l'ipertensione, l'ipercalcemia, l'irsutismo, l'ipertrofia gengivale, tremori ed altre turbe neurologiche, il diabete e un certo grado di epatotossicità. Come per altri farmaci immunosoppressivi, la terapia con ciclosporina aumenta il rischio di infezioni e di neoplasie maligne, ma attraverso la riduzione del fabbisogno di steroidi in genere diminuisce il numero delle infezioni.

### **Tacrolimus**

Tacrolimus (una volta conosciuto come FK 506) è un nuovo potente immunosoppressore isolato nel 1984 in Giappone dal fungo di terra *Streptomyces tsukubaensis*. È un macrolide con un peso molecolare di 822 daltons. Benché strutturalmente diverso dalla ciclosporina, ha un meccanismo di azione molto simile. Gli effetti inibenti i linfociti conseguono alla formazione di complessi attivi fra il farmaco e proteine intracellulari affini o immunofilline (ciclofillina, o proteina legante FK 506 [FKBP]) (Figura 3). Il complesso farmaco-immunofillina blocca l'attività fosfatase della calcineurina che è importante nella regolazione della trascrizione del gene IL-2. L'attività di tacrolimus in vitro, tuttavia, è approssimativamente 100 volte maggiore di quella della ciclosporina. Come la ciclosporina, il tacrolimus agisce inibendo (1) l'espressione del gene IL-2 e la produzione di IL-2, (2) la proliferazione cellulare di colture linfocitarie miste, mediata dalle cellule T helper (TH), (3) la generazione di cellule T citotossiche, (4) la comparsa di IL-2R sui linfociti dell'uomo. Tacrolimus è stato approvato per il

trattamento del rigetto dei trapianti di fegato. Esso è anche efficace nella terapia “di salvataggio” del rigetto acuto ricorrente dopo trapianto renale ed epatico. Gli effetti collaterali della ciclosporina e di tacrolimus sono simili, ma tacrolimus non provoca irtsutismo o ipertrofia gengivale. Può invece causare alopecia e una maggiore incidenza di diabete posttrapianto, se confrontata con la ciclosporina.

## INIBITORI mTOR

### Sirolimus (2)

Sirolimus, o Rapamicina (Rapamune<sup>®</sup> Wyeth-Ayerst Laboratories) è un antibiotico macrolide isolato originariamente da *Streptomyces hygroscopicus* a Rapa Nui nelle Easter Islands. Sirolimus è strutturalmente simile al tacrolimus ed interagisce con FKBP12 ma sembra bloccare l’attivazione delle cellule T in un punto a valle rispetto al tacrolimus, attraverso il legame con la proteina mammalian Target della Rapamycin (mTOR). Il maggiore effetto di tale interazione è l’inibizione della Interleuchina 2 (IL-2) che comporta la soppressione dell’attivazione e proliferazione delle cellule T. Il legame di sirolimus all’FKBP inibisce l’attività della proteinchinasi p70S6, che è essenziale per la fosforilazione ribosomiale e per la

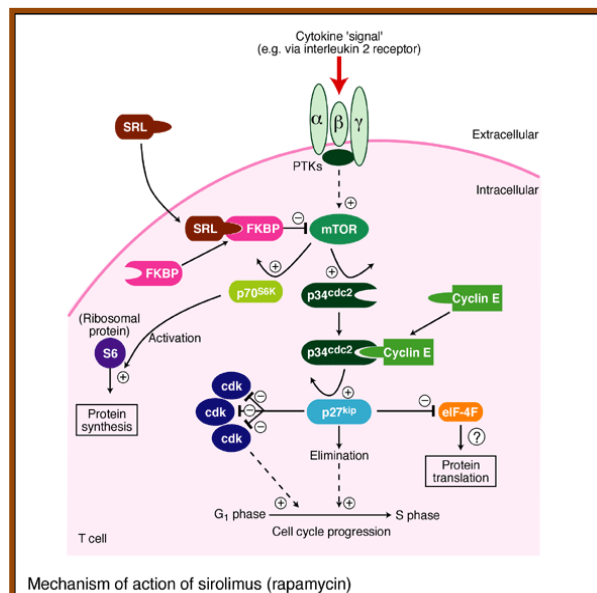


Figura 4. Meccanismo d’azione del Sirolimus

continuità del ciclo cellulare. A differenza di Ciclosporina e Tacrolimus, il Sirolimus non interagisce con la calcineurina (Figura 4). Altri effetti immunosoppressivi includono:

- Diminuzione della sensibilità delle cellule T alla IL-2, IL-12, IL-7 e IL-15.
- Diminuzione della produzione anticorpale da parte delle cellule B.
- Diminuzione della proliferazione di Timociti.
- Diminuzione della stimolazione sulla IL-2R attraverso p7056K e p34.
- Inibizione della progressione da G1 alla fase S del ciclo cellulare delle cellule T.
- Diminuzione della proliferazione delle cellule B mediata da lipopolisaccaridi.
- Diminuzione del fattore di crescita piastrinico (PDGF).

Gli effetti collaterali del Sirolimus comprendono: iperlipidemia (ipercolesterolemia e ipertrigliceridemia), mielodepressione (trombocitopenia, leucopenia, anemia), artralgie. Il Sirolimus consente di ottenere una efficacia simile alla Ciclosporina nella terapia di mantenimento consentendo di evitare le neuro e nefrotossicità associate alla Ciclosporina.

Sirolimus possiede alcune proprietà che lo rendono unico nel panorama dei farmaci immunosoppressori.

A) Sirolimus non blocca l'attivazione dell'apoptosi indotta dalle cellule T come provocato dagli inibitori delle Calcineurine. Tale caratteristica suggerisce che il Sirolimus possa indurre una tolleranza dell'ospite.

B) E' stato proposto che il Sirolimus abbia un effetto antiproliferativo contro le cellule neoplastiche. Tale caratteristica lo renderebbe particolarmente utile in pazienti sottoposti a trapianto di fegato per epatocarcinoma su cirrosi.

C) Sirolimus potrebbe prevenire e trattare il rigetto cronico. Tale ipotesi deriva dal fatto che il Sirolimus diminuisce i livelli di PDGF. E' stato dimostrato che il 50% di pazienti con rigetto cronico confermato istologicamente hanno mostrato una risoluzione del rigetto.

La combinazione di Sirolimus e Ciclosporina a basso dosaggio o l'uso di Sirolimus in monoterapia primaria costituiscono quindi una importante prospettiva di applicazione clinica per il futuro.

## Everolimus

Everolimus (Certican<sup>®</sup>), derivato semisintetico della rapamicina, è un macrolide ad attività immunosoppressiva, approvato a livello europeo per la prevenzione del rigetto acuto e cronico dopo trapianto di cuore e per la prevenzione del rigetto acuto dopo trapianto di rene, in

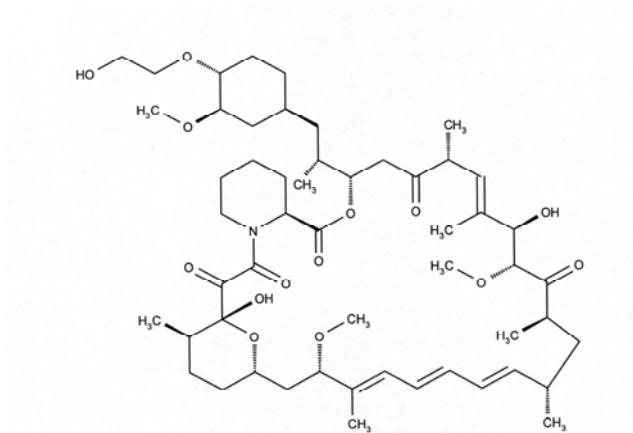


Figura 5. Struttura molecolare di Everolimus

associazione a Ciclosporina (Figura 5). Everolimus è stato anche utilizzato per il trattamento di artrite reumatoide, malattie infiammatorie intestinali e come antitumorale.

Everolimus inibisce la proliferazione cellulare indotta dai fattori di crescita (IL2 - IL15). Nel citoplasma si lega alla proteina FKBP12, formando un complesso stabile che interferisce con un enzima chiave, il FRAP o m-TOR, una proteina fondamentale nel meccanismo di regolazione che controlla il metabolismo, la crescita e la proliferazione cellulare. La sua inattivazione inibisce la fosforilazione della chinasi p70 S6 con l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1→S. Everolimus è attivo sulle cellule ematopoietiche e su quelle non ematopoietiche, ed è in grado di inibire la proliferazione delle cellule muscolari lisce.

Il razionale per lo sviluppo di un nuovo immunosoppressore quale everolimus si basa sul meccanismo d'azione innovativo che presenta numerosi potenziali vantaggi: accanto alla profilassi del rigetto acuto, l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari potrebbe consentire, anche nel trapianto epatico, la riduzione dell'incidenza e della gravità del rigetto acuto e cronico. La presenza di un'azione sinergica con la Ciclosporina consente l'impiego di quest'ultimo farmaco a dosaggi ridotti, con un migliore profilo di tollerabilità. I livelli ematici target di 3-8 ng/ml in associazione a Ciclosporina o Tacrolimus consentono i migliori livelli di efficacia e sicurezza.

Everolimus ha un tempo di dimezzamento di 28 ore, mentre per la Rapamicina risulta di 60 ore; Everolimus viene pertanto somministrato in due dosi giornaliere mentre la Rapamicina in

monodose giornaliera. Dopo somministrazione orale Everolimus è rapidamente assorbito con un picco mediano di 1 ora dopo una singola dose in soggetti sani e 2 ore in pazienti sottoposti a trapianto. Everolimus viene assorbito nel primo tratto intestinale ed escreto prevalentemente per via fecale (95%) e solo in minima quantità urinaria (5%).

L'efficacia e la tollerabilità di everolimus in associazione a Neoral sono state ampiamente valutate in numerosi studi clinici di fase II e III in pazienti sottoposti a trapianto di rene ed a trapianto di cuore. Everolimus è risultato generalmente efficace, sicuro e ben tollerato; tuttavia, quando Neoral viene somministrato a dosaggio usuale in combinazione con everolimus, si è osservato un peggioramento della funzione renale rispetto ai pazienti che assumevano Micofenolato Mofetile (MMF) in associazione a Neoral (3). Si è accertato, in base alle considerazioni seguenti che il peggioramento della funzione renale è legato all'uso di un dosaggio inadeguato di Neoral: 1) La nefrotossicità dose-dipendente di Neoral è ben documentata; 2) I dati disponibili "in vivo" indicano l'assenza di nefrotossicità da parte di Everolimus; 3) I dati nell'uomo relativi al farmaco Sirolimus, un macrolide a cui everolimus è strettamente correlato, indicano che questa classe farmacologica non presenta nefrotossicità. Inoltre, nei pazienti in trattamento con Everolimus e Ciclosporina si è osservato che la riduzione della dose di Ciclosporina, nei primi 3 mesi dopo il trapianto, induce molto spesso un miglioramento della funzione renale (3); da ultimo, si è osservato che la sospensione di Neoral in pazienti selezionati in trattamento con dosi elevate di Sirolimus migliora la funzione renale (4).



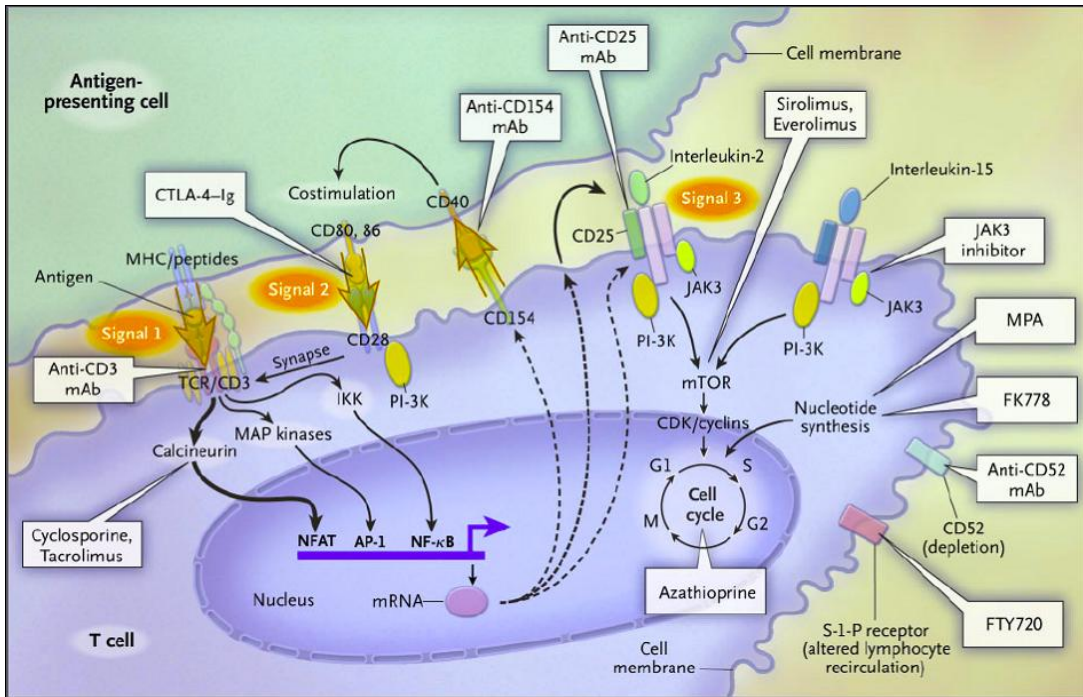


Figura 5. Schema d'azione dei principali farmaci immunosoppressori

## BIBLIOGRAFIA

1. Granger DK, Domenick M, Ildstad ST, Reggiani P. Immunologia dei trapianti e immunosoppressione. Trattato di Chirurgia. Le basi biologiche della moderna pratica chirurgica 2003; Edizione Italiana sulla XVI Americana.
2. Barsnes NR, Goodpastor SE, Goss JA. Pharmacologic immunosuppression. Front Biosci 2004; 9: 411.
3. Nashan B, Curtis J, Ponticelli C, Mourad G, Jaffe J, Haas T. Everolimus and reduced-exposure cyclosporine in de novo renal-transplant recipients: a three-year phase II, randomized, multicenter, open-label study. Transplantation 2004; 78 (9): 1332.
4. Kreis H, Oberbauer R, Campistol JM, et al. Long-term benefits with sirolimus-based therapy after early cyclosporine withdrawal. J Am Soc Nephrol 2004; 15 (3): 809.



**STUDI DI SICUREZZA ED EFFICACIA DI REGIMI  
IMMUNOSOPPRESSIVI A BASE DI INIBITORI DI mTOR E  
SOSPENSIONE DEGLI INIBITORI DELLE CALCINEURINE IN  
PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI FEGATO**



# **SIROLIMUS IN MONOTERAPIA DOPO TRAPIANTO DI FEGATO (1)**

## **INTRODUZIONE**

I farmaci immunosoppressori Inibitori delle Calcineurine (CNI) hanno consentito di ottenere un importante incremento della sopravvivenza del graft e del paziente dopo trapianto d'organo solido, ma comportano una elevata incidenza di complicanze acute e croniche quali nefrotossicità, neurotossicità, ipertensione arteriosa e diabete mellito. La gestione di tali complicanze prevede classicamente la riduzione o eventuale sospensione della posologia degli CNI. Tale gestione consente di migliorare o risolvere le complicanze degli CNI, ma espone il paziente ad un maggiore rischio di rigetto. Dal 1999, il Sirolimus (SRL), un nuovo farmaco immunosoppressore, è stato utilizzato in pazienti sottoposti a trapianto di rene, previa approvazione della Food and Drug Administration (FDA)(2). Il SRL è un farmaco derivato dal micelio dello *Streptomyces hygroscopicus*. Il SRL è in grado di bloccare il segnale di trasduzione post-recettoriale dell'Interleuchina 2 (IL-2) interagendo con una famiglia di proteine di trasporto intracellulare FKBP, in particolare la proteina da 12-kd. Il SRL risulta quindi in grado di arrestare il ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S (3-6) mentre gli inibitori delle calcineurine (CNI) bloccano la trascrizione del gene dell'IL-2 (3, 4, 6).

Il SRL è un farmaco immunosoppressore in grado di inibire il sistema immunitario senza comportare nefrotossicità, neurotossicità o diabete. Le complicanze descritte in relazione all'uso del SRL sono leucopenia, trombocitopenia, ipertrigliceridemia, ipercolesterolemia, ed edemi delle articolazioni. Dato il lungo tempo di emivita, il SRL richiede un particolare monitoraggio dei dosaggi ematici poiché non vi è una immediata corrispondenza fra la dose somministrata ed i livelli ematici raggiunti (7, 8).

Scopo del presente studio è stato quello di riportare la nostra esperienza al riguardo di 27 pazienti che hanno utilizzato SRL in monoterapia dopo trapianto di fegato (LT).

## **MATERIALI E METODI**

Dall'ottobre 2000 a novembre 2006 sono stati sottoposti a LT 285 pazienti presso il Centro Trapianti di Fegato del Policlinico di Modena, di cui 39 da donatore vivente e 11 trapianti combinati con altri organi. In 27 casi (9.5%) la terapia immunosoppressiva principale a base di CNI è stata sostituita in differenti tempi con SRL.

La terapia immunosoppressiva iniziale post-LT è stata basata sugli CNI, Ciclosporina (CsA) o Tacrolimus (FK) associato a steroidi (metilprednisolone) somministrato in bolo alla riperfusione epatica e successivamente scalato fino alla sospensione a 3-6-o 12 mesi post trapianto. Il Micofenolato Mofetile (MMF) è stato introdotto, con contemporanea diminuzione dei livelli attesi di CNI, in caso di insufficienza renale pre-post trapianto.

La conversione da CNI a SRL in monoterapia è stata eseguita in 27 pazienti che hanno sviluppato dopo trapianto uno stato di nefrotossicità (14 casi, 81.8%), neurotossicità (4 casi, 14.8%), diabete (1 caso, 3.7%), ipertensione (1 caso, 3.7%), in 3 (11.1%) pazienti con diagnosi istologica di HCC multifocale oltre i criteri di Milano ed in 3 (11.1%) pazienti con diagnosi di Sarcoma di Kaposi.

Il protocollo di conversione da CNI a SRL è stato basato sulla sospensione dei CNI e contemporanea somministrazione di SRL nello stesso giorno alla dose iniziale di 0.10 mg/kg on day 1. Successivamente la posologia è stata di 0.05 mg/kg die per i successivi 3 giorni e successivamente aggiustati al fine di ottenere un livello ematico target di 8-10 ng/mL. La diagnosi di ipercolesterolemia è stata definita quando il livello di colesterolo era > 350 mg/dl, ipertrigliceridemia quando colesterolo > 500mg/dL, leucopenia quando WBC < 2000 /mm<sup>3</sup>, e piastrinopenia quando PLT < 30.000/mm<sup>3</sup>.

## RISULTATI

Le indicazioni per LT sono state: cirrosi epatica HCV-relata (14 casi), HBV-relata (4 casi) HCV-HBV-relata (4 casi), alcol-relata (3 casi), angiomatosi (1 caso), emocromatosi (1 caso). In 11 pazienti si è confermato all'esame istologico la presenza di almeno un epatocarcinoma (HCC).

L'età media dei pazienti è stata 56 anni (range: 33-65), in 18 Maschi e 9 Femmine.

La terapia immunosoppressiva iniziale è stata basata su CsA in associazione a Metilprednisolone in 19 casi, o su FK e metilprednisolone in 8 casi.

La terapia immunosoppressiva iniziale è stata convertita da CNI a SRL in monoterapia entro un range di 9-396 giorni post LT.

In 14 casi l'indicazione alla conversione è stata l'insorgenza di nefrotossicità (creatinina media= 2.2 mg/dl). In 11 casi (78.6%) si è ottenuta un significativo miglioramento della funzione renale dopo un periodo medio di 1 mese (range: 6–45 giorni), con creatininemia media di 1.0 mg/dL (range: 0.7–1.2 mg/dL). Nei rimanenti 3 (21.4%) casi non si è evidenziato un significativo miglioramento della funzione renale (creatininemia media dopo 1 mese: 1.6 mg/dL).

In tutti i 4 pazienti la cui indicazione alla conversione da CNI a SRL è stata la neurotossicità classificata come tremore, confusione o agitazione, si è riscontrato un immediato miglioramento dei sintomi. In due dei tre pazienti che hanno sviluppato un sarcoma di Kaposi (due cutanei ed uno cutaneo e viscerale), si è evidenziato una completa remissione, mentre in un caso si è evidenziato un miglioramento del quadro clinico, ma senza ottenere una completa remissione.

Nel paziente con diabete refrattario alla terapia insulinica, la conversione a SRL ha consentito di stabilizzare la malattia diabetica. Anche il paziente con ipertensione arteriosa refrattaria alla terapia farmacologica ha ottenuto un discreto compenso cardiocircolatorio dopo conversione a SRL in monoterapia.

Dopo un follow-up medio di 13 mesi post-conversione, i tre pazienti con conversione farmacologica a SRL ad intento preventivo della recidiva di epatocarcinoma oltre i criteri di Milano, non hanno sviluppato recidiva di HCC.

La terapia immunosoppressiva a base di SRL ha causato l'insorgenza delle seguenti complicanze: leucopenia in 4 casi (14.8%), rigetto acuto in 3 casi (11.1%), ipertrigliceridemia e/o ipercolesterolemia in 6 casi (22.2%). In 3/4 casi di leucopenia la sospensione del SRL e la



reintroduzione dei CNI avvenuta dopo 4-5 ed 8 mesi dalla conversione ha consentito di ottenere la completa remissione della leucopenia.

Da notare che 4 pazienti hanno sviluppato una recidiva di epatite HCV-relata durante la monoterapia con SRL. Durante la monoterapia con SRL si sono evidenziati inoltre due decessi, uno per aspergillosi polmonare ed uno per recidiva di HCC.

## DISCUSSIONE

L'uso degli CNI (CsA and FK) hanno sensibilmente migliorato la prevenzione ed il trattamento del rigetto acuto e cronico dopo trapianto di organo solido, consentendo di ottenere migliori sopravvivenze del graft e del paziente. Nonostante tali risultati, l'utilizzo degli SNI comporta l'insorgenza di diverse morbilità (e conseguenti mortalità) quali nefrotossicità, neurotossicità, diabete ed ipertensione arteriosa (9-11). Anche l'utilizzo del SRL comporta alcuni effetti collaterali, pancitopenia, coagulopatia, ipercolesterolemia, iperlipidemia, ipertrigliceridemia, ipertensione, ritardo di cicatrizzazione della ferita chirurgica, afte buccali (queste ultime solo in caso di iperdosaggio).

Negli ultimi anni, l'utilizzo del nuovo farmaco immunosoppressore SRL ha consentito di ridurre l'incidenza di tali morbilità, apparentemente a parità di efficacia antirigetto. SRL può essere introdotto dopo LT con due differenti modalità (12). Il primo metodo consiste nell'introdurre SRL in associazione agli CNI, entrambi a dosaggi minori rispetto alle rispettive monoterapie. Il secondo metodo consiste nell'utilizzare SRL in monoterapia a dosaggi pieni, utilizzando una prima dose di carico di 0.10 mg/kg/die, successivamente di 0.05 mg/kg/die per 3-4 giorni e successivamente regolati al fine di ottenere un livello ematico di 8-10 ng/mL. Tale metodica viene meno comunemente utilizzata a causa delle maggiori complicanze dosaggio-dipendente riportate del SRL.

Il presente studio riporta i risultati della conversione della terapia immunosoppressiva dopo LT da CNI a monoterapia a SRL. Nella nostra casistica la conversione a monoterapia con SRL è stata eseguita non solo per il trattamento degli effetti collaterali degli CNI, quali nefrotossicità, neurotossicità, diabete, ipertensione arteriosa, ma anche per il trattamento di Sarcoma di Kaposi e per la prevenzione della recidiva di HCC in pazienti ad alto rischio, sfruttando il riportato effetto antineoangiogenetico del SRL.

L'utilizzo del SRL in monoterapia è risultato sicuro ed efficace: in caso di nefrotossicità 11/14 (78.5%) pazienti hanno ottenuto una completa remissione; tutti i pazienti con neurotossicità hanno mostrato una risoluzione della patologia. Il SRL in monoterapia potrebbe essere quindi anche utilizzato in pazienti con insufficienza renale pre-LT.

In 2/3 casi di sarcoma di Kaposi hanno ottenuto una risoluzione completa ed 1/3 una regressione parziale.

Una ulteriore opportunità consentita dall'utilizzo del SRL è la profilassi dei pazienti HHV8 positivi pre-trapianto che risultano essere quindi a rischio di sviluppare un Sarcoma di Kaposi.

Ulteriori studi sono necessari per valutare prospetticamente meglio l'effetto antineoangiogenetico del SRL nella prevenzione della recidiva di HCC dopo LT.

In conclusione la monoterapia con SRL può essere considerata un efficace trattamento per la gestione delle complicanze degli CNI o Sarcoma di Kaposi dopo LT. Ulteriori studi sono necessari per valutare la possibilità di utilizzare il SRL come immunosoppressore primario in LT de-novo. Ulteriori studi sono inoltre necessari per valutare i potenziati effetti del SRL nella prevenzione della recidiva di HCC dopo LT.

## BIBLIOGRAFIA

1. Di Benedetto F, Di Sandro S, De Ruvo N, et al. Sirolimus monotherapy in liver transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39 (6): 1930.
2. Watson CJ, Friend PJ, Jamieson NV, et al. Sirolimus: a potent new immunosuppressant for liver transplantation. *Transplantation* 1999; 67 (4): 505.
3. Dumont FJ, Melino MR, Staruch MJ, Koprak SL, Fischer PA, Sigal NH. The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. *J Immunol* 1990; 144 (4): 1418.
4. Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Melino MR, Sigal NH. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol* 1990; 144 (1): 251.
5. Flanagan WM, Crabtree GR. Rapamycin inhibits p34cdc2 expression and arrests T lymphocyte proliferation at the G1/S transition. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 696: 31.
6. Thomson AW, Woo J. Immunosuppressive properties of FK-506 and rapamycin. *Lancet* 1989; 2 (8660): 443.
7. Flechner SM, Goldfarb D, Modlin C, et al. Kidney transplantation without calcineurin inhibitor drugs: a prospective, randomized trial of sirolimus versus cyclosporine. *Transplantation* 2002; 74 (8): 1070.
8. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003; 35 (3 Suppl): 7S.
9. Monsour HP, Jr., Wood RP, Dyer CH, Galati JS, Ozaki CF, Clark JH. Renal insufficiency and hypertension as long-term complications in liver transplantation. *Semin Liver Dis* 1995; 15 (2): 123.
10. Platz KP, Mueller AR, Blumhardt G, et al. Nephrotoxicity after orthotopic liver transplantation in cyclosporin A and FK 506-treated patients. *Transpl Int* 1994; 7 Suppl 1: S52.
11. Rimola A, Gavaler JS, Schade RR, el-Lankany S, Starzl TE, Van Thiel DH. Effects of renal impairment on liver transplantation. *Gastroenterology* 1987; 93 (1): 148.
12. Maheshwari A, Torbenson MS, Thuluvath PJ. Sirolimus monotherapy versus sirolimus in combination with steroids and/or MMF for immunosuppression after liver transplantation. *Dig Dis Sci* 2006; 51 (10): 1677.

# **UTILIZZO DEL SIROLIMUS NEL TRATTAMENTO DELLA INSUFFICIENZA RENALE DA INIBITORI DELLA CALCINEURINA DOPO TRAPIANTO DI FEGATO (1)**

## **INTRODUZIONE**

La nefrotossicità rappresenta la complicanza più frequente correlata all'utilizzo degli inibitori della calcineurina (CNI) nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato (LT). L'utilizzo cronico di CNI comporta infatti un grado variabile di danno tubulo-interstiziale associato a glomerulo-sclerosi focale. L'insorgenza di una severa insufficienza renale post-LT comporta inoltre una netta diminuzione della sopravvivenza del paziente a 24 e 36 mesi post LT.

Il Sirolimus (SRL), un nuovo farmaco immunosoppressore ad azione antifungina, immunosoppressiva ed antiproliferativa, è in grado di bloccare i fattori di trasduzione intracellulari che mediano il segnale dell'IL-2, arrestando il ciclo cellulare al passaggio tra la fase G1 ed S e quindi è in grado di inibire la replicazione cellulare delle cellule bersaglio (2, 3). Dai primi studi eseguiti, l'utilizzo del SRL, a differenza degli CNI, non comporta nefrotossicità, neurotossicità, diabete ed ipertensione arteriosa (3). La conversione della terapia immunosoppressiva da CNI a SRL si è dimostrata efficace nel trattamento a breve e lungo termine della insufficienza renale post-LT.

Scopo del presente studio è stato valutare la sicurezza ed efficacia della conversione della terapia immunosoppressiva a base di CNI a monoterapia con SRL in pazienti sottoposti a LT.

## MATERIALI E METODI

Da ottobre 2000 a ottobre 2007 sono stati eseguiti presso il Centro Trapianti di fegato di Modena 334 LT in 307 pazienti. In tutti i casi la terapia immunosoppressiva primaria si è basata sull'utilizzo degli CNI, associati a steroidi, ed eventualmente MMF e/o Basiliximab.

L'insorgenza di insufficienza renale, definita come VFG calcolata  $\leq 60$  ml/min di durata superiore ad un mese, si è evidenziata in 70/259 pazienti aventi una sopravvivenza superiore a 3 mesi. In 26 pazienti in cui l'insufficienza renale era stata attribuita agli CNI, il trattamento si è basato sulla conversione degli CNI a monoterapia con SRL.

Il protocollo di conversione da CNI a SRL è stato basato sulla sospensione dei CNI e contemporanea somministrazione di SRL alla dose iniziale di 0.10 mg/kg. Successivamente la posologia è stata di 0.05 mg/kg/die per i successivi 3 giorni e successivamente aggiustati al fine di ottenere una concentrazione ematica di 8-10 ng/mL.

<b>Età</b>	Media anni (range)	55 (34-70)
<b>Sesso</b>	M/F	21/5
<b>Tipo Trapianto</b>	Cadavere/vivente	24/2
<b>Indicazione</b>	HCV/HBV/Alcol	17/5/3
<b>HCC</b>	N° pz	10
<b>Periodo LT-Switch</b>	Mesi Media (range)	12.8 (0,2-43.4)
<b>Durata trattamento con SRL</b>	Mesi Media (range)	27 (2-71)
<b>Interruzione trattamento</b>	N° pz	4
<b>Follow-up</b>	Mesi Media (range)	40 (8-77)
<b>Decessi</b>	N° pazienti	4

Tabella 1. Caratteristiche del campione di 26 pazienti sottoposti a conversione da CNI a SRL in monoterapia dopo LT

Le caratteristiche del campione sottoposto a conversione da CNI a SRL in monoterapia dopo LT sono descritte nella Tabella 1. La conversione immunosoppressiva è avvenuta dopo un periodo medio di 12,8 mesi (range: 0,2-43,4) dal trapianto. Il follow-up medio post-trapianto è stato di 44,3 mesi (range: 8,4-76,7). Il follow-up medio dopo la conversione della terapia è stato di 30,5 mesi (range: 2-71,2).

**Analisi statistica**

Risultati sono stati espressi come media (range). Differenze fra le medie pre e post-trattamento sono state valutate con il test t di Student per dati appaiati. I dati sono stati analizzati con il software SPSS<sup>®</sup> 15.0; un valore di  $p \leq 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## RISULTATI

**Creatinina:** Il valore medio di creatinina pre-switch è risultato di 1,9 mg/dL (1,8-2,7 mg/dL); il valore medio di creatinina post-switch è risultato di 1,2 mg/dL (0,6-2,2 mg/dL). Una normalizzazione dei valori di creatinina (range di normalità: 0.6-1.2 mg/dl per le donne, 0.6-1.2 mg/dl per gli uomini) si è ottenuta in 15 (57,6%) pazienti, con valore medio pari a 1,0 mg/dl. Un miglioramento dei valori di creatinina (diminuzione del valore medio di creatinina rispetto alla media dei valori pre-switch) si è ottenuto in 8 (30,7%) casi, con valore medio di 1,6 mg/dL (1,4-2,2). In 3 (11,5%) casi non si è evidenziata alcuna diminuzione del valore di creatininemia. Rispetto ai valori pre-switch, il miglioramento medio è risultato statisticamente significativo in ogni timing analizzato (Figura 1).

**Urea:** Il valore medio di urea pre-switch è risultato di 74,7 mg/dL (39,5-124 mg/dL); il valore medio di urea post-switch è risultato pari a 55 mg/dL (9-116 mg/dL). Una normalizzazione dei valori si è riscontrata in 15 (57,6%) casi, ottenendo un valore medio di urea sierica di 38 mg/dL (25,2-49). Un miglioramento dei valori si è evidenziato in 8 (30,7%) pazienti, ottenendo un valore di urea sierica media pari a 77 mg/dL (55-104). In 3 (11,5%) pazienti non si è evidenziato alcun miglioramento. Rispetto ai valori pre-switch, il miglioramento medio è risultato statisticamente significativo in ogni timing analizzato (Figura 2).

**Filtrato Glomerulare:** Il valore medio di VFG pre-switch è risultato pari a 44,8 ml/min (18,8-82,4 ml/min), mentre il valore medio di VFG post-switch è risultato di 64,9 ml/min (18,8-175,6 ml/min). Una normalizzazione dei valori si è evidenziata in 15 (57,6%) pazienti, ottenendo una VFG media 81 ml/min (61-81). Un miglioramento dei valori di VFG si è evidenziato in 8 (30,7%) pazienti, ottenendo un valore medio di VFG pari a 44 ml/min (34,2-59). In 3 pazienti (11,5%), non si è evidenziato alcun beneficio. Rispetto ai valori pre-switch, il miglioramento medio è risultato statisticamente significativo in ogni timing analizzato (Figura 3).



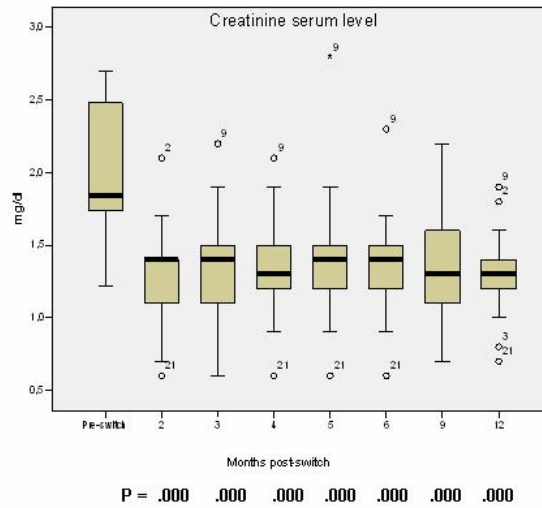


Figura 1. Andamento creatinina sierica pre e post conversione da CNI a SRL

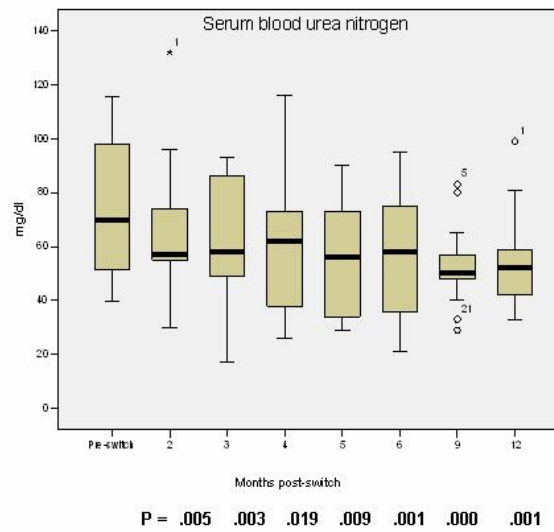


Figura 2. Andamento urea pre e post conversione da CNI a SRL

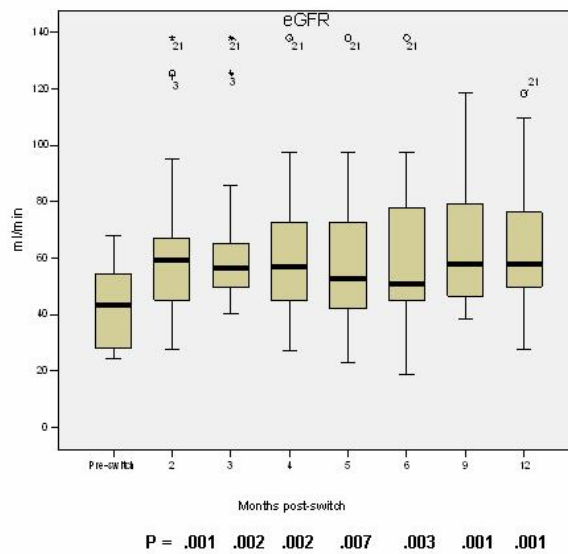


Figura 3. Andamento GFR pre e post conversione da CNI a SRL

In 4 (15.4%) casi si è dovuto interrompere il trattamento con SRL a causa dell'insorgenza rispettivamente di trombocitopenia, sierosite pleurica incoercibile, trombocitopenia con emorragia digestiva, eruzioni cutanee ed afte buccali. Il periodo di interruzione è risultato sempre inferiore a 20 mesi, con una media di 16.3 mesi (11-23). Il periodo medio di mantenimento è risultato pari a 59,7 mesi (Figura 4).

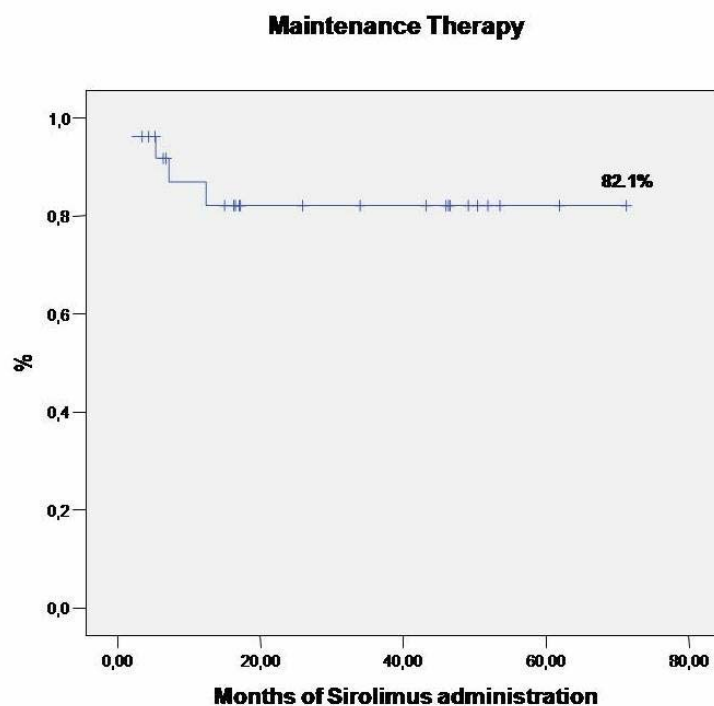


Figura 4. Intervallo libero da sospensione della terapia con SRL

**Complicanze:** Le complicanze più frequenti occorse durante monoterapia con SRL sono state la comparsa di ipercolesterolemia e ipertrigliceridemia (30.7% e 42.3% rispettivamente). La differenza media di colesterolemia e trigliceridemia fra i valori pre-switch e post switch è risultata significativa ai mesi 3-4-5-6-7 e ai mesi 3-4-5 rispettivamente (Figura 5). Da evidenziare anche l'insorgenza di 4 (15.3%) episodi di rigetto, di cui 3 lievi, regrediti con il solo incremento della posologia del SRL e uno regredito dopo trattamento con steroidi (Tabella 2).

Tipo	N pz./%
Rigetto cellulare	4 (15,3%)
Recidiva HCV	3 (11,5%)
Trombocitopenia	2 (7,6%)
Pancitopenia	1 (3,8%)
Ipercolesterolemia	8 (30,7)
Ipertrigliceridemia	11 (42,3%)

Tabella 2. Complicanze durante monoterapia con SRL

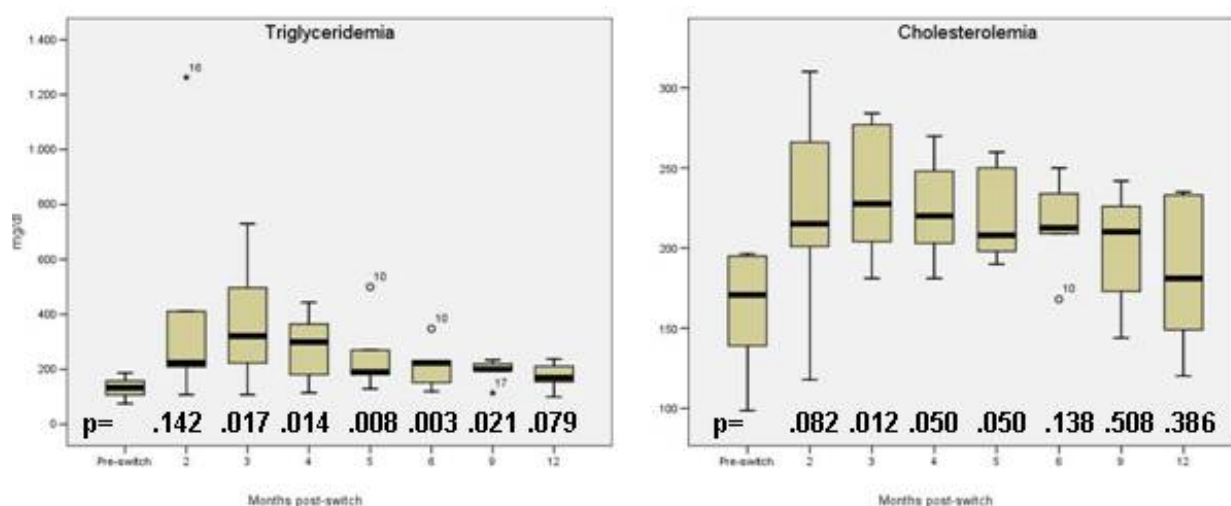


Figura 5. Assetto lipidico pre e post conversione da CNi a SRL

**Diabete:** 10 (38,5%) pazienti risultavano diabetici pre-switch, in 2 casi si trattava di diabete mellito pre-esistente al LT, mentre in 8 casi si trattava di diabete de-novo post LT, verosimilmente legato all'uso di CNi e/o steroidi. Nei 10 pazienti la glicemia media a digiuno risultava pari a 188 mg/dL. Nei due pazienti con diabete pre-trapianto, la conversione a SRL non ha comportato variazioni nell'assetto glicemico, mentre negli 8 pazienti con diabete iatrogeno (glicemia media a digiuno pari a 141 mg/dL), in 4 casi si è assistito ad una regressione completa (glicemia media a digiuno 100 mg/dl), in 4 casi si è assistito ad un miglioramento della glicemia media a digiuno, passata da 202 a 168 mg/dl.

Rispetto ai valori pre-switch, il miglioramento medio è risultato statisticamente significativo in ogni timing analizzato (Figura 6)

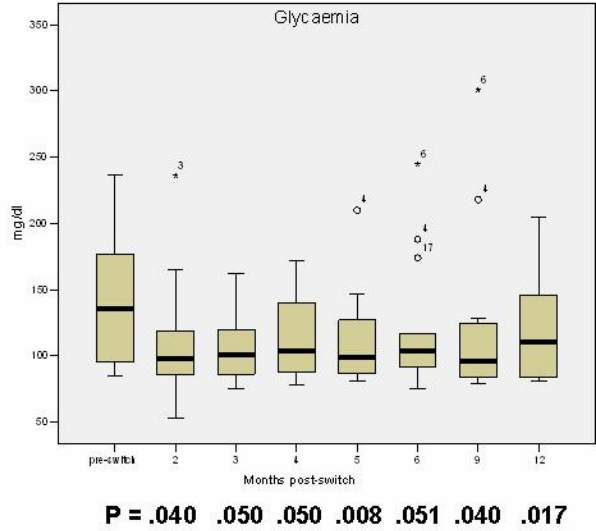


Figura 6. Assetto glicemico pre e post conversione da CNI a SRL

## DISCUSSIONE

L'insufficienza renale rappresenta una delle più frequenti complicanze dopo LT. Sebbene gli CNI (Ciclosporina e Tacrolimus) abbiano rivoluzionato il campo dei trapianti d'organo consentendo importanti miglioramenti nella sopravvivenza del paziente e del graft, il loro uso è stato associato a disfunzioni renali irreversibili in una importante proporzione di pazienti. Infatti gli CNI provocano danni strutturali e funzionali al rene: nella fase acuta della tossicità vi è una riduzione del GFR accompagnato da un decremento del flusso arterioso renale per contrazione delle arteriole renali afferenti, attraverso la regolazione dei recettori dell'angiotensina II (4, 5). La continua esposizione agli CNI, rende tali modificazioni progressive ed irreversibili (6, 7).

In una serie di oltre 800 pazienti, seguiti per 13 anni dopo trapianto, una severa insufficienza renale si è evidenziata nel 18%, metà dei quali hanno richiesto emodialisi o un trapianto di rene (8). Risulta noto inoltre che pazienti che sviluppano una severa insufficienza renale dopo LT hanno una sopravvivenza minore rispetto a chi non la sviluppa (9). Risulta quindi importante ricercare regimi immunosoppressivi non nefrotossici dopo LT.

Il Sirolimus (Rapamycin; Wyeth-Ayerst, Philadelphia, PA), è un macrolide prodotto dallo *Streptomyces hygroscopicus*, che ha mostrato di essere un potente immunosoppressore in LT, rene, cuore, e polmone (10-14) senza comportare la nefrotossicità tipica degli CNI.

Il meccanismo d'azione del SRL è differente da quello degli CNI, nonostante la struttura chimica sia simile (2). Tacrolimus e Ciclosporina inibiscono la calcineurina la quale a sua volta inibisce la trascrizione di citochine proinfiammatorie quale l'IL-2.(2, 15) Il SRL sfrutta il suo effetto immunosoppressivo in una fase successiva del ciclo cellulare, bloccando l'IL-2 attraverso l'interazione con una classe di chinasi conosciute come mammalian target of Rapamycin (mTOR) (2). A differenza degli CNI, SRL non provoca riduzione del tasso di filtrazione glomerulare (GFR) né nefrotossicità (16)

In pazienti sottoposti a trapianto di rene, il GFR è progressivamente migliorato durante un anno di follow-up in pazienti assegnati casualmente terapia di mantenimento con SRL e steroidi dopo precoce (3 mesi) sospensione della Ciclosporina (17). Inoltre la precoce sospensione della Ciclosporina quando i valori di creatinina risultano ancora inferiori a 3 mg/dL, sembra favorire la stabilizzazione o miglioramento della funzione renale (11).

Sono stati anche eseguiti trapianti di rene con successo in assenza di CNI. In uno studio, 61 pazienti erano stati randomizzati in terapia di mantenimento con SRL o Ciclosporina in aggiunta a Micofenolate Mofetile e steroidi, dopo induzione con Basiliximab. I pazienti in SRL

hanno mostrato livelli di creatinina sierica significativamente minori e Clearance della Creatinina significativamente maggiore a 6 e 12 mesi, con incidenza di rigetto e sopravvivenza del graft e paziente ad un anno simili (12)

Pochi studi hanno analizzato l'utilizzo del SRL dopo LT. Regimi a base di SRL in associazione a steroidi e CNI sono stati risultati tollerati, con bassa incidenza di rigetto, buone sopravvivenze di graft e paziente (18-20).

L'obiettivo di questo studio è stato determinare se la conversione da CNI a SRL in monoterapia si associa ad una regressione della nefrotossicità con una accettabile incidenza di rigetto. I risultati del presente studio hanno evidenziato come la conversione da CNI a SRL in monoterapia dopo LT comporti un netto progressivo miglioramento della funzione renale, come risultato dai valori di creatininemia, uremia, e Clearance della Creatinina, a partire già da un mese post-switch.

Gli effetti collaterali della terapia immunosoppressiva a base di SRL riscontrati sono stati principalmente la comparsa di ipertrigliceridemia e ipercolesterolemia, mentre l'incidenza e gravità di rigetto sono risultati sostanzialmente accettabili. L'aumento severo dei dosaggi di trigliceridi e colesterolo che si è evidenziato può essere controllato con l'introduzione di statine. Un risultato secondario della conversione a SRL in monoterapia è stato inoltre un riscontrato miglioramento della tolleranza glucidica in pazienti che avevano precedentemente sviluppato un diabete da CNI.

La tollerabilità del SRL in monoterapia è risultata elevata comportando una alta percentuale di mantenimento della terapia (82% dei pazienti) a 5 anni dallo switch.

Bisogna comunque evidenziare come la nefrotossicità post-LT sia multifattoriale e condizioni quali una pregressa insufficienza renale, ipertensione, diabete, possono condizionare i risultati della conversione a SRL.

Ulteriori studi sono necessari per valutare l'incidenza di rigetto cronico nel lungo termine e per confrontare l'esperienza in monoterapia di mantenimento con SRL con altri protocolli che prevedano il confronto con gruppi di pazienti trattati con minimizzazione degli effetti collaterali degli CNI.

## BIBLIOGRAFIA

1. Di Benedetto F, Di Sandro S, De Ruvo N, et al. Utilizzo del Sirolimus nel paziente affetto da insufficienza renale da inibitori della calcineurina dopo trapianto di fegato. Atti del XXXI Congresso Nazionale della Società Italiana Trapianti di Organo 2007; CD Abstract.
2. Sehgal SN. Rapamune (Sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit* 1995; 17 (6): 660.
3. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003; 35 (3 Suppl): 7S.
4. Avdonin PV, Cottet-Maire F, Afanasjeva GV, Loktionova SA, Lhote P, Ruegg UT. Cyclosporine A up-regulates angiotensin II receptors and calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 1999; 55 (6): 2407.
5. Graham RM. Cyclosporine: mechanisms of action and toxicity. *Cleve Clin J Med* 1994; 61 (4): 308.
6. Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 1988; 20 (3 Suppl 3): 759.
7. Myers BD, Sibley R, Newton L, et al. The long-term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. *Kidney Int* 1988; 33 (2): 590.
8. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, et al. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation* 2001; 72 (12): 1934.
9. Pawarode A, Fine DM, Thuluvath PJ. Independent risk factors and natural history of renal dysfunction in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2003; 9 (7): 741.
10. Chang GJ, Mahanty HD, Quan D, et al. Experience with the use of sirolimus in liver transplantation--use in patients for whom calcineurin inhibitors are contraindicated. *Liver Transpl* 2000; 6 (6): 734.
11. Diekmann F, Waiser J, Fritsche L, Dragun D, Neumayer HH, Budde K. Conversion to rapamycin in renal allograft recipients with biopsy-proven calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity. *Transplant Proc* 2001; 33 (7-8): 3234.
12. Flechner SM, Goldfarb D, Modlin C, et al. Kidney transplantation without calcineurin inhibitor drugs: a prospective, randomized trial of sirolimus versus cyclosporine. *Transplantation* 2002; 74 (8): 1070.
13. Gonwa TA, Hricik DE, Brinker K, Grinyo JM, Schena FP. Improved renal function in sirolimus-treated renal transplant patients after early cyclosporine elimination. *Transplantation* 2002; 74 (11): 1560.
14. Snell GI, Levvey BJ, Chin W, et al. Sirolimus allows renal recovery in lung and heart transplant recipients with chronic renal impairment. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21 (5): 540.
15. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66 (4): 807.
16. DiJoseph JF, Sharma RN, Chang JY. The effect of rapamycin on kidney function in the Sprague-Dawley rat. *Transplantation* 1992; 53 (3): 507.
17. Johnson RW, Kreis H, Oberbauer R, Brattstrom C, Claesson K, Eris J. Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure. *Transplantation* 2001; 72 (5): 777.

18. Pridohl O, Heinemann K, Hartwig T, et al. Low-dose immunosuppression with FK 506 and sirolimus after liver transplantation: 1-year results. *Transplant Proc* 2001; 33 (7-8): 3229.
19. Trotter JF, Wachs M, Bak T, et al. Liver transplantation using sirolimus and minimal corticosteroids (3-day taper). *Liver Transpl* 2001; 7 (4): 343.
20. Fairbanks KD, Eustace JA, Fine D, Thuluvath PJ. Renal function improves in liver transplant recipients when switched from a calcineurin inhibitor to sirolimus. *Liver Transpl* 2003; 9 (10): 1079.



# **PROTOCOLLO IMMUNOSOPPRESSIVO A BASE DI EVEROLIMUS (CERTICAN®) IN MONOTERAPIA, SENZA INIBITORI DELLE CALCINEURINE, IN TRAPIANTO DI FEGATO DE NOVO**

## **INTRODUZIONE**

L'immunosoppressione dopo trapianto di fegato (LT) basata sugli inibitori della calcineurina (CNI) ha consentito significativi miglioramenti della sopravvivenza di graft e pazienti attraverso la riduzione dell'incidenza di rigetto acuto. La studio funzione renale dopo LT è uno dei campi che ha assunto sempre maggiore interesse negli ultimi anni. L'importanza delle disfunzioni renali è stata descritta dal registro di 36849 LT negli USA (1). In tale rapporto l'insufficienza renale cronica, definite come stima del tasso di filtrazione glomerulare (eGFR)  $\leq 29$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, viene riportata con una incidenza del 20% entro 3 anni dopo LT ed associata con un incremento del rischio di morte di 4 volte tra pazienti sottoposti a trapianto di organo (1).

La causa principale di disfunzione renale dopo LT è relazionabile all'uso di CNI (2, 3), e tale complicanza risulta già evidente entro 6 mesi dopo LT (4). Può pertanto essere utile prevenire l'insufficienza renale cronica già prima dei 6 mesi dopo LT, al fine di migliorare l'outcome dei pazienti (4). Ulteriori complicanze relazionabili all'uso di CNI sono l'ipertensione arteriosa, il diabete, problematiche neurologiche, irsutismo ed ipertrofia gengivale.

Le finalità dei principali recenti studi sull'immunosoppressione dopo LT sono finalizzati a ricercare regimi immunosoppressivi che consentano di confermare gli ottimi risultati nella terapia antirigetto, minimizzando gli effetti collaterali.

Everolimus (Evr) (Certican<sup>®</sup>, Novartis Pharma GmbH; Basel, Switzerland) è un nuovo inibitore della p70S6 kinase, in grado di arrestare il ciclo cellulare dei linfociti e cellule del muscolo liscio, dalla fase G<sub>1</sub> alla fase S (5). L'effetto immunosoppressivo di Evr si estrinseca attraverso l'inibizione della proliferazione delle cellule T e B mediata dall'interleuchina 2(IL-2) e IL-15.

Sono riportati pochi studi sull'uso di Evr dopo LT. In un recente studio in fase I non è stata evidenziata differenza clinica statistica nei principali parametri di laboratorio né un incremento nell'incidenza di infezioni in caso di associazione di Evr con Ciclosporina (CsA) e Steroidi (6).

Dati preliminari dalla studio RAD H2401 eseguito in 144 pazienti dopo LT in terapia di mantenimento hanno fornito l'evidenza che concentrazioni controllate di Evr consentono l'eliminazione degli CNI, senza incrementare i rischi di rigetto acuto rispetto a pazienti mantenuti con CNI (7).

Scopo del presente studio monocentrico, randomizzato, in aperto, fase II, è stato confrontare un regime immunosoppressivo a base di CsA con un regime a base di Evr monoterapia dopo LT *de novo* allo scopo di verificare la superiorità della funzione renale a parità di efficacia e sicurezza.

A nostra conoscenza tale studio è il primo in letteratura che riporta dati di un protocollo immunosoppressivo con Evr in monoterapia precoce dopo LT.

## MATERIALI E METODI

### Disegno dello studio

Tale studio è basato su un protocollo a 12 mesi, prospettico, monocentrico, in aperto, randomizzato che consiste di un periodo di screening di 10 giorni post-LT seguito da una randomizzazione 2:1, rispettivamente fra Gruppo Evr e Gruppo CsA (Figura 1).

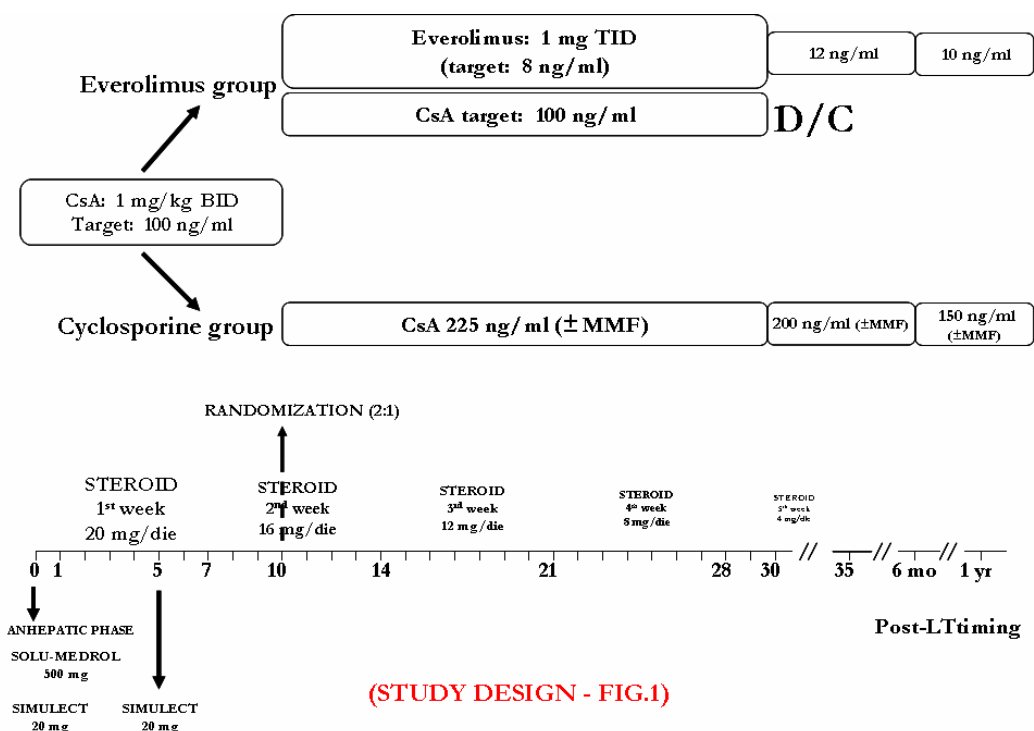


Figura 1. Schema Protocollo Everolimus in monoterapia dopo LT

**Periodo di Screening:** Durante i primi 10 gg post-LT (periodo di screening) tutti i pazienti hanno ricevuto una induzione con Basiliximab (Simulect<sup>®</sup>, Novartis Pharma GmbH; Basel, Switzerland) 20 mg e.v. al tempo 0 (entro 6 ore dalla riperfusione epatica) e dopo 5 giorni post LT. Metilprednisolone è stato infuso e.v. alla dose di 500 mg al tempo 0 (fase anepatica) e 20 mg dal giorno 1.

Tutti i pazienti hanno ricevuto prednisone ai seguenti dosaggi: 20 mg/die fino al giorno 7, 16 mg/die dal giorno 8 al giorno 14, 12 mg/die dal giorno 15 al giorno 21, 8 mg/die dal giorno 22 al giorno 28, 4 mg/die fino al giorno 35 e successivamente sospeso. In caso di malattie colestatiche il prednisone è stato mantenuto a 4 mg/die per tutto il follow-up.

In assenza di complicanze postoperatorie severe, alla 10<sup>a</sup> giornata i pazienti sono stati randomizzati nei due gruppi di studio. Complicanze severe sono state definite quali primary non function, ritrapianto precoce, infezioni severe non controllabili, complicanze chirurgiche maggiori.

Gruppo Evr: Everolimus monoterapia: La dose iniziale di Evr è stata di 2.0 mg/die, allo scopo di ottenere un livello C<sub>0</sub> di 4-8 ng/mL. Tale livello target viene incrementato a 12 (10-14) ng/mL a partire dalla 30<sup>a</sup> giornata, fino alla fine del primo anno e successivamente di 10 ng/mL (8-10). La dose di CsA è stata mantenuta ad un livello target C<sub>0</sub> di 100 (75-125) ng/ml fino al giorno 30, e successivamente sospesa (Figura 1).

Gruppo CsA: CsA standard: La dose di CsA è stata al fine di ottenere un livello C<sub>0</sub> di 250 (200-300) ng/ml fino al giorno 30, quindi ridotta per ottenere un livello ematico di 200 (150-250) ng/ml fino alla fine del 6° mese e di 150 ng/ml successivamente. In caso di complicanze legate all'uso di CNI, la dose giornaliera di CsA poteva essere ridotta al fine di ottenere una riduzione del 70% dei valori ematici, con contemporanea introduzione del Micofenolato Mofetile (MMF) alla dose iniziale di 1 gr BID seguita da un dosaggio di mantenimento di 500 mg TID (Figura 1)

Una riduzione o sospensione del dosaggio di Evr o CsA fino a 10 giorni era consentita in caso di eventi avversi moderati o severi relazionabili ai farmaci in studio. In caso di malattie colestatiche il prednisone è stato mantenuto a 4 mg/die per tutto il follow-up in entrambi i gruppi.

## **Obiettivi**

L'obiettivo primario dello studio è stato la valutazione dell'utilizzo di Evr in monoterapia in LT *de novo* al fine di valutare la superiorità della funzione renale rispetto al gruppo controllo a 3, 6 e 12 mesi post-LT. L'endpoint primario di efficacia, la funzione renale, è stato valutato con il dosaggio della creatinina sierica, con il calcolo del eGFR utilizzando la formula MDRD e attraverso il calcolo della clearance della creatinina (cCC) secondo la formula di Cockcroft-Gault, a 3, 6 e 12 mesi post-LT.

Si è valutata l'incidenza di insufficienza renale cronica Stadio 3, definite come un valore di eGFR  $\leq 60$  mL/min/1.73<sup>2</sup> per almeno un mese, in accordo con le linee guida della National Kidney Foundation (8, 9), durante i primi 12 mesi di follow-up nei due gruppi.

Gli obiettivi secondari sono stati il calcolo dell'incidenza di rigetti acuti, perdita del graft, sopravvivenza del paziente a 3, 6 e 12 mesi post-LT tra i due gruppi. La diagnosi e gradazione di rigetto sono state valutate istologicamente, secondo i criteri di Banff (10).

## **Etica**

L'arruolamento dei pazienti è iniziato nel settembre 2006 e terminato nel gennaio 2008. Lo studio è iniziato dopo approvazione del Comitato Etico locale di Modena, seguendo i principi della buona pratica clinica e la dichiarazione di Helsinki. Tutti i pazienti partecipanti allo studio hanno sottoscritto un consenso informato.

## **Criteri di inclusione/esclusione**

Criteri d'inclusione comprendevano: pazienti di entrambi i sessi, di età compresa tra 18 e 67 anni, pazienti che ricevono un primo LT da donatore cadavere con trapianto funzionante al momento della randomizzazione, tempo d'ischemia fredda minore di 12 ore, età del donatore compresa tra 15 e 90 anni, consenso informato firmato dal paziente.

Criteri di esclusione al momento dell'arruolamento comprendevano: trapianto multiorgano, LT in urgenza, re-OLT, LT da donatore vivente o da cadavere a cuore non battente, incompatibilità AB0, paziente HIV positivo, presenza di ipersensibilità ad uno dei farmaci dello studio, oppure a farmaci con struttura simile a everolimus (p.es. macrolidi), gravidanza (test positivo all'hCG con valori > 5 mIU/ml) o allattamento, donne potenzialmente fertili, che non facevano uso di contraccettivi affidabili ed approvati per tutta la durata dello studio e per i tre mesi successivi all'interruzione del trattamento in studio, partecipazione ad altro protocollo sperimentale.

Criteri di esclusione al momento della randomizzazione hanno compreso: ipercolesterolemia > 350mg/dl, ipertrigliceridemia > 500mg/dL, leucopenia severa (< 2000 /mm<sup>3</sup>), piastrinopenia (< 30.000/mm<sup>3</sup>), infezioni sistemiche gravi, eGFR  $\geq$ 29 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>.

## **Sicurezza, tollerabilità ed efficacia**

Tutti gli eventi avversi sono stati registrati. I valori ematologici, urinari, biochimici, clinici, sono stati registrati ai giorni 1, 7, 14, e 21 e ai mesi 1, 2, 3, 6, 9, e 12 dopo LT. Tutti i farmaci concomitanti sono stati registrati. Pazienti sono stati definiti come prematuramente usciti dallo studio in caso di ritiro del consenso, perdita al follow-up, perdita del graft, ritrapianto, morte, sospensione del farmaco >15 giorni, più di due episodi di rigetto durante il follow-up.

## **Dosaggio dell'Evr**

Tutti i prelievi di sangue sono stati eseguiti al mattino prima della somministrazione dell'immunosoppressore primario. Evr è stato dosato con analizzatore TDxFLx (Abbott Diagnostic, IL; USA) con sistema semiautomatico (Innofluor<sup>®</sup> Certican<sup>®</sup> Assay System, Seradyn Inc, IN; USA), con immunodosaggio a polarizzazione omogenea fluorescente (11). Il limite della quantificazione di Evr è di 2 ng/mL. Dosaggi di Evr e CsA sono stati analizzati ai giorni 7, 14, e 21 e ai mesi 1, 2, 3, 6, 9, e 12.

Tutti i pazienti hanno ricevuto una profilassi antibiotica. Gli esami di screening per infezioni batteriche sono stati: esami colturali di sangue, urine ed escreato faringeo due volte/settimana fino alla dimissione. Per il primo mese post LT è stata somministrata nistatina orale. La profilassi per il CMV, è consistita in 5 mg/kg e.v. di gancyclovir per i primi 6 giorni, e successivamente 1g TID per i primi 3 mesi in pazienti ad alto rischio quali riceventi CMV-sieronegativi trapiantati da donatori CMV-sieropositivi (12). Una infezione da CMV è stata diagnosticata attraverso il dosaggio dell'antigene precoce CMVpp65 (13). Tutti i pazienti hanno ricevuto un trattamento profilattico della Pneumocisti Carini, con Trimetoprim 80 mg e Sulfametossazolo 400 mg (equivalente ad una compressa/die di Bactrim<sup>®</sup>), a partire dal momento in cui la somministrazione orale poteva essere tollerata e per i primi 6 mesi dopo il trapianto.

## **Analisi statistica**

L'ipotesi nulla è stata l'assenza di differenza nella media di cCC tra i due gruppi di studio. Per calcolare la dimensione campionaria si è ipotizzata una media di cCC di 100±30 ml/min nel Gruppo Evr e di 70±30 ml/min nel Gruppo CsA. Considerando un test a due code con  $\alpha=0.05$  e  $\beta=0.1$ , la dimensione campionaria richiesta per ottenere una differenza statisticamente significativa è stata di 50 casi, di cui 32 nel Gruppo Evr e 17 nel gruppo CsA nel contesto della randomizzazione 2:1.

Dati continui sono espressi come media  $\pm$  DS e sono stati comparati con il test t di Student a due code. Confronti fra gruppi per dati categorici sono stati eseguiti con test  $\chi^2$  con correzione di continuità di Yates o test di Fisher quando appropriato. Sopravvivenza di graft e paziente sono stati calcolati con il metodi di Kaplan-Meier e comparati con log-rank test. La significatività statistica è stata valutata per  $p < 0.05$ .

La popolazione intention-to-treat include tutti i pazienti randomizzati, mentre la popolazione per-protocol include i pazienti randomizzati che hanno aderito al protocollo per tutta la durata del follow-up o comunque fino all'eventuale esclusione dallo studio. Per i parametri di sicurezza è stata utilizzata la popolazione intention-to-treat, mentre per i parametri di efficacia è stata utilizzata la popolazione per-protocol. I dati sono stati calcolati fino alla fine del follow-up. L'analisi statistica è stata eseguita con il software SPSS<sup>®</sup> for Windows versione 15.0.0 mentre l'analisi della dimensione campionaria è stata eseguita con Intercooled Stata<sup>®</sup> 9.2 for Windows.

## RISULTATI

### Anagrafica e condizioni pre-LT

Sono stati inseriti nello studio 50 pazienti, di cui 33 nel gruppo Evr e 17 nel gruppo CsA. Le caratteristiche di base sono riassunte nella Tabella 1. Non si sono evidenziate nelle caratteristiche di base differenze statisticamente significative nei due gruppi di confronto (Tabella 1).

L'età media al trapianto è risultata di 53.5 anni; il MELD medio pre-LT è stato di  $19.6 \pm 7.5$  (range 8-36), non statisticamente significativo tra i due gruppi ( $19.1 \pm 7.1$  e  $20.6 \pm 8.3$  nel gruppo Evr e CsA,  $p=NS$ ).

Pazienti		Gruppo Evr	Gruppo CsA	p
<b>Sesso</b>	M/F(%)	23(69.7) / 10(30.3)	12(70.6) / 5(29.4)	1
<b>Età media</b>	Anni	$52.6 \pm 9.5$	$54.8 \pm 7.2$	0.40
<b>BMI</b>		$25.3 \pm 3.1$	$25.5 \pm 2.8$	0.83
<b>MELD (al LT)</b>		$19.2 \pm 7.2$	$20.6 \pm 8.3$	0.52
<b>Mediana follow-up</b>	Mesi	$8.0 \pm 4.7$	$7.6 \pm 4.8$	0.78

Tabella 1. Caratteristiche del ricevente. BMI=Indice di Massa Corporea

L'indicazione più frequente per LT è stata la cirrosi post-necrotica in entrambi i gruppi; l'assetto virale (HCV ed HBV positività) e la proporzione di HCC sono risultate simili nei due gruppi di confronto (Tabella 2).

	Gruppo Evr	Gruppo CsA	p
<b>INDICAZIONE LT</b>			
Cirrosi post-necrotica	27 (81.8%)	10 (58.8%)	0.1
Cirrosi colestatica	4 (12.1%)	2 (11.8%)	
Cirrosi criptogenetica	0 (0.0%)	2 (11.8%)	
Policistosi epatica	1 (3.0%)	0 (0.0%)	
Malattia di Wilson	0 (0.0%)	2 (11.8%)	
Cirrosi alcolica	1 (3.0%)	1 (5.9%)	
<b>HCC</b>	20 (60.6%)	8 (47.1%)	0.54
<b>STATO VIRALE</b>			
HCV Ab +	13 (39.4%)	5 (29.4%)	0.7
HBsAg +	13 (39.4%)	5 (29.4%)	0.7
No virus	7 (21.2%)	7 (41.2%)	0.25

Tabella 2. Indicazione per LT ed assetto virale



La tecnica chirurgica utilizzata in tutti i pazienti è stata la piggy-back con anastomosi cavo-cavale termino-laterale ed il confezionamento di shunt porto-cavale temporaneo durante l'epatectomia (14, 15). Tutti i pazienti hanno ricevuto un fegato intero da donatore cadavere, con soluzione di perfusione Celsior. Le caratteristiche del donatore sono riassunte nella Tabella 3.

<b>Parametri</b>		<b>Gruppo Evr</b>	<b>Gruppo CsA</b>	<b>p</b>
<b>Sesso</b>	M/F (%)	21(63.6)/12(36.4)	10 (58.8)/7(41.2)	0.98
<b>Età</b>	Anni	57.8±14.5	65.2±18.0	0.12
<b>Causa di morte</b>	CVA/MVA (%)	22 (66.7)/11 (33.3)	11 (64.7)/6 (35.3)	0.86
<b>Macrosteatosi</b>	No (%)	18(54.5)	10(58.8)	0.32
	Lieve (%)	15(45.5)	6(35.3)	
	Moderata (%)	0	1(5.9)	
<b>Microsteatosi</b>	No (%)	20(60.6)	11(64.7)	0.58
	Lieve (%)	11(33.3)	6(35.3)	
	Moderata (%)	0	0	
	Severa (%)	2(6.1)	0	
<b>Ischemia fredda</b>	Minuti	382±106	386±98	0.91
<b>Ischemia calda</b>	Minuti	42.2±10.7	36.2±8.4	0.1

Tabella 3. Caratteristiche del donatore.

### **Sopravvivenza e cause di morte**

Dopo un follow-up medio di  $8.5 \pm 3.7$  mesi ( $9.0 \pm 4.7$  mesi per Gruppo Evr e  $7.0 \pm 3.0$  mesi per il gruppo CsA,  $p=NS$ ) la sopravvivenza a 6 mesi ed a un anno, dei pazienti non esclusi a posteriori dallo studio, è stata nel Gruppo Evr del 89.6% e 83.6% e nel Gruppo CsA del 76.4 e 76.4 ( $p=NS$ , Figura 2).

Nel gruppo Evr sono deceduti 2 pazienti, per recidiva HCV dopo 8 mesi dal LT ed uno per embolia polmonare 5 mesi dopo LT con buon funzionamento del graft.

Nel Gruppo CsA, 3 pazienti sono deceduti rispettivamente per polmonite batterica dopo un mese, rottura di aneurisma dell'arteria splenica 4 mesi e recidiva di HCC dopo 4 mesi.

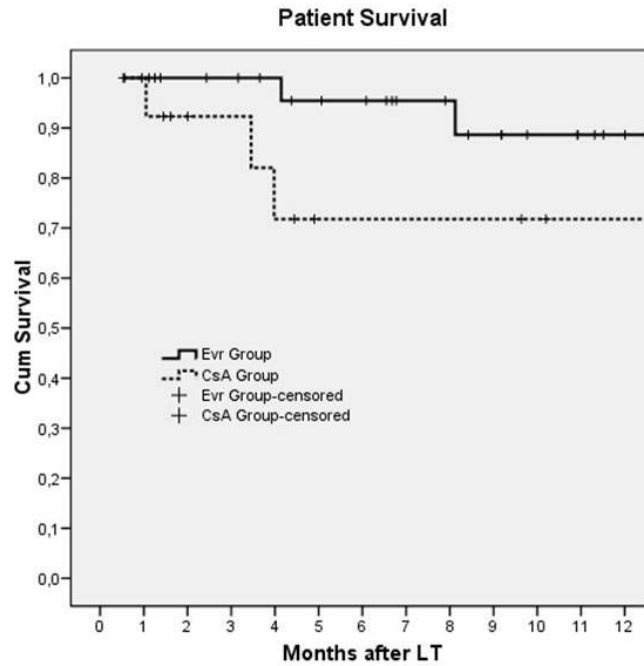


Figura 2. Sopravvivenza dei pazienti non esclusi dallo studio

### Funzione renale

L'andamento dei principali parametri di funzione renale (creatinina sierica, cCC, MDRD) sono descritti nelle Figure 3-5.

Nessun paziente è stato sottoposto a dialisi nel pre e post LT. La media della cCC al momento della randomizzazione (POD 10) è risultata di  $113 \pm 40$  e  $103 \pm 33$  rispettivamente nel gruppo Evr e CsA ( $p=0.39$ ). La media di MDRD alla randomizzazione è risultata di  $83.3 \pm 27.6$  ml/min/ $1.73^2$  e  $72.1 \pm 26.5$  ml/min/ $1.73^2$  nel gruppo Evr e CsA ( $p=NS$ ).

I valori di cCC e MDRD sono risultati simili tra i due gruppi di studio dopo 30 giorni dal trapianto con  $115 \pm 71.1$  e  $95.4 \pm 53.1$  nel gruppo Evr rispetto a  $83.3 \pm 30.5$  e  $65.1 \pm 24.0$  nel gruppo CsA ( $p$  per cCC: 0.13,  $p$  per MDRD: 0.057). A due mesi entrambi i parametri divengono significativi e lo rimangono per tutta la durata dello studio (Figura 4-5). La media di cCC e MDRD a 3 mesi è risultata infatti  $106.8 \pm 54.7$  and  $87.9 \pm 33.4$  nel gruppo Evr e di  $64.3 \pm 33.3$  e  $50.9 \pm 24.3$  nel gruppo CsA ( $p$  per cCC: 0.047,  $p$  per MDRD: 0.012). A 6 mesi cCC e MDRD sono risultati di  $97.7 \pm 33.4$  e  $82.3 \pm 23.4$  nel gruppo Evr mentre nel gruppo CsA è risultata  $69.3 \pm 26.0$  e  $52.5 \pm 15.8$  ( $p$  per cCC: 0.067,  $p$  per MDRD: 0.007). A 12 mesi cCC e MDRD sono risultati  $98.9 \pm 29.3$  e  $79.4 \pm 20.5$  nel gruppo Evr mentre nel gruppo CsA è risultata di  $78.7 \pm 25.2$  e  $57.9 \pm 8.3$  ( $p$  per cCC: 0.0246,  $p$  per MDRD: 0.066).

# FUNZIONALITÀ RENALE

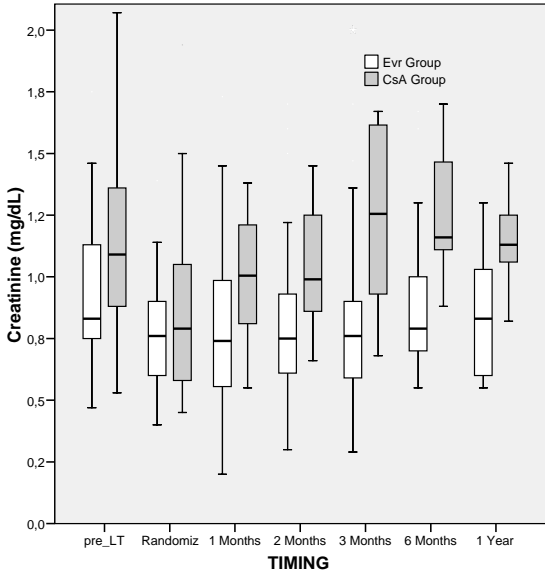


Figura 3. Creatinina sierica

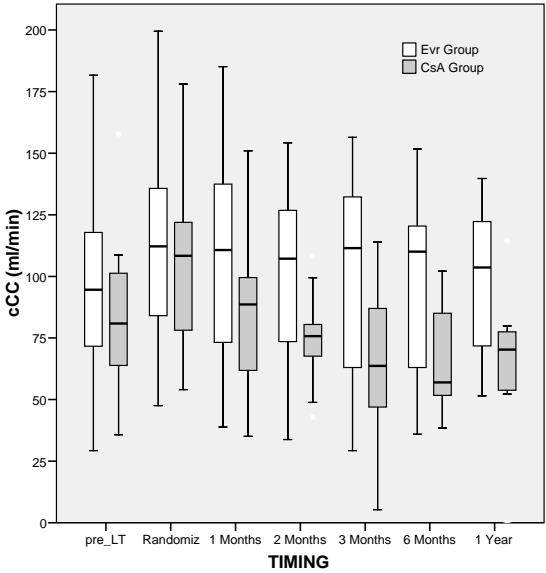


Figura 4. Clearance della Creatinina

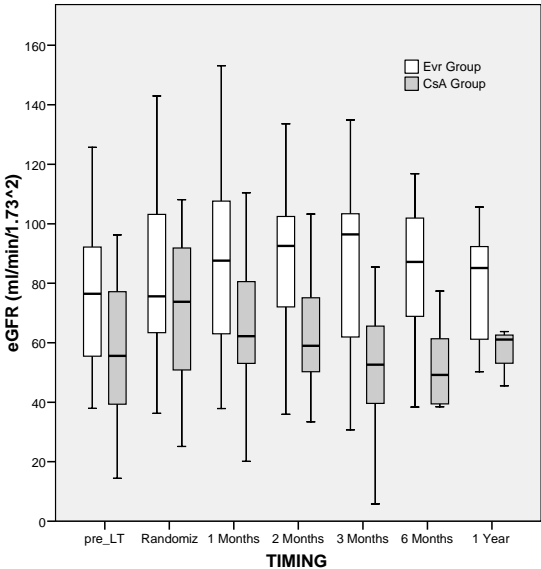


Figura 5. Filtrato glomerulare

Una insufficienza renale cronica stadio 3, secondo la definizione della National Kidney Foudation (9) si è sviluppata in 9/17 (58.8%) pazienti nel gruppo CsA ed in 3/33 (9.0%) pazienti nel gruppo Evr ( $p= 0.001$ ). I 9 pazienti in stadio 3, nel gruppo CsA sono stati trattati con la riduzione del 30% del livello ematico atteso e con l'introduzione del MMF.

### Sicurezza e tollerabilità

L'incidenza di complicanze è riassunta nella Tabella 4. Nel Gruppo Evr, 2 (6%) pazienti hanno presentato afte buccali in concomitanza di iperdosaggi del valore sierico di Evr (entrambi >17 ng/dl), regredite dopo il rientro a range dei livelli sierici.

	<b>Gruppo Evr</b>	<b>Gruppo CsA</b>	<b>p</b>
<b>Infezione di ferita</b>	2(6%)	1(5.8%)	NS
<b>Laparocele</b>	6(18.1)	2(11.7%)	NS
<b>Necrosi fasciale</b>	1(3%)	0	NS
<b>Stenosi-fistola biliare</b>	4(12.1%)	3(17.6%)	NS
<b>Anemia</b>	14(42%)	7(41.1%)	NS
<b>Leucopenia</b>	1(3%)	1(5.8%)	NS
<b>Trombocitopenia</b>	0	0	NS
<b>Afte buccali</b>	2(6%)	0	NS
<b>Eritemi cutanei</b>	2(6%)	0	NS
<b>Infezioni maggiori</b>	3(9%)	2(11.7%)	NS
<b>Embolia polmonare</b>	1(3%)	0	NS
<b>Trombosi-stenosi arteria epatica</b>	0	0	NS
<b>Dislipidemia</b>	2(6%)	0	NS
<b>Sospensione farmaco per effetti collaterali</b>	0	1(5.8%)	NS
<b>Complicanze neurologiche minori</b>	1(3%)	3(17.6%)	NS
<b>Rigetto acuto</b>	3(9%)	2(11.7%)	NS

Tabella 4. Complicanze

La complicanza maggiore (seppure non statisticamente significativa) che si è evidenziata nel gruppo Evr è risultata l'incidenza di laparocele (6/33, 18.1% vs 1/17, 5.8%,  $p=0.4$ ).

Nel Gruppo Evr sono usciti prematuramente dallo studio 4 (12.1%) pazienti (1 ReLT per stenosi dell'anastomosi cavale, 1 epatite autoimmune de-novo, 1 morte per embolia polmonare, 1 morte per recidiva HCV), mentre nel gruppo CsA sono usciti 4 (23.5%) pazienti (1 insufficienza renale acuta severa, 1 epatite autoimmune de novo, 1 decesso per polmonite batterica, 1 decesso per recidiva HCC) (Figura 6).

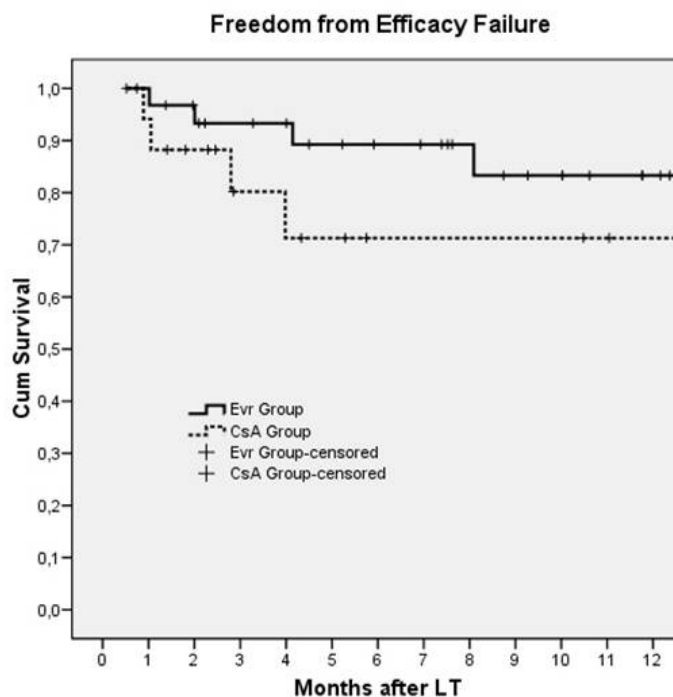


Figura 6. Freedom from efficacy Failure Curve

Nessuna complicanza neurologica maggiore (definita come sindrome cerebellare, leucoencefalopatia, sindrome da mielinolisi pontina centrale, deficit neurologici focali (16)) si è evidenziata dopo randomizzazione in entrambi i gruppi di studio. Non si sono evidenziate trombosi dell'arteria epatica in entrambi i gruppi di studio.

### Rigetto

In 3/33 (9.0%) pazienti del gruppo Evr si è presentato un episodio di rigetto acuto rispettivamente in POD 40, 54 e 87. In due casi si è trattato di rigetto lieve ed in un caso moderato. Nel gruppo CsA si sono diagnosticati 2/17 (11.7%) episodi di rigetto, uno lieve ed uno moderato (p=NS). Tutti gli episodi sono stati trattati con terapia steroidea convenzionale. Due pazienti nel gruppo Evr hanno sviluppato un episodio di rigetto lieve prima della randomizzazione. Non si sono evidenziati episodi di rigetto cronico in entrambi i gruppi.

### Parametri ematologici e di funzione epatica

Non si sono evidenziate differenze significative in nessun timing per i valori di AST, ALT, GGT, FA, BT, BD, albuminemia, PT, INR, PTT. Nemmeno i parametri ematologici Hb, Hct, MCV, MCH, WBC, PLT, TSAT, ferro, ferritina e transferrina sono risultati significativamente

differenti tra i due gruppi. L'anemizzazione insorta post LT nei 14 pazienti del gruppo Evr aveva gli aspetti dell'anemia microcitica e ipocromica (17).

### Dislipidemia

La media dei valori di colesterolemia totale è risultata aumentata in entrambi i gruppi dopo LT rispetto ai valori pre LT. La differenza fra i due gruppi è divenuta significativa dal 6° mese post LT con medie di  $194 \pm 45$  vs  $129 \pm 25$ ,  $p=0.006$  rispettivamente per Gruppo Evr e Gruppo CsA. Tale differenza risulta principalmente ascrivibile alla differenza nel profilo delle LDL che sono risultate in media  $112 \pm 42$  vs  $20 \pm 29$ ,  $p=0.09$  rispettivamente per Gruppo Evr e Gruppo CsA (Figura 7).

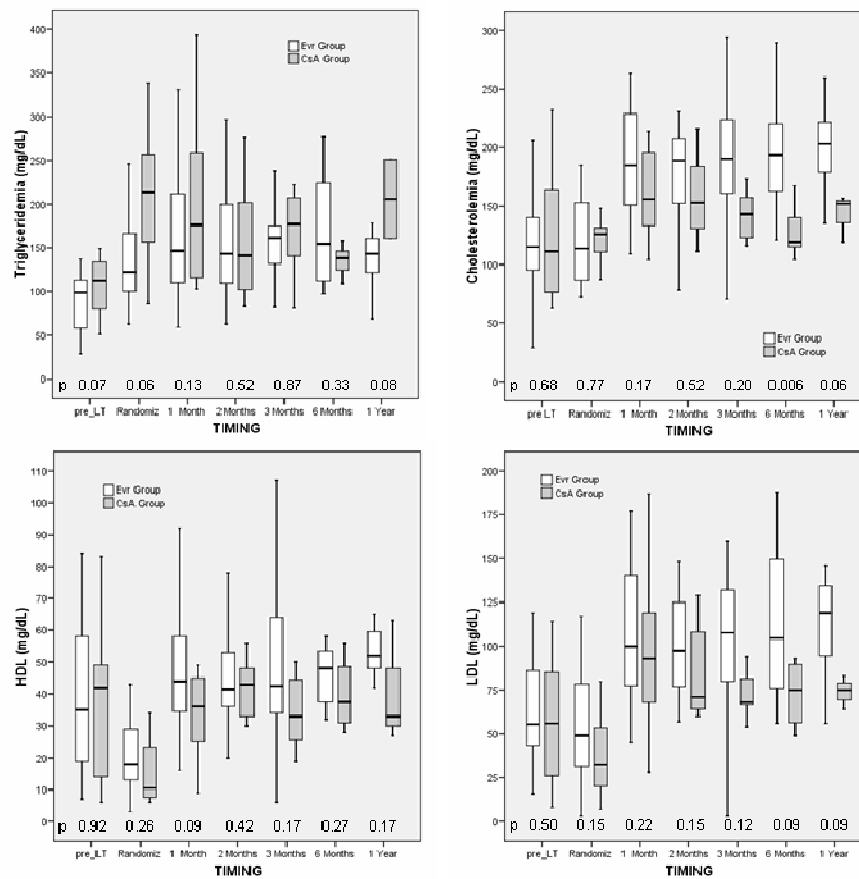


Figura 7. Profilo lipidico.

L'andamento dei valori di trigliceridemia è risultato invece sostanzialmente sovrapponibile nei due gruppi di confronto in tutti i timing analizzati.

## **Infezioni**

La profilassi contro l'infezione da Cytomegalovirus (CMV) è stata limitata ad 1 paziente ad alto rischio (donatore CMV-positivo in ricevente negative) del Gruppo Evr.

Nel Gruppo Evr, 4 pazienti hanno presentato una infezione da CMV rispetto a 2 pazienti del gruppo CsA ( $p=NS$ ). Tali infezioni si sono risolte dopo opportuno trattamento con ganciclovir. L'incidenza di infezioni batteriche, virali e fungine nei due gruppi sono risultate sostanzialmente simili (9% vs 11.1% rispettivamente per Gruppo Evr e CsA).

## DISCUSSIONE

Il LT è divenuto il trattamento di scelta per pazienti affetti da epatopatie acute e croniche terminali non responsive ai trattamenti medici. Dal primo LT eseguito dal Prof. Starzl nel 1967, la sopravvivenza di graft e paziente è progressivamente aumentata, raggiungendo valori del 90% e 70% ad 1 e 5 anni (18-21). Tali risultati sono stati possibili grazie al progressivo miglioramento delle tecniche chirurgiche, della preservazione degli organi, della gestione delle complicanze e soprattutto per i progressi nella gestione della terapia immunosoppressiva.

La terapia immunosoppressiva si è progressivamente evoluta negli ultimi 40 anni, dall'introduzione dell'Azatioprina nel 1961 e della CsA nel 1978. Altri momenti importanti sono stati l'utilizzo del Tacrolimus e più recentemente del Micofenolato Mofetile.

Nonostante gli ottimi risultati conseguiti, i farmaci immunosoppressori principali implicano l'insorgenza di complicanze a breve e lungo termine quali diabete, dislipidemia, ipertensione arteriosa, osteoporosi e soprattutto una elevata incidenza di nefrotossicità. Tali morbidità compromettono la qualità e quantità di vita dei pazienti sottoposti a LT (22). La causa più comune di insufficienza renale post LT è secondaria alla tossicità da CNI (2, 23).

Come riportato da diversi autori, la riduzione o sospensione degli CNI può essere insufficiente a controllare la progressione della insufficienza renale dopo LT, quando si è già sviluppata una fibrosi glomerulare interstiziale per il prolungato utilizzo di CNI o quando i livelli di creatinemia sono rimasti per diversi mesi oltre i valori di normalità (2, 24, 25).

Circa il 20% dei pazienti con insufficienza renale cronica sviluppano una insufficienza renale avanzata a 5 anni dal LT (1).. Inoltre l'insufficienza renale cronica è associata ad una alta percentuale di eventi cardiovascolari, mortalità, disfunzioni apatiche. Un precoce riconoscimento dell'instaurarsi di una disfunzione renale ed un precoce trattamento di tale complicanza può consentire di migliorare quindi la qualità e quantità di vita di tale categoria di pazienti. Kim DY et al. (4) riporta come solo il 14% dei pazienti abbiano una normale funzione renale a 6 mesi dal LT e più del 75% dei pazienti sviluppano un lieve-moderato rischio di insufficienza renale cronica, mentre l'8% sviluppava una insufficienza renale terminale.

L'introduzione del MELD, parametro comprendente anche la funzione renale, per la priorità per LT non sembra aver apportato miglioramenti nella incidenza di insufficienze renali post LT (2, 8).

Allo scopo di evitare la nefrotossicità da CNI, diverse strategie sono negli anni state adottate, tra cui quelle di sostituire gli CNI con MMF (26) o con prednisone e azathioprine. Il



rischio maggiore in questi casi è di ottenere una immunosoppressione insufficiente e sottoporre quindi il paziente ad un elevato rischio di rigetto acuto o cronico, che possano comportare la perdita del graft (27).

I primi risultati sull'utilizzo del Sirolimus (Rapamicina) o del suo derivato Everolimus sembrano soddisfacenti. Sirolimus è stato associato ad un miglioramento della funzione renale quando utilizzato in monoterapia (28-30). Anche l'utilizzo in combinazione con CsA, ha riportato minori incidenze di nefrotossicità (31, 32). Il primo studio eseguito in LT *de novo* utilizzando Evr in associazione con CsA è stato pubblicato recentemente da Levy et al, il quale dimostra che tale associazione ha un buon profilo di sicurezza e tollerabilità (6).

Scopo del presente studio è stato valutare se un protocollo con Evr in monoterapia in LT *de novo* comporta un miglioramento della funzione renale a parità di efficacia e sicurezza rispetto ad un regime standard con CsA.

I risultati del presente studio prospettico, monocentrico, randomizzato hanno evidenziato, nei pazienti appartenenti al gruppo Evr, una migliore funzionalità renale rispetto al gruppo controllo con CsA. Tali miglioramenti sono stati evidenziati in base ai valori di creatinina sierica, di cCC e del eGFR con la formula MDRD a 3, 6 e 12 mesi dopo LT. La migliore funzione renale è risultata evidente a partire dal primo mese dopo LT, è divenuta statisticamente significativa al secondo mese e si è mantenuta fino alla fine del follow-up di un anno.

In termini di efficacia tale studio ha evidenziato che Evr in monoterapia precoce comporta una incidenza di rigetto acuto e sopravvivenze di graft e paziente comparabili a quella di un regime standard con CsA.

Il regime immunosoppressivo con Evr in monoterapia ha inoltre mostrato una buona tollerabilità, comportando una incidenza cumulativa di complicanze sostanzialmente sovrapponibile a quella del gruppo CsA. Le maggiori complicanze correlate all'uso di Evr sono state la maggiore incidenza di dislipidemie (sostanzialmente ipercolesterolemie a componente LDL). A tal riguardo occorre evidenziare come la dislipidemia associata al trattamento con Sirolimus, anche se persistente, non sembra rappresentare un fattore di rischio maggiore per complicanze cardiovascolari. Uno studio randomizzato ha infatti dimostrato come il rischio di complicanze cardiologiche coronariche in pazienti con ipercolesterolemia è relativamente piccolo quando comparato con il rischio di base della popolazione sottoposta a trapianto (33). A causa degli effetti antinfiammatori del sirolimus è stato quindi ipotizzato che la dislipidemia indotta da inibitori mTOR non sia in realtà sostanzialmente aterogena (34).

In uno studio comparativo randomizzato con sirolimus e tacrolimus, entrambi in associazione con MMF e corticosteroidi, Dean et al, ha riscontrato un significativo incremento

di incidenza di complicanze della ferita chirurgica quali infezioni di ferita, ritardate cicatrizzazioni, raccolte sottocutanee, laparoceli in pazienti sottoposti a trapianto di rene (35). Elevate incidenze di deiscenze fasciali, laparoceli, raccolte perifasciali, sono anche state descritte durante la terapia con Sirolimus in LT (36), trapianti di intestino (37) e trapianti cardiaci (38). I nostri dati evidenziano effettivamente un trend verso una maggiore incidenza di laparoceli nei pazienti in monoterapia precoce con Evr.

In conclusione un regime immunosoppressivo basato su una monoterapia precoce con Evr in LT de novo comporta una importante diminuzione della nefrotossicità da CNI, a parità di efficacia antirigetto e complicanze postoperatorie.

Un maggiore follow-up è necessario per valutare i principali parametri di efficacia e sicurezza nel lungo termine.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003; 349 (10): 931.
2. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, et al. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation* 2001; 72 (12): 1934.
3. Morard I, Mentha G, Spahr L, et al. Long-term renal function after liver transplantation is related to calcineurin inhibitors blood levels. *Clin Transplant* 2006; 20 (1): 96.
4. Kim DY, Lim C, Parasuraman R, et al. Renal disease burden following liver transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38 (10): 3663.
5. Dunn C, Croom KF. Everolimus: a review of its use in renal and cardiac transplantation. *Drugs* 2006; 66 (4): 547.
6. Levy G, Schmidli H, Punch J, et al. Safety, tolerability, and efficacy of everolimus in de novo liver transplant recipients: 12- and 36-month results. *Liver Transpl* 2006; 12 (11): 1640.
7. De Simone P, Metselaar N, Dumortier J, et al. Conversion of liver transplant recipients with renal impairment to everolimus with CNI minimization or elimination: six-month data from a multicenter, randomized trial [abstract]. *Transpl Int* 2007; 20 (S2): 32.
8. Rule AD, Larson TS, Bergstralh EJ, Slezak JM, Jacobsen SJ, Cosio FG. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 2004; 141 (12): 929.
9. Board NKF/KDOQI. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: S1.
10. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25 (3): 658.
11. Khoschsorur G, Fruehwirth F, Zelzer S, Stettin M, Halwachs-Baumann G. Comparison of fluorescent polarization immunoassay (FPIA) versus HPLC to measure everolimus blood concentrations in clinical transplantation. *Clin Chim Acta* 2007; 380 (1-2): 217.
12. Humar A, Mazzulli T, Moussa G, et al. Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5 (5): 1065.
13. Levitsky J, Singh N, Wagener MM, Stosor V, Abecassis M, Ison MG. A survey of CMV prevention strategies after liver transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8 (1): 158.
14. Lerut J, Gertsch P. Side-to-side cavo-cavostomy: a useful aid in "complicated" piggy-back liver transplantation. *Transpl Int* 1993; 6 (5): 299.
15. Tzakis AG, Reyes J, Nour B, Marino IR, Todo S, Starzl TE. Temporary end to side portacaval shunt in orthotopic hepatic transplantation in humans. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176 (2): 180.
16. Amodio P, Biancardi A, Montagnese S, et al. Neurological complications after orthotopic liver transplantation. *Dig Liver Dis* 2007; 39 (8): 740.
17. Maiorano A, Stallone G, Schena A, et al. Sirolimus interferes with iron homeostasis in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82 (7): 908.
18. Starzl TE, Lakkis FG. The unfinished legacy of liver transplantation: emphasis on immunology. *Hepatology* 2006; 43 (2 Suppl 1): S151.
19. Adam R, McMaster P, O'Grady JG, et al. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 2003; 9 (12): 1231.

20. Roberts MS, Angus DC, Bryce CL, Valenta Z, Weissfeld L. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. *Liver Transpl* 2004; 10 (7): 886.
21. Jain A, Reyes J, Kashyap R, et al. Long-term survival after liver transplantation in 4,000 consecutive patients at a single center. *Ann Surg* 2000; 232 (4): 490.
22. Moreno R, Berenguer M. Post-liver transplantation medical complications. *Ann Hepatol* 2006; 5 (2): 77.
23. de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 2000; 35 (2): 333.
24. Fisher NC, Nightingale PG, Gunson BK, Lipkin GW, Neuberger JM. Chronic renal failure following liver transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation* 1998; 66 (1): 59.
25. Burdmann EA, Andoh TF, Yu L, Bennett WM. Cyclosporine nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003; 23 (5): 465.
26. Schlitt HJ, Barkmann A, Boker KH, et al. Replacement of calcineurin inhibitors with mycophenolate mofetil in liver-transplant patients with renal dysfunction: a randomised controlled study. *Lancet* 2001; 357 (9256): 587.
27. Stewart SF, Hudson M, Talbot D, Manas D, Day CP. Mycophenolate mofetil monotherapy in liver transplantation. *Lancet* 2001; 357 (9256): 609.
28. Groth CG, Backman L, Morales JM, et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 1999; 67 (7): 1036.
29. Kreis H, Cisterne JM, Land W, et al. Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 2000; 69 (7): 1252.
30. Flechner SM, Goldfarb D, Modlin C, et al. Kidney transplantation without calcineurin inhibitor drugs: a prospective, randomized trial of sirolimus versus cyclosporine. *Transplantation* 2002; 74: 1070.
31. MacDonald AS, Group RGS. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety, and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001; 71: 271.
32. Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomized multicentre study. The Rapamune US study group. *Lancet* 2000; 356: 194.
33. Blum CB. Effects of sirolimus on lipids in renal allograft recipients: an analysis using the Framingham risk model. *Am J Transplant* 2002; 2 (6): 551.
34. Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, Chen Y, Moorhead JF, Varghese Z. Sirolimus modifies cholesterol homeostasis in hepatic cells: a potential molecular mechanism for sirolimus-associated dyslipidemia. *Transplantation* 2007; 84 (8): 1029.
35. Dean PG, Lund WJ, Larson TS, et al. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation* 2004; 77 (10): 1555.
36. Trotter JF, Wachs M, Bak T, et al. Liver transplantation using sirolimus and minimal corticosteroids (3-day taper). *Liver Transpl* 2001; 7 (4): 343.
37. Fishbein TM, Florman S, Gondolesi G, et al. Intestinal transplantation before and after the introduction of sirolimus. *Transplantation* 2002; 73 (10): 1538.

38. Kuppahally S, Al-Khaldi A, Weisshaar D, et al. Wound healing complications with de novo sirolimus versus mycophenolate mofetil-based regimen in cardiac transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; 6 (5 Pt 1): 986.

# **EFFETTI DELLA MONOTERAPIA CON EVEROLIMUS SUI PARAMETRI EMATOLOGICI E DEL FERRO NEL TRAPIANTO DI FEGATO DE NOVO: RISULTATI PRELIMINARI (1)**

## **INTRODUZIONE**

L'anemia dopo trapianto di fegato (LT) è una complicanza frequente con una incidenza riportata tra il 4.3% ed il 28.2% (2). L'anemia che compare a partire da un mese dopo LT può essere dovuta ad anemia aplastica, infezioni, insufficienza renale o malattie linfoproliferative (PTLD), ma anche la carenza di ferro e farmaci possono avere un effetto (2).

I farmaci immunosoppressori quali gli inibitori del mammalian target of Rapamycin (mTOR) agiscono inibendo il segnale di trasduzione condiviso da diversi recettori di citochine tra cui quelli in grado di stimolare la produzione di piastrine (PLT), leucociti, (WBC) ed eritrociti. (RBC) <sup>(3-5)</sup>. L'uso di inibitori mTOR sono stati associati all'insorgenza di anemia, attraverso l'instaurarsi di uno stato infiammatorio e/o attraverso lo sviluppo di alterazioni nell'omeostasi del ferro (6, 7).

L'Everolimus (Evr), è un immunosoppressore derivato dalla Rapamicina con un promettente profilo basato sulla assenza di nefrotossicità e con proprietà antilinfoproliferative ed antineoangiogenetiche. Il primo largo studio basato sulla combinazione di Inibitori delle Calcineurine (CNI) ed Evr in LT de novo ha dimostrato che Evr in combinazione con Ciclosporina (CsA) ha un accettabile sicurezza e profilo di tollerabilità (8).

Nel presente studio è stato analizzato l'effetto di un regime basato su Everolimus (Evr) in monoterapia in trapianti di fegato (OLT) *de novo*, comparato con un regime immunosoppressivo basato su CsA, su anemia, parametri ematologici, ed omeostasi del ferro.

## MATERIALI E METODI

Presso l'Unità Operativa Complessa di Chirurgia dei Trapianti del Policlinico di Modena (Direttore Prof. Giorgio Enrico Gerunda) dal settembre 2006 è stato avviato un protocollo monocentrico, prospettico, randomizzato, in aperto, allo scopo di dimostrare la sicurezza ed efficacia di un regime immunosoppressivo basato su un breve periodo di utilizzo di ciclosporina (30 giorni), associato con Evr dalla 10<sup>a</sup> giornata postoperatoria (Gruppo Evr) versus un regime con Ciclosporina (Gruppo CsA) standard in pazienti sottoposti a OLT de novo.

I pazienti nel Gruppo Evr hanno ricevuto dalla 10<sup>a</sup> giornata una dose iniziale di Evr di 1 mg/die due volte al giorno (ore 8-20) allo scopo di ottenere un livello ematico di 8 ng/ml (range 6-10), associato a CsA (dose iniziale 2 mg/kg/due volte/die), al fine di ottenere un livello ematico di 100 ng/ml (range 75-125) fino alla fine del primo mese post-LT, quando la CsA è stata sospesa ed il livello target richiesto dell'Evr è stato di 12 ng/ml (range 10-14) (Figura 1).

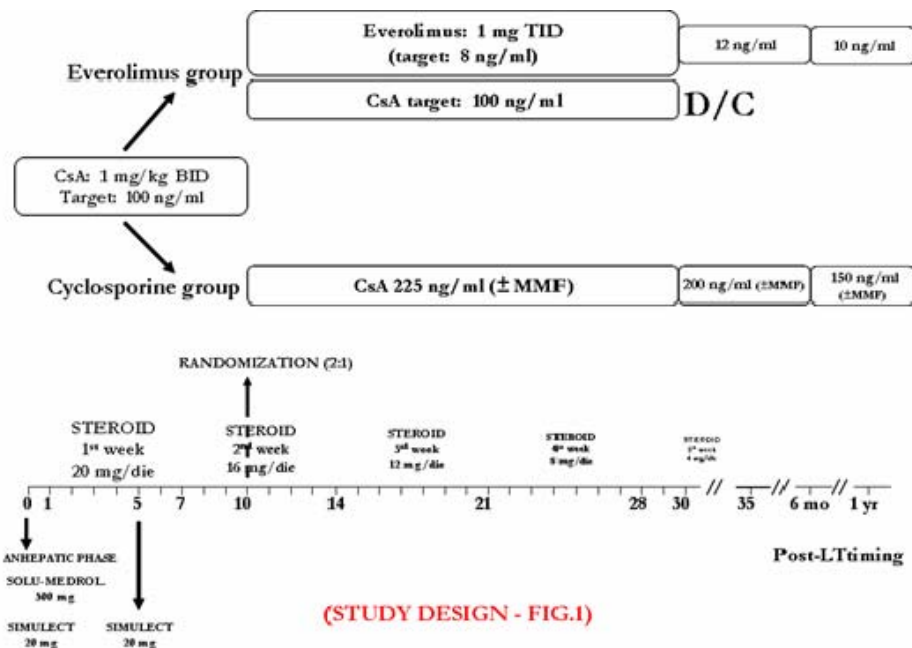


Figura 1. Schema Protocollo Everolimus in LT de novo

I pazienti nel Gruppo CsA hanno ricevuto CsA alla dose iniziale di 2 mg/kg due volte/die allo scopo di raggiungere un livello target di 100 ng/ml (range 75-125) per i primi 10 giorni post trapianto e successivamente di 225 ng/ml (range 200-250) fino alla fine del primo mese post

trapianto, 200 ng/ml (range 175-225) dal secondo al sesto mese, e 150 ng/dl (range 125-175) successivamente.

Tutti i pazienti di entrambi i gruppi hanno ricevuto una uguale induzione con basiliximab (20 mg e.v.) durante la fase anepatica ed in 5<sup>a</sup> giornata postoperatoria. Inoltre in tutti i pazienti sono stati somministrati steroidi in bolo di 500 mg durante la fase anepatica, e settimanalmente scalati partendo da 20 mg/die dalla prima giornata postoperatoria, fino alla sospensione all'inizio della 5<sup>a</sup> settimane. I pazienti sono stati randomizzati in 10<sup>a</sup> giornata postoperatoria nei due gruppi di studio in un rapporto 2:1 fra Gruppo Evr e Gruppo CsA.

Sono stati valutati i seguenti parametri pre-LT ed a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 giorni ed 1, 2, 3, 6 mesi dopo LT: Emoglobina (Hb, g/dl), Ematocrito (Hct, %), Volume corpuscolare medio (MCV, fl), Emoglobina corpuscolare media (MCH, pg), Concentrazione di emoglobina corpuscolare media (MCHC, %), Ferro, (mcg/dl), Ferritina (ng/ml), Transferrina (mcg/dl), Saturazione della Transferrina (TSAT, %), Globuli Bianchi (WBC, X10<sup>3</sup>/ul), Globuli rossi (RBC, X10<sup>6</sup>/ul) e Piastrine (PLT, X10<sup>3</sup> /ul).

Seguendo i Criteri del World Health Organization, l'anemia è stata definita quando Hb < 13 g/dl negli uomini o < 12 g/dl nelle donne. Leucopenia è stata definita come WBC < 3,000 cell/mm<sup>3</sup>; Trombocitopenia come PLT minori di 150 X10<sup>3</sup>/Ul.

### **Analisi statistica**

I risultati sono stati espressi come media ± Deviazione Standard. Differenze fra le medie sono state valutate con il test t di Student per campioni indipendenti e per lo stesso gruppo quando appropriato. Differenze fra dati categorici sono state analizzate con  $\chi^2$  test con correzione di contiguità di Yates. I dati sono stati analizzati con il software SPSS<sup>®</sup> 15.0; un valore di  $p \leq 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.



## RISULTATI

Da settembre 2006 a novembre 2007 sono stati arruolati 40 pazienti, di cui 28 nel Gruppo Evr (20M / 8F) e 12 nel Gruppo CsA (8M / 4F). Le indicazioni per trapianto sono indicate nella Tabella 1.

	<b>Group Evr</b>	<b>Group CsA</b>	<b>p</b>
Pazienti arruolati (M/F)	28 (20/8)	12 (8/4)	NS
Indicazione:			
HCV	4 (14.3%)	2 (16.7%)	NS
HBV	2 (7.1%)	2 (16.7%)	
HCC	17 (60.7%)	4 (33.3%)	
Colestatiche	3 (10.7%)	2 (16.7%)	
Altre	2 (7.1%)	2 (16.7%)	
Pazienti anemici pre-LT	21 (75%)	10 (83.3%)	NS

Tabella 1. Caratteristiche del campione

In 21/28 (75%) pazienti arruolati nel Gruppo Evr ed in 10/12 (83.3%) pazienti del Gruppo CsA era presente anemia pre-LT (p=NS). Nessuno dei pazienti inclusi nello studio hanno utilizzato eritropoietina pre-LT. Nessuno dei parametri ematologici analizzati sono risultati statisticamente significativi tra i due gruppi pre-LT.

Dopo LT i valori di Hb, Hct, MCV, MCH, WBC, PLT, TSAT, ferro, ferritina e transferrina non si sono dimostrati significativamente differenti tra i due gruppi in nessun timing post-LT. A 3 e 6 mesi post-LT, RBC e MCHC sono invece risultati statisticamente differenti tra i due gruppi: RBC a 3 e 6 mesi sono risultati  $4.4 \pm 0.59$  vs  $3.8 \pm 0.3$  (p=0.02) e  $4.9 \pm 0.66$  vs  $4 \pm 0.37$  (p=0.18) rispettivamente nel Gruppo Evr e Group CsA. MCHC a 2, 3 e 6 mesi sono risultati  $31.6 \pm 1.1$  vs  $33.3 \pm 1.3$  (p=0.001),  $31.7 \pm 1.4$  vs  $33.4 \pm 1.6$  (p=0.037) e  $32.7 \pm 1.4$  vs  $34.3 \pm 0.9$  (p=0.026) rispettivamente nel Gruppo Evr e Gruppo CsA.

Tra i 19 pazienti arruolati nel Gruppo Evr che hanno raggiunto almeno 3 mesi di follow-up, 13 (68.4%) sono risultati anemici, mentre 5 pazienti su 5 (100%) arruolati nel Gruppo Group CsA sono risultati anemici (p=NS).

Tra i 12 pazienti appartenenti al Gruppo Evr che hanno raggiunto 6 mesi di follow-up, 5 (41.7%) erano anemici mentre 4/5 (80%) pazienti arruolati nel Gruppo CsA sono risultati anemici (p=NS). I pazienti risultati anemici a 3 e 6 mesi dopo LT avevano una media di Hb di

10.5±0.9 e 11±1.5 al mese 3 e 11.1±0.9 e 11.7±0.3 al mese 6, rispettivamente per il Gruppo Evr e CsA (p=NS). L'anemia nei pazienti del Gruppo Evr si presentava con caratteristiche di anemia microcitica e ipocromica, con una media MCV di 79.6±7.5 e 76.4±7.5 (range di riferimento [rr] 79-98 fl), media MCH di 25.6±3.7 e 25±2.4 (rr 26-34 pg) e una media di MCHC di 31.5%±1.5 e 32.9%±1.0 (rr 31-37%) rispettivamente a 3 e 6 mesi.. Inoltre, i pazienti anemici nel Gruppo CsA hanno mostrato normali valori di MCV, MCH, MCHC a 3 e 6 mesi post LT (Figura 2).

I pazienti anemici nel Gruppo Evr hanno presentato un ridotto ferro sierico (rr 60-160 mcg/dL) di 47.8±24.6 3 mesi dopo LT e 54.8±22.2 a 6 mesi; normale ferritinemia (rr 25-400 ng/mL) di 315±255 e 186±261 a 3 e 6 mesi, normale transferrinemia (rr 290-430 mcgIron/dL) (313±82 e 336±753 a 3 e 6 mesi) e riduzione di TSAT (rr 16-50%) (16.3%±11.1 e 16.1%±8.9 a 3 e 6 mesi ).

I pazienti anemici nel Gruppo CsA avevano valori borderline di ferro sierico con una media di 68.2±25.0 e 58.0±42.0 a 3 e 6 mesi dopo LT, ferritinemia di 371±496 e 410±356 a 3 e 6 mesi, normale transferrinemia di 348±125 e 318±58 a 3 e 6 mesi e normale TSAT di 19.7±10.8 e 17±12.9 a 3 e 6 mesi.

<b>Parametri</b>	<b>Timing</b>	<b>Gruppo Evr</b>	<b>Gruppo CsA</b>	<b>p</b>
<b>RBC</b>	6° mese	4.9±0.66	4±0.37	0.018
<b>MCV</b>	2° mese	82.8±5.3	88.7±5	0.01
<b>MCH</b>	1° mese	28.4±2	29.99±1.1	0.04
	2° mese	26.3±2.4	29.6±2	0.002
<b>MCHC</b>	6° mese	32.7±1.4	34.3±0.9	0.026
<b>Ferro</b>	1° mese	38.7±21.6	74.3±37.2	0.003
<b>Ferritina</b>	21 <sup>a</sup> gg	350±219	974±621	0.005
<b>TSAT</b>	1° mese	12.7±5.8	23.7±11.9	0.0026
<b>WBC</b>	10 <sup>a</sup> gg	8.6±5.4	4.9±2.5	0.047
<b>PLT</b>	14 <sup>a</sup> gg	259±128.9	152±77.8	0.028

Tabella 2. Parametri risultati significativamente differenti ai timing analizzati

Comparando i livelli di ferro e TSAT con i valori pre trapianto si è evidenziata una marcata riduzione dei valori di ferro sierico (media pre-LT: 91.4±41 nel Gruppo Evr e 119.6±60 nel Group CsA) e TSAT (media pre-LT: 44±31 nel Gruppo e 49.7±27 nel gruppo CsA) in entrambi i gruppi (Tabella 3).

Nel Gruppo Evr, 2/28 pazienti (7.2%) hanno richiesto trattamento con Eritropoietina dopo

una media di  $111 \pm 78$  giorni dopo LT; in entrambi i pazienti il trattamento fu probabile conseguenza della concomitante terapia antivirale intrapresa con Interferone e Ribavirina per il trattamento della recidiva di epatite C. Nessuno dei pazienti nel Gruppo CsA ha richiesto trattamento con eritropoietina.

Prima del trapianto, 3/28 (10.7%) pazienti nel Gruppo Evr e 2/12 (16.7%) nel Gruppo CsA hanno presentato leucopenia ( $p=NS$ ). Nel Gruppo Evr 8/28 (28.6%) pazienti e 2/12 (16.7%) nel Gruppo CsA hanno richiesto trattamento con Filgrastim in una media di  $61.9 \pm 47.4$  and  $60.5 \pm 0.7$  giorni post-LT ( $p=NS$ ). Tali pazienti assumevano anche terapia antivirale basata su Interferone e Ribavirina per il trattamento della recidiva di epatite C.

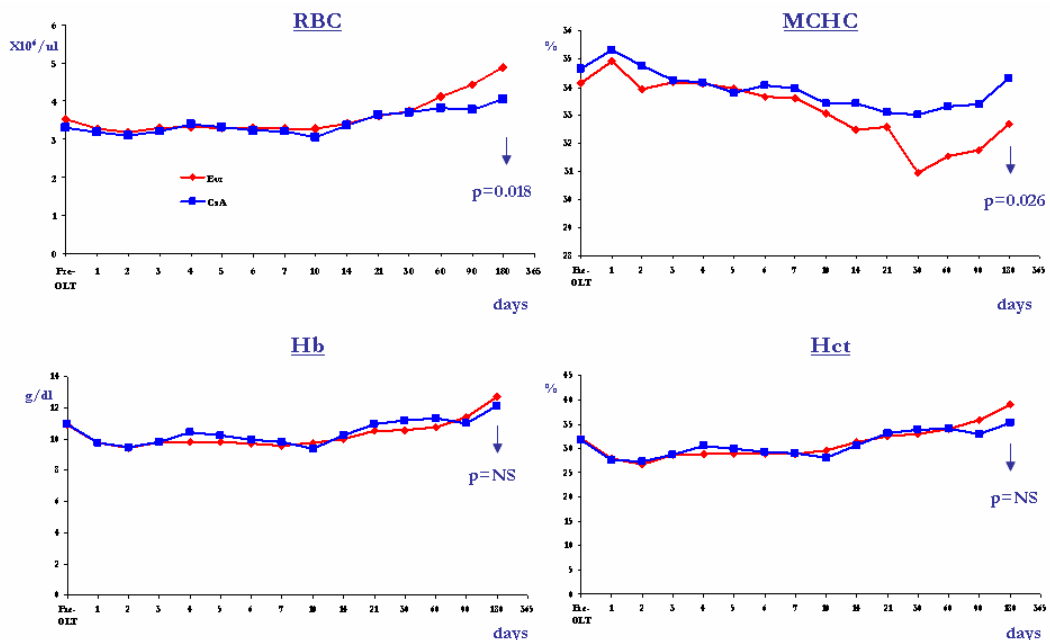


Figura 2. Andamento dei principali parametri ematologici nei due gruppi di confronto

	Group Evr		p-value	Group CsA		p-value
	Pre-LT	6 mesi post-LT		Pre-LT	6 mesi post-LT	
<b>Timing</b>						
<b>Ferro</b>	91.4±41	54.8±22.2	NS	119.6±60	58±42	NS
<b>TSAT</b>	44±31	16.1±8.9	0.013	49.7±27	17±12.9	0.038

Tabella 3. Analisi pre e post-LT di Ferro e TSAT

## DISCUSSIONE

Gli studi eseguiti sul Sirolimus, di cui l'Evr è un derivato, hanno descritto un effetto mielodepressivo degli immunosoppressori inibitori mTOR, probabile conseguenza dell'inibizione del segnale di trasduzione mediato dalla glicoproteina 130  $\beta$ -catena, condivisa da vari recettori di citochine, tra cui l'IL-11, il fattore stimolante le colonie granulocitarie e l'eritropietina, i quali stimolano rispettivamente la produzione di PLT, WBC e RBC (4).

Uno studio retrospettivo su 46 pazienti sottoposti a trapianto di rene, la cui terapia immunosoppressiva è stata convertita da CNI a Sirolimus ha evidenziato una diminuzione media dei valori di Hb  $2.5 \pm 2$  g/dl nell'86.9% dei casi, con un concomitante stato infiammatorio cronico dovuto agli aumentati livelli di fibrinogeno e proteina C reattiva dopo la conversione (7).

I dati retrospettivi di uno studio condotto su pazienti sottoposti a trapianto di cuore che comparavano due regimi immunosoppressivi con Sirolimus ed Evr (entrambi in associazione a Tacrolimus), hanno mostrato che i valori di Hb sono stati maggiormente influenzati dal Sirolimus rispetto che dall'Evr (9).

Maiorano A. et al.(6) hanno evidenziato una significativa riduzione in Hb, MCV, MCH, ferro sierico e TSAT senza significative variazioni di RBC e ferritina in pazienti sottoposti a trapianto di rene con terapia immunosoppressiva convertita da CNI a Sirolimus.

I risultati del presente studio dimostrano come l'effetto mielosoppressivo dell'Evr non è stato significativamente differente di quello con CsA, e addirittura i livelli di RBC sono risultati significativamente migliori nel Gruppo Evr a 3 e 6 mesi dopo LT.

L'omeostasi del ferro sembra non essere influenzata dall'utilizzo dell'Everolimus in monoterapia dopo LT. L'incidenza di leucopenia ed il dosaggio di WBC è risultato simile rispetto al Gruppo CsA, così come il dosaggio piastrinico durante tutto il follow-up.

Tali risultati dimostrano che un regime immunosoppressivo dopo LT basato su Evr in monoterapia non comporta sostanziali differenze mielodepressive rispetto un regime basato su CsA.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rompianesi G, Masetti M, Montalti R, et al. Effetto dell'Everolimus sulla crasi ematica in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. XXXI Congresso Nazionale della Società Italiana Trapianti di Organo 2007; CD Abstract.
2. Maheshwari A, Mishra R, Thuluvath PJ. Post-liver-transplant anemia: etiology and management. *Liver Transpl* 2004; 10 (2): 165.
3. Hong JC, Kahan BD. Sirolimus-induced thrombocytopenia and leukopenia in renal transplant recipients: risk factors, incidence, progression, and management. *Transplantation* 2000; 69 (10): 2085.
4. Quesniaux VF, Wehrli S, Steiner C, et al. The immunosuppressant rapamycin blocks in vitro responses to hematopoietic cytokines and inhibits recovering but not steady-state hematopoiesis in vivo. *Blood* 1994; 84 (5): 1543.
5. Sanchez Fructuoso A, Calvo N, Moreno MA, Giorgi M, Barrientos A. Study of anemia after late introduction of everolimus in the immunosuppressive treatment of renal transplant patients. *Transplant Proc* 2007; 39 (7): 2242.
6. Maiorano A, Stallone G, Schena A, et al. Sirolimus interferes with iron homeostasis in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82 (7): 908.
7. Thaunat O, Beaumont C, Chatenoud L, et al. Anemia after late introduction of sirolimus may correlate with biochemical evidence of a chronic inflammatory state. *Transplantation* 2005; 80 (9): 1212.
8. Levy G, Schmidli H, Punch J, et al. Safety, tolerability, and efficacy of everolimus in de novo liver transplant recipients: 12- and 36-month results. *Liver Transpl* 2006; 12 (11): 1640.
9. Tenderich G, Fuchs U, Zittermann A, Muckelbauer R, Berthold HK, Koerfer R. Comparison of sirolimus and everolimus in their effects on blood lipid profiles and haematological parameters in heart transplant recipients. *Clin Transplant* 2007; 21 (4): 536.

## CONCLUSIONI

Dagli anni '60 ad oggi si sono ottenuti importanti progressi nel campo della terapia immunosoppressiva nel trapianto di fegato, grazie allo sviluppo di farmaci sempre più sicuri ed efficaci.

I principali farmaci immunosoppressori, gli Inibitori delle Calcineurine (Ciclosporina e Tacrolimus) hanno consentito di raggiungere sopravvivenze del graft e del paziente insperate fino a pochi anni fa. Nonostante gli ottimi risultati conseguiti, gli Inibitori delle Calcineurine comportano l'insorgenza di complicanze a breve e lungo termine quali diabete, dislipidemia, ipertensione arteriosa, osteoporosi e soprattutto una elevata incidenza di nefrotossicità. Tali morbidity compromettono la qualità e quantità di vita dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato.

La nuova classe di farmaci immunosoppressori utilizzata nei trapianti d'organo è rappresentata dai cosiddetti mTOR (Rapamicina ed Everolimus) che presentano una ottima efficacia antirigetto senza comportare l'insorgenza dei più comuni effetti collaterali degli Inibitori delle Calcineurine.

Come dimostrato dagli studi eseguiti in questi anni presso il Centro Trapianti di Modena, la classe degli immunosoppressori mTOR risulta infatti sicura ed efficace dopo trapianto di fegato.

In questi studi è stato evidenziato come la Rapamicina utilizzata in monoterapia di mantenimento, risulta particolarmente efficace quando utilizzata in sostituzione degli Inibitori delle Calcineurine per il trattamento delle complicanze di Ciclosporina e Tacrolimus, quali l'insufficienza renale, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, la neurotossicità, l'ipertrofia gengivale e l'irsutismo.

I risultati preliminari dell'importante studio prospettico, randomizzato, atto a comparare l'utilizzo dell'Everolimus in monoterapia precoce con un regime standard a base di Ciclosporina hanno dimostrato anche prospetticamente, una notevole riduzione della nefrotossicità nel gruppo di pazienti trattati con Everolimus, a parità di efficacia antirigetto e di morbidity.

Le comprovate proprietà antiproliferative degli mTOR fanno inoltre ritenere che importanti sviluppi si potranno ottenere nella gestione dei pazienti in lista o sottoposti a trapianto di fegato per epatocarcinoma su cirrosi.

Anche l'utilizzo degli mTOR comporta una serie di complicanze che devono essere ben conosciute prima di scegliere se utilizzare tale categoria di immunosoppressori. Le complicanze più frequenti nella nostra esperienza sono state una maggiore incidenza di dislipidemie e di laparoceli. A differenza della Rapamicina, l'uso dell'Everolimus non ha invece dimostrato un particolare effetto mielodepressivo.

La tollerabilità degli mTOR si è dimostrata molto alta, come dimostrato dalla bassa percentuale di pazienti che ne hanno richiesto la sospensione per effetti collaterali.

Non riteniamo che la categoria dei farmaci mTOR sia superiore in tutti gli ambiti considerati agli Inibitori delle Calcineurine, ma riteniamo che sia una categoria farmacologica che debba rientrare nella gestione multifarmacologica immunosoppressiva del paziente sottoposto a trapianto di fegato. Grazie a questa nuova ed innovativa categoria di farmaci immunosoppressori si può oggi ritenere di poter scegliere la migliore terapia immunosoppressiva in base alle caratteristiche del paziente trapiantato.

Ulteriori studi ed un maggiore follow-up sono necessari per valutare anche nel lungo termine i buoni risultati preliminari ottenuti, in termini di efficacia e sicurezza.





## **RINGRAZIAMENTI**

Tante sono le persone che devo ringraziare per aver contribuito nell'arco di 10 anni alla mia crescita professionale nell'ambito trapiantologico.

Innanzitutto un grazie a tutti i Direttori con i quali ho avuto il piacere di lavorare: il Prof. Antonino Cavallari, il Prof. Roberto Troisi e il Prof. Bernard de Hemptinne, il Prof. Elio Jovine, ed infine ma non ultimo il Prof. Giorgio Enrico Gerunda.

Un doveroso ringraziamento va a tutti i miei attuali colleghi che in diversi modi hanno contribuito al raggiungimento di questo agognato obiettivo. Quindi un grazie di cuore al Dr. Michele Masetti, al Dr. Fabrizio di Benedetto ed al Dr. Nicola De Ruvo.

Un grazie al mio relatore Prof. Roberto Bellusci per la continua disponibilità dimostratami in questi anni.

Un ringraziamento particolare al Prof. Bruno Nardo per avermi seguito con professionalità e rispetto fin dall'inizio di questa lunga avventura.