

# *INDICE*

## *INTRODUZIONE*

<i>Cenni storici</i>	<i>pag. 3</i>
<i>Immunosoppressione dopo trapianto di fegato</i>	<i>pag. 4</i>
<i>Fattori di rischio per recidiva neoplastica</i>	<i>pag. 6</i>
<i>Scopo ed introduzione allo studio</i>	<i>pag. 7</i>

## *PAZIENTI E METODI*

<i>Pazienti</i>	<i>pag. 7</i>
<i>Esposizione a ciclosporina</i>	<i>pag. 8</i>
<i>Altri fattori di rischio per recidiva neoplastica</i>	<i>pag. 9</i>
<i>Analisi statistica</i>	<i>pag. 9</i>

## *RISULTATI* *pag. 10*

## *DISCUSSIONE* *pag. 12*

## *BIBLIOGRAFIA* *pag. 16*

## *TABELLE* *pag. 19*

## *FIGURE* *pag. 23*



## *INTRODUZIONE*

Tra le opzioni terapeutiche nel trattamento dell'epatocarcinoma il trapianto ortotopico di fegato (Orthotopic Liver Transplantation – OLT) è concettualmente la più efficace: esso infatti permette la rimozione radicale del tumore e della malattia epatica cronica di base, che rappresenta il presupposto per lo sviluppo della recidiva neoplastica dopo chirurgia resettiva epatica e che ha di per sé una prognosi severa a lungo termine. Il trapianto nell'epatocarcinoma rimane tuttavia una modalità di trattamento limitata dall'insufficiente disponibilità di donatori, che impone una scelta accurata dei candidati, allo scopo di minimizzare la possibilità di recidiva tumorale.

### *Cenni storici*

La non resecabilità del tumore, determinata dalla sua diffusione intraepatica sembrò rappresentare, negli anni ottanta, l'indicazione ideale all'esecuzione del trapianto. I risultati di questo, di fronte a neoplasie avanzate, si rivelarono però deludenti, a causa dell'alta frequenza di recidive che, sebbene con ampie variazioni da studio a studio, variava dal 32% al 79% (1,2). Seguì dunque una fase in cui il ruolo del trapianto, nel trattamento della neoplasia epatica primitiva, fu fortemente messo in discussione: in Europa l'effettuazione di trapianti per epatocarcinoma scese dal 29% di tutte le indicazioni del 1983-87 al 15% del 1988-92 (3,4,5).

Il rilievo clinico di una prognosi migliore nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato, nei quali un epatocarcinoma occulto alla valutazione preoperatoria veniva diagnosticato all'esame istologico del fegato nativo rimosso (cosiddetti HCC incidentali), indusse a rivolgere l'attenzione alle forme tumorali precoci. Attorno al 1993 comparivano i primi studi retrospettivi, i quali suggerivano che una più attenta selezione dei pazienti avrebbe potuto rappresentare la chiave per migliorare l'outcome del trapianto per epatocarcinoma (6).

Nel 1996 Mazzaferro introduceva alcuni criteri (presenza di 1 nodulo solitario di diametro non superiore ai 5 cm., oppure un numero massimo di tre noduli, dei quali il maggiore di diametro non superiore ai 3 cm., in assenza di invasione neoplastica portale alla valutazione preoperatoria), basati su un'ampia casistica di pazienti, che sottolineavano l'importanza delle caratteristiche cliniche e patologiche del tumore nella selezione del candidato al trapianto: attenendosi a tali criteri, la prognosi risultava nettamente migliorata rispetto ai risultati precedenti, così la sopravvivenza

totale ad 1, 2 e 3 anni saliva all'85%, 83% ed 80% e la sopravvivenza libera da recidiva a 4 anni raggiungeva l'83% (7).

Successivamente numerosi altri studi confermavano questi risultati (8,9). Essi, ancora attuali, rilevano soprattutto l'importanza degli elementi anatomico-patologici dell'epatocarcinoma nel definire il rischio di recidiva tumorale dopo trapianto di fegato che, con l'affinamento della tecnica operatoria e della gestione postoperatoria, rappresenta attualmente il principale problema per la sopravvivenza a lungo termine di questa popolazione di pazienti.

Attualmente il trapianto di fegato si inserisce precocemente nella storia dell'epatocarcinoma (10): infatti, quando già è nota l'epatopatia cronica di base, attraverso un adeguato follow-up si può diagnosticare la presenza della neoplasia ad uno stadio precoce. Il tumore così riscontrato sul fegato cirrotico induce ad anticipare l'indicazione al trapianto, il quale verrebbe altrimenti procrastinato ad un più avanzato stadio dell'epatopatia.

### *Immunosoppressione dopo trapianto di fegato*

I farmaci immunosoppressori più comunemente e largamente utilizzati al fine di prevenire il rigetto del graft dopo trapianto di fegato sono rappresentati da: ciclosporina, tacrolimus, steroidi, azatioprina, ed anticorpi monoclonali anti-linfocitari. Ognuno di essi presenta un peculiare profilo farmacologico:

- Ciclosporina (Sandimmun®, Neoral®): introdotta nella pratica clinica nel 1979 da Calne, è un metabolita della specie fungina di *Beauveria nivea*. Agisce inibendo l'attività dei linfociti T tramite il blocco della trascrizione del gene che codifica l'interleuchina-2, linfocina essenziale per la funzione linfocitaria. La ciclosporina viene utilizzata quale farmaco immunosoppressore principale, sola o in associazione con azatioprina e/o steroidi.
- Tacrolimus-FK506 (Prograf®): introdotto nella pratica clinica nel 1989 da Starzl, è un antibiotico macrolide derivato dalla specie fungina *Streptomyces tsukubaensis*, con proprietà immunosoppressive. Agisce in maniera analoga alla ciclosporina, legandosi ad una proteina di legame dei linfociti T ed inibendo così la sintesi di interleuchina-2. Anch'esso viene utilizzato come immunosoppressore principale, da solo o in associazione all'azatioprina e/o agli steroidi.

- Azatioprina (Azatioprina®, Imuran®), inibitore non specifico della divisione cellulare, è un anti-metabolita (6-mercaptipurina) che, interferendo con la sintesi del DNA e dell'RNA, blocca la differenziazione e la proliferazione dei linfociti T e B. L'azatioprina viene impiegata in associazione ad altri farmaci immunosoppressori, al fine di ridurre la posologia del farmaco principale e limitarne, così, gli effetti collaterali.
- Prednisone e metilprednisolone (Deltacortene®, Flantadin®, Urbason®, Solumedrol®): steroidi antinfiammatori che provocano il sequestro delle cellule T circolanti dai compartimenti intravascolari tissutali al tessuto linfoide. Inibiscono, inoltre, la produzione ed il rilascio delle linfochine da parte delle cellule T, necessarie per amplificare le risposte macrofagiche e linfocitarie. Il prednisone viene utilizzato in associazione con altri farmaci immunosoppressori nella profilassi del rigetto cronico di organi solidi; il metilprednisolone trova invece indicazione nel trattamento del rigetto acuto d'organo.
- Muromonab-CD3 (OKT3®): anticorpo monoclonale derivato dalla specie murina, con specificità singola verso gli antigeni CD3 dei linfociti T umani. Agisce bloccando la funzione della molecola CD3 sulla membrana delle cellule T umane, essenziale per l'attivazione del loro recettore specifico. L'OKT3 viene utilizzato nel trattamento del rigetto acuto epatico steroide-resistente.

L'immunosoppressione necessaria a prevenire il rigetto del graft viene pertanto solitamente ottenuta mediante l'associazione di due o tre farmaci, in particolare nei primi mesi dopo il trapianto. Ciò consente di ridurre il dosaggio dei singoli agenti immunosoppressori e di minimizzare così i loro effetti collaterali (11-12).

I protocolli terapeutici adottati sono quindi rappresentati dalla cosiddetta terapia “duplice”, che prevede un immunosoppressore principale (ciclosporina e/o tacrolimus) associato ad uno steroide (solitamente prednisone) e dalla terapia “triplice”, nella quale è utilizzata anche l'azatioprina. Nei mesi successivi si riduce progressivamente il dosaggio di tutti i farmaci utilizzati, fino ad interrompere la somministrazione dello steroide, generalmente al termine del primo anno e successivamente dell'azatioprina, in un periodo compreso fra il 6° e l'8° mese postoperatorio, in modo da ottenere una terapia antirigetto di mantenimento, a lungo termine, costituita dal solo immunosoppressore principale a base dosi.

### *Fattori di rischio per recidiva neoplastica*

L'unica controindicazione assoluta al trapianto di fegato per epatocarcinoma è la diffusione extraepatica della neoplasia; numerosi elementi sono stati valutati, nel corso degli anni, in rapporto ad un loro possibile ruolo quali fattori di rischio per recidiva neoplastica dopo trapianto. Essi sono perlopiù riconducibili alle caratteristiche anatomico-patologiche del tumore primitivo.

Diversi studi hanno fornito risultati sostanzialmente sovrapponibili, pur se differenti sotto alcuni aspetti: i fattori che si sono dimostrati capaci di influenzare la sopravvivenza libera da recidiva sono rappresentati da: dimensioni del tumore, numero di noduli, interessamento vascolare micro- e macroscopico, coinvolgimento linfonodale all'ilo epatico (1). Un ruolo controverso assumono invece la presenza o meno di cirrosi, la modalità di presentazione (incidentale vs. non incidentale), ed il grado istologico di malignità; non influenzanti la sopravvivenza libera da recidiva si sono, infine, dimostrati fattori quali l'età, il sesso, la concomitante presenza di epatite B e/o C, ed i livelli di alfa-fetoproteina all'esordio.

Meno numerosi sono invece, in letteratura, gli studi clinici mirati a valutare il possibile ruolo della terapia immunosoppressiva, alla quale il paziente deve inevitabilmente essere avviato al fine di evitare il rigetto del graft, quale fattore prognostico nella recidiva neoplastica.

E' provato infatti che il sistema immunitario rappresenti un'efficace barriera non solo nei riguardi delle infezioni, ma anche verso le neoplasie. L'immunosoppressione terapeutica potrebbe, dunque, favorire la crescita di metastasi sfuggite alla valutazione pre- ed intraoperatoria (micrometastasi), o derivate dalla stessa manipolazione chirurgica del fegato nel corso dell'epatectomia.

Uno studio di Iwatsuki (13) dimostra che la crescita degli epatocarcinomi recidivi, espressa come velocità di raddoppiamento, è sensibilmente superiore nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato e successiva immunosoppressione, rispetto ai pazienti trattati con resezione epatica, quindi in assenza di trattamento immunosoppressivo (44,3 vs. 273,8 giorni).

Diversi studi clinici condotti da Penn pongono altresì in evidenza la maggiore frequenza di sviluppo di tumori "de novo", nonché la loro maggiore aggressività in pazienti trapiantati di fegato o di rene e per tale motivo sottoposti a terapia immunosoppressiva, rispetto alla popolazione normale (14).

### *Scopo ed introduzione allo studio*

Scopo del presente studio è indagare la possibile relazione fra il dosaggio del principale farmaco immunosoppressore utilizzato - la ciclosporina - e la recidiva neoplastica, in pazienti sottoposti a trapianto di fegato per epatocarcinoma presso la Divisione di Chirurgia dei Trapianti dell'Università degli Studi di Bologna. Inoltre, di identificare possibili strategie volte a ridurre il rischio di recidiva.

L'influenza delle differenti associazioni terapeutiche ed alcuni fattori clinici, patologici ed istologici della recidiva di HCC sono state indagate all'analisi uni- e multivariata.

### *PAZIENTI E METODI*

#### *Pazienti*

93 pazienti sottoposti a trapianto ortotopico di fegato per carcinoma epatocellulare nel periodo compreso fra il 1991 ed il 2002, sono stati trattati con ciclosporina quale principale farmaco immunosoppressore. In questo gruppo di pazienti i livelli ematici del farmaco sono stati dosati con la medesima tecnica radioimmunologica e sono pertanto confrontabili all'analisi retrospettiva.

Nei pazienti sottoposti a trapianto prima del gennaio 1991, la ciclosporinemia era dosata con metodiche che presentavano reattività crociata con i metaboliti del farmaco, determinando livelli ematici considerevolmente elevati. I pazienti sottoposti a trapianto di fegato dopo l'agosto 2002 presentano livelli di ciclosporina dosati a 2 ore dalla somministrazione. In entrambi questi gruppi i livelli ematici del farmaco non possono essere confrontati con quelli dei pazienti trapiantati fra il 1991 e l'agosto 2002 e non sono pertanto stati considerati nel presente studio.

Tutti i pazienti sono stati valutati con tecniche di imaging includenti ecografia e TC total body. Nessuno dei pazienti presentava diffusione extraepatica della malattia neoplastica al momento del

trapianto. Nessuno di essi, inoltre, ha presentato segni intraoperatori di diffusione neoplastica.

Il follow up di questi pazienti comprendeva sempre: dosaggio del livello plasmatico di alfa-fetoproteina; ecografia addominale ed Rx torace, condotti mensilmente fino al terzo mese post-trapianto, quindi ogni tre mesi fino al terzo anno, infine ogni sei mesi successivamente. Nessuno dei pazienti è stato trattato con chemioterapia adiuvante.

Il dosaggio plasmatico della ciclosporina è stato in ogni caso determinato attraverso metodo radioimmunologico monoclonale.

Ventitrè dei 93 pazienti trattati con ciclosporina sono deceduti dopo il trapianto (sopravvivenza media  $46,6 \pm 25$  giorni), in assenza di evidenti segni di recidiva tumorale, e sono pertanto esclusi dal presente studio. Le cause di decesso sono rappresentate da insufficienza postoperatoria multiorgano in 7 casi, primary graft nonfunction in 2 casi, emorragia cerebrale in 2 casi, infarto miocardico in 1 caso, sepsi in 1 caso ed arresto cardiaco intraoperatorio in 1 caso. Oltre a ciò, altri 8 pazienti sono usciti dal presente studio in quanto convertiti a trattamento con tacrolimus; un altro paziente è stato perso al follow up ed anch'esso, pertanto, non considerato. Nessuno di essi presentava comunque evidenza di recidiva di HCC.

Nel complesso, settanta pazienti trattati con ciclosporina sono stati arruolati nello studio: 62 uomini ed 8 donne, con età media di 51 anni (range: 25-64 anni) e con follow up medio di 55,5 mesi (range: 9,9 – 147,8 mesi).

#### *Esposizione a Ciclosporina*

I livelli ematici di ciclosporina sono stati dosati a 7, 14 e 30 giorni ed a 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36 e 48 mesi dopo il trapianto. In considerazione del fatto che non tutti i pazienti hanno la medesima durata del follow up e dato che lo studio di coloro i quali hanno sviluppato una recidiva neoplastica è terminato al momento della diagnosi, l'esposizione media alla ciclosporina è stata definita come il rapporto fra ciclosporina-AUC e periodo di esposizione. I livelli di ciclosporinemia dei pazienti che hanno o meno sviluppato recidiva di HCC sono stati calcolati e comparati agli intervalli precedentemente menzionati.

### *Altri fattori di rischio di recidiva neoplastica*

Dei 70 pazienti allo studio, 44 hanno ricevuto un “triplo” regime immunosoppressivo (ciclosporina, steroidi, azatioprina) e 26 sono stati trattati con ciclosporina in associazione a steroidi. Il dosaggio cumulativo di steroidi e di azatioprina è stato posto in relazione con la recidiva tumorale. Il dosaggio di steroidi e di azatioprina non è stato considerato oltre l’epoca d’insorgenza della recidiva tumorale. I due differenti schemi terapeutici sono stati comparati.

E’ stata analizzata l’influenza dei seguenti parametri sulla sopravvivenza libera da recidiva:

- età e sesso del paziente;
- epatopatia di base (virus-relata vs. virus-non correlata);
- epoca della diagnosi di HCC (preoperatoria vs. incidentale);
- livelli preoperatori di alfa-fetoproteina;
- pT staging (pT1 vs. pT2 – pT3);
- applicazione dei criteri di Milano nella selezione dei pazienti;
- grading istologico (grado I-II vs. grado III-IV);
- invasione tumorale microvascolare (presente vs. assente).

Tutti i parametri patologici considerati nella seguente analisi si basano sulle caratteristiche del fegato nativo espiantato (tabella 1).

### *Analisi statistica*

L’indagine statistica è mirata, attraverso l’analisi multivariata dei parametri considerati, a verificare lo scopo dello studio, ovvero se riconosciuti elementi clinico-patologici quali i criteri di Mazzaferro (o criteri di Milano), elevati livelli di alfa-fetoproteina, età, data del trapianto, possano rappresentare determinanti prognostici nella recidiva di epatocarcinoma dopo trapianto di fegato. Inoltre se, tra il gruppo dei pazienti che hanno manifestato recidiva tumorale ed il gruppo libero da recidiva, esista una differenza nei livelli ematici di immunosoppressore dosati nel corso del primo anno, tale da individuare un valore-soglia di rischio per lo sviluppo di recidiva.

L'esposizione alla ciclosporina, il dosaggio cumulativo di steroidi e di azatioprina, i livelli plasmatici di ciclosporina, l'età del pazienti e le dimensioni del tumore principale sono state espresse come variabili continue e riportate come media  $\pm$  dalla deviazione standard. L'alfa-fetoproteina è stata convertita in logaritmo prima dell'analisi (Kolmogorov – Smirnov test per distribuzione normale:  $p < 0,001$  e  $p = 0,531$  prima e dopo la conversione rispettivamente). Sesso del paziente, epatopatia di base, criteri di Milano, stadio pT, tipo di neoplasia, grading istologico, invasione microvascolare e schema terapeutico di immunosoppressione sono stati espressi come variabili categoriche.

L'analisi univariata della sopravvivenza è stata effettuata mediante la regressione di Cox. L'odd ratio (ORs) assieme all'intervallo di confidenza (95% CI) è stato anch'esso valutato. Per l'identificazione dei fattori correlati indirettamente al tasso di sopravvivenza libera da recidiva, è stata applicata la regressione con analisi multivariata di Cox. A causa dell'esiguo numero di casi, solo i fattori che sono risultati significativi all'analisi univariata ( $p < 0,05$ ), sono stati considerati nello studio.

Al fine di analizzare con accuratezza l'esposizione alla ciclosporina in relazione al rischio di recidiva neoplastica è stata utilizzata la curva ROC ; il cutoff ottimale che differenzia i pazienti che presentano recidiva da quelli che rimangono liberi da malattia è stato valutato attraverso il software MedCalc 7.2.1.0 (MedCalc software, Mariakerke, Belgio).

La comparazione fra ciclosporinemia nei due gruppi ai differenti intervalli è stata effettuata utilizzando il Mann-Whitney U test. Due valori di P inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi. Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando l'SPSS per Windows package (Versione 8.0, SPSS Inc, Chicago, IL).

## *RISULTATI*

L'epatocarcinoma è recidivato in 7 (10%) pazienti su 70. La recidiva neoplastica è stata diagnosticata fra i 2 ed i 40 mesi dopo il trapianto di fegato (mediana: 11 mesi). Le caratteristiche di recidiva sono mostrate nella tabella 2. La sopravvivenza libera da malattia è stata correlata significativamente all'esposizione alla ciclosporina ( $P < 0,001$ ; OR: 1.05, 95% CI: 1.03-1.08) (Tabella 3). L'esposizione

alla ciclosporina è stata maggiore in quei pazienti che hanno manifestato recidiva tumorale (media:  $278,3 \pm 86,4$  ng/mL), rispetto ai pazienti liberi da malattia (media:  $169,9 \pm 33,3$  ng/mL).

L'analisi ROC ha identificato un valore ottimale di cutoff di esposizione alla ciclosporina pari a  $189,6$  ng/mL, che differenzia i pazienti con recidiva versus quelli non recidivati con accuratezza elevata (AUC:  $0,937$ ; 95% CI:  $0,851-0,981$ ). I pazienti con elevata esposizione alla ciclosporina ( $> 189,6$  ng/mL) hanno una prevalenza di recidiva pari al  $33,3\%$  (7 su 21), mentre non si osserva recidiva nei 49 pazienti con bassa esposizione alla ciclosporina ( $\leq 189,6$  ng/mL). La sensibilità e la specificità è stata pari al  $100\%$  ed al  $77,8\%$  rispettivamente.

I livelli medi di ciclosporina sono risultati più elevati nei pazienti che hanno sviluppato recidiva di HCC ad ogni intervallo di tempo considerato nel follow up postoperatorio; in particolare, queste differenze sono risultate statisticamente significative al giorno 14 ( $P=0,006$ ) e 30 ( $P=0,030$ ), ed al mese 3 ( $P=0,030$ ), 6 ( $P=0,017$ ) e 12 ( $P=0,026$ ) dopo il trapianto (figura 1). I livelli medi di ciclosporinemia dopo 36 mesi non sono comparabili, in quanto un solo paziente con recidiva ha raggiunto questo time point.

La sopravvivenza libera da recidiva è stata significativamente correlata ai livelli ematici di alfa-fetoproteina ( $P=0,032$ ; OR:  $3,19$ , 95% CI:  $1,10-9,23$ ). Infatti i pazienti che hanno manifestato recidiva neoplastica presentavano livelli più elevati di alfa-fetoproteina (log a base 10 medio AFP:  $1,62 \pm 0,60$  ng/mL) rispetto ha quelli liberi da malattia (logaritmo a base 10 medio AFP:  $1,06 \pm 0,60$  ng/mL).

Nessuno degli altri fattori considerati come variabili continue (età e dimensioni del tumore principale, dosaggio cumulativo di steroidi, azatioprina somministrata nel primo anno dopo il trapianto) sono risultati essere significativamente correlati alla sopravvivenza libera da malattia (tabella 3). In assenza delle caratteristiche cliniche ed istologiche considerate quali variabili categoriche (tabella 4), solo la presenza di invasione tumorale microvascolare è significativamente correlata alla sopravvivenza libera da recidiva ( $P=0,044$ ; OR:  $8,76$ , 95% CI:  $1,05-72,8$ ). La recidiva neoplastica è stata osservata in 6 ( $20,7\%$ ) dei 29 pazienti con invasione microvascolare ed in 1 ( $2,4\%$ ) dei 41 pazienti che non hanno presentato questa caratteristica.

Nessuno degli altri fattori considerati quali potenziali rischi di recidiva neoplastica dopo trapianto di fegato (sesso del ricevente, epatopatia di base, criteri di Milano, stadio pT, tipo di tumore e grading istologico, differenti schemi immunosoppressivi – ciclosporina, azatioprina e steroidi versus ciclosporina e steroidi)

hanno mostrato una relazione significativa con la sopravvivenza libera da malattia (tabella 4). L'analisi multivariata che ha considerato esposizione alla ciclosporina, alfa-fetoproteina ed invasione microvascolare evidenzia che solo l'esposizione alla ciclosporina è un fattore di rischio indipendente per la sopravvivenza libera da recidiva ( $P < 0,001$ ), mentre l'alfa-fetoproteina ( $P=0,505$ ) e l'invasione microvascolare ( $P=0,138$ ) non rientrano nel quadro.

La distribuzione di tutte le variabili nei pazienti con esposizione a ciclosporina maggiore di 189,6 ng/mL (alta esposizione) ed in pazienti con esposizione a ciclosporina inferiore o pari a 189,6 ng/mL (bassa esposizione) è riportata in tabella 5. In particolare, nessuna differenza è stata riscontrata nella distribuzione dei fattori clinici, patologici ed istologici nei due gruppi, se si eccettua una elevata prevalenza di tumori allo stadio pT2-pT3 nei pazienti con esposizione elevata (18 su 46; 39,1%;  $P=0,042$ ); quando correlato con l'esposizione alla ciclosporina nel modello statistico, il pT, quale fattore di rischio per recidiva neoplastica, non mostra significatività.

L'incidenza di rigetto acuto o cronico non differisce nei pazienti con elevata (7 su 23 o il 30%) o con bassa (8 su 49, ossia 16,3%) esposizione alla ciclosporina. I boli di steroidi (1 g di metil prednisolone somministrato per via endovenosa), utilizzati per il trattamento del rigetto acuto, non incrementano il rischio di recidiva di HCC (2 recidive in 15 pazienti che hanno ricevuto il bolo di steroidi versus 5 in 55 pazienti non trattati;  $P=1.0$ ). Nessun paziente di questo studio è stato trattato con anticorpi antilinfocitari in corso di rigetto.

## *DISCUSSIONE*

Il trapianto di fegato, quale opzione terapeutica nel trattamento chirurgico dell'epatocarcinoma, offre le migliori garanzie di sopravvivenza quando, alla base, vi sia un'accurata selezione del paziente. Nessuno, per ora, ha ancora proposto alternative che raggiungano i medesimi risultati favorevoli prodotti dal trapianto.

I criteri proposti nel 1996 da Mazzaferro sono oggi comunemente accettati dalla maggior parte dei Centri Trapianto quali condizioni necessarie per avviare al trapianto di fegato un paziente affetto da epatocarcinoma. Se da un lato l'applicazione di criteri così

restrittivi ha apportato un indubbio vantaggio in termini di risultati, essa ha tuttavia determinato l'esclusione di un elevato numero di pazienti, ed è pertanto stata fonte di grave imbarazzo per il clinico, chiamato a giudicare l'eligibilità del paziente al trapianto.

Lo studio di Mazzaferro, tuttavia, si basava su 48 pazienti trapiantati di fegato per epatocarcinoma non resecabile tra il 1991 ed il 1995. In questo gruppo di pazienti, selezionato secondo i criteri precedentemente menzionati, veniva riportata una sopravvivenza complessiva ad 1, 3 e 5 anni dell'85%, 83% ed 80%, con sopravvivenza libera da recidiva a 4 anni pari all'83%. L'ottima prognosi indicata da questo studio potrebbe dunque essere posta in relazione alla rigida selezione del paziente e del tumore.

L'applicazione dei criteri anatomo-patologici di Mazzaferro nella selezione del paziente ha senza dubbio contribuito al miglioramento dei risultati ottenuti dai singoli Centri Trapianto; nel presente studio, tuttavia, viene sottolineato il ruolo dell'immunosoppressione quale determinante prognostico nello sviluppo della recidiva neoplastica. Il miglioramento nella gestione del paziente trapiantato, in particolare in relazione alla terapia immunosoppressiva (elemento di sicuro impatto sul piano oncologico), può infatti suggerire una rivalutazione dei parametri stabiliti dallo studio.

All'inizio dell'attività di trapianto di fegato (attorno alla metà degli anni ottanta) una delle principali preoccupazioni nella gestione postoperatoria del paziente era evitare il rigetto acuto e cronico del graft, complicanza che spesso penalizzava i risultati del trapianto. Il principale farmaco immunosoppressivo (la ciclosporina) non è dotato di un preciso dosaggio terapeutico e la dose efficace, quindi, veniva e viene tuttora mantenuta tale sulla base dei livelli sierici del farmaco e/o dei suoi metaboliti. Al fine di evitare il rigetto del graft, tali valori venivano un tempo mantenuti molto al disopra della concentrazione minima efficace, sottoponendo così il paziente ad elevate dosi di immunosoppressore. La progressiva acquisizione di esperienza nella gestione postoperatoria del paziente e della terapia immunosoppressiva ha consentito, negli ultimi anni, una riduzione del dosaggio complessivo di tali farmaci.

Il possibile ruolo di un ben noto fattore di rischio di sviluppo tumorale, ovvero l'immunosoppressione è stato quindi, in passato, sottovalutato nel considerare i trapianti di fegato per epatocarcinoma (16). In un precedente studio di questo gruppo (17), è stato dimostrato che la dose globale di ciclosporina somministrata nell'arco del primo anno dal trapianto era un fattore di rischio

indipendente nella recidiva di HCC. Tuttavia si potrebbe supporre che la grande variabilità nell'assorbimento del farmaco dovuta alla somministrazione per via orale potrebbe avere influenzato i risultati di quello studio; infatti, l'assunzione di maggiori dosi di ciclosporina può non necessariamente riflettere un maggior effetto immunosoppressivo una volta che sia stabilito il livello ematico del farmaco. La misurazione delle concentrazioni sieriche di ciclosporina mediante anticorpi monoclonali riflette, effettivamente, il livello di immunosoppressione farmacologica ottenuto. Da rimarcare che l'incidenza di recidiva di HCC in questa serie è stata maggiore nei pazienti con più elevata esposizione alla ciclosporina; questo è stato l'unico determinante prognostico indipendente della recidiva tumorale.

Al contrario di ciò che era stato in precedenza rilevato, nel corrente studio l'analisi multivariata ha considerato non solo fattori prognostici patologici come i criteri di Milano e lo stadio TNM, ma anche caratteristiche istologiche, in particolare il grading della neoplasia e l'invasione tumorale microvascolare, quali fattori significativi (18).

In questo studio viene dimostrato il ruolo chiave dell'immunosoppressione nello sviluppo della recidiva neoplastica dopo trapianto di fegato. In particolare si raccomanda, nei pazienti sottoposti a trapianto per HCC e trattati successivamente con ciclosporina, di non superare i livelli ematici di farmaco che sono stati indicati come valori cutoff. Sulla base dell'accresciuta esperienza clinica, i più comuni agenti immunosoppressori possono essere somministrati allo scopo di ridurre il dosaggio al minimo efficace riguardo al loro ruolo nella prevenzione del rigetto, e ciò riveste importanza soprattutto nei pazienti trapiantati per HCC (19,20). L'incidenza di rigetto acuto o cronico non differisce, infatti, nei pazienti con elevati e con bassi livelli ematici di ciclosporina; ciò rimarca l'importanza di evitare una non necessaria quanto dannosa sovraimmunosoppressione.

E' quindi ipotizzabile un allargamento dei criteri anatomo-patologici nella selezione dei pazienti candidati al trapianto di fegato, in considerazione del minore dosaggio della terapia immunosoppressiva attualmente somministrata: tale posologia potrà essere mantenuta ad un livello inferiore, che consenta una concentrazione plasmatica più vicina alla concentrazione minima efficace.

In conclusione, pazienti ad elevato rischio di recidiva neoplastica potrebbero beneficiare di una immunosoppressione effettuata con i più bassi livelli efficaci di inibitori della calcineurina. A tale proposito, è particolarmente promettente l'introduzione di

protocolli immunosoppressivi utilizzando farmaci che potrebbero mostrare di possedere effetti anti-neoplastici (21,22). Ciò permetterebbe il recupero di una parte di quei pazienti precedentemente esclusi e, per questo, avviati a trattamenti palliativi e ad una prognosi sfavorevole. In ultima analisi, il recupero di questi pazienti consentirebbe di innalzare la sopravvivenza globale per carcinoma epatocellulare.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Bismuth H, Majno PE, Adam R, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1999; 19(3):311-322.
- 2) Iwatsuki S, Gordon RD, Shaw BW, Starzl TE. Role of liver transplantation in cancer therapy. *Ann Surg* 1985; 202:401-407.
- 3) Pichlmayr R, Weimann A, Ringe B, et al. Indication for liver transplantation for hepatobiliary malignancy. *Hepatology* 1994; 20: S33-S40.
- 4) O'Grady JG, Polson RJ, Rolles K, Calne RY, Williams R. Liver transplantation for malignant disease: results in 93 consecutive patients. *Ann Surg* 1988; 207:373-379.
- 5) Ringe B, Wittekind C, Bechstein WO, Bunzendahl H, Pichlmayr R. The role of liver transplantation in hepatobiliary malignancy: a retrospective analysis of 95 patients with particular regard to tumor stage and recurrence. *Ann Surg* 1989; 209:88-98.
- 6) Bismuth H, Chiche L, Adam R, et al. Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Ann Surg* 1993; 218:145-151.
- 7) Mazzaferro V, Regalia E, Gennari L, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Eng J Med* 1996; 334(11): 693-699.
- 8) Yao FY, Ferrel L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001; 33:1394-1403.
- 9) Cillo U, Vitale A, Bassanello M, Boccagni P, Brolese A, Zanusi G, et al. Liver transplantation for the treatment of moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2004; 239:150-159.
- 10) *AJCC cancer staging handbook*. 6<sup>th</sup> ed. New York, NY:Springer, 2002:145-153.

- 11) Levy GA. Neoral/cyclosporine-based immunosuppression. *Liver Transpl Surg* 1999; 5, Suppl 1:S37-S47.
- 12) Jain A, Khanna A, Fung JJ, et al. Immunosuppressive therapy: New concepts. *Surg Clin North Am* 1999; 79:59-76.
- 13) Iwatsuki S, Yokoyama I, Starzl TE, et al. Accelerated growth rates of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Cancer* 1991; 68(10):2095-2100.
- 14) Penn I. Posttransplantation de novo tumors in liver allograft recipients. *Liver Transpl Surg* 1996;2:52-59.
- 15) Hanley JA. Receiver operating characteristic (ROC) methodology: the state of the art. *Crit Rev Diagn Imaging* 1989; 29:307-335.
- 16) Yokoyama I., Carr B., saitsu H., Iwatsuki S., Starzl T.E. accelerated growth rates of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Cancer* 1991; 68:2095-2100.
- 17) Vivarelli M, Bellusci R, Cucchetti A, Cavrini G, De Ruvo N, Aden AA, et al. Low recurrence rate of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: better patient selection or lower immunosuppression? *Transplantation* 2002; 74:1746-1751.
- 18) Esnaola NF, Lauwers GY, Mirza NQ, Nagorney DM, Doherty D, Ikai I et al. Predictors of microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma who are candidates for orthotopic liver transplantation. *J Gastrointest Surg* 2002; 6:224-232.
- 19) Freise CE, Ferrel L, Liu T, Ascher NL, Roberts JP. Effect of systemic cyclosporine on tumor recurrence after liver transplantation in a model of hepatocellular carcinoma. *Transplantation* 1999; 67:510-513.
- 20) Klintmalm GB. Induction and maintenance of immunosuppression. In: Busutti RW, Klintmalm GB, eds. *Tranplantations of the liver*. Philadelphia, PA:W.B. Saunders Company, 1996:741-753.
- 21) Kneteman NM, Oberholzer J, Al Saghier M, Meeberg GA, Blitz M, Ma MM. Sirolimus-based immunosuppression for liver transplantation in the presence of extended criteria for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2004; 10:1301-1311.

- 22) Guba M, Graeb C, Jauch KW, Geissler EK. Pro- and anticancer effects of immunosuppressive agents used in organ transplantation. *Transplantation* 2004; 77:1777-1782.

**TABELLA 1**

Caratteristiche di 70 pazienti con HCC sottoposti a trapianto di fegato e trattati con ciclosporina quale principale farmaco immunosoppressore.

	Numero (%)	Dimensioni medie (range)*
Sesso del ricevente:		
maschio	62 (88,6)	
femmina	8 (11,4)	
Classe di Child:		
A	10 (14,3)	
B	33 (47,1)	
C	27 (38,6)	
Etiologia della cirrosi:		
HBV	22 (31,4)	
HBV-HCV	4 (5,7)	
HCV	34 (48,6)	
Altre	10 (14,3)	
Criteri di Milano:		
non rispettati	13 (18,6)	
rispettati	57 (81,4)	
Stadio pT:		
pT1	24 (34,3)	1.8 (0.6-4.8)
pT2	44 (62,9)	
solitario	13	3.0 (1.2-5.0)
multiplo	31	2.4 (0.5-4.5)
pT3	2 (2,9)	
solitario	1	4.0**
multiplo	1	5.2
Tipo di neoplasia:		
Non incidentale	52	
pT1	16 (30,7)	2.0 (1.2-4.8)
pT2	34 (65,3)	2.8 (0.8-5.0)
pT3	2 (3,8)	4.6 (4.0-5.2)
Incidentale		
pT1	8 (44,4)	1.5 (0.6-2.5)
pT2	10 (55,5)	1.6 (0.5-3.3)
Grading istologico:		
I -II	41 (58,6)	
III - IV	29 (41,4)	
Invasione microvascolare:		
assente	41 (58,6)	
presente	29 (41,4)	
*Dimensioni medie del nodulo principale, espresse in cm. ** Con coinvolgimento di un ramo portale maggiore		

### TABELLA 2

Caratteri della recidiva di HCC dopo trapianto di fegato in pazienti che hanno ricevuto ciclosporina quale principale farmaco immunosoppressore

Patient	pT Stage	Time to recurrence (months)	Site of recurrence
1	pT2	32	Spine, chest wall
2	pT3	7	Lung, multiple liver lesions
3	pT2	11	Multiple liver lesions
4	pT2	11	Neck mass, abdominal LN
5	pT2	40	Multiple liver lesions
6	pT2	2	Lung, abdominal LN
7	pT2	24	Spine, chest wall

LN: lymph nodes

### TABELLA 3

Analisi univariata delle variabili continue come fattori di rischio per recidiva di HCC in pazienti trattati con ciclosporina quale principale farmaco immunosoppressore.

Variable	Mean $\pm$ S.D.	p-value	OR (95% C.I.)
CsA exposure (ng/mL)			
Recurrence	278.3 $\pm$ 86.4	<0.001	1.05 (1.02-1.08)
No Recurrence	169.9 $\pm$ 33.3		
Cumulative Steroids dosage (mg)			
Recurrence	3759.7 $\pm$ 1149.1	0.887	1.00 (0.99-1.00)
No Recurrence	3664.6 $\pm$ 1467.7		
Cumulative Azathioprine dosage (mg)			
Recurrence	8675.0 $\pm$ 1237.4	0.879	1.00 (0.99-1.00)
No Recurrence	9387.5 $\pm$ 6678.9		
Recipient Age			
Recurrence	51.1 $\pm$ 7.9	0.803	0.99 (0.90-1.08)
No Recurrence	50.6 $\pm$ 8.6		
AFP (Log <sub>10</sub> ng/mL)			
Recurrence	1.62 $\pm$ 0.60	0.032	3.19 (1.10-9.23)
No Recurrence	1.06 $\pm$ 0.60		
Size of the main tumor (cm)			
Recurrence	2.8 $\pm$ 1.5	0.255	1.42 (0.77-2.59)
No Recurrence	2.3 $\pm$ 1.1		

*TABELLA 4*

Analisi univariata delle variabili categoriche come fattori di rischio per recidiva di HCC in pazienti trattati con ciclosporina quale principale farmaco immunosoppressore.

Variable	No. of recurrences/ No. of patients	p-value	OR (95% C.I.)
Recipient sex			
Male	6/62 (9.7%)	0.728	0.69 (0.08-5.72)
Female	1/8 (12.5%)		
Underlying liver disease			
Viral-related	7/60 (11.7%)	0.523	-
Non-viral-related	0/10 (-)		
Milan criteria			
Fulfilled	6/57 (10.5%)	0.832	1.25 (0.15-10.50)
Unfulfilled	1/13 (7.7%)		
pT stage			
pT2-T3	7/46 (15.2%)	0.259	-
pT1	0/24 (-)		
Type of tumor			
Non-incident	7/52 (13.5)	0.325	-
Incidental	0/18 (-)		
Histological grading			
III-IV	4/29 (13.8%)	0.367	1.99 (0.44-8.89)
I-II	3/41 (7.3%)		
Microvascular invasion			
Present	6/29 (20.7%)	0.044	8.76 (1.05-72.80)
Absent	1/41 (2.4%)		
Immunsuppression schedule			
CsA+Steroids	1/26 (3.8%)	0.254	3.42 (0.41-28.49)
CsA+Steroids+Azathioprine	6/44 (13.6%)		

### TABELLA 5

Caratteristiche cliniche ed istopatologiche dei pazienti trapiantati, correlata all'esposizione alla Ciclosporina.

Variable	No. of pts with high CsA exposure* / all pts on CsA (%)	p-value
Milan criteria		
Unfulfilled	4/13 (30.8%)	0.947
Fulfilled	17/57 (29.8%)	
pT stage		
pT2-T3	18/46 (39.1%)	0.042
pT1	3/24 (12.5%)	
Type of Tumor		
Non incidental	17/52 (32.7%)	0.591
Incidental	4/18 (22.2%)	
Histologic grading		
III-IV	9/29 (31.0%)	0.874
I-II	12/41 (29.3%)	
Microvascular invasion		
Present	11/29 (37.9%)	0.341
Absent	10/41 (24.4%)	
Immunsuppression schedule		
CsA+Steroids	7/26 (26.9%)	0.871
CsA+Steroids+Azathioprine	14/44 (31.8%)	

\*: CsA exposure above 189.6 ng/mL

FIGURA 1:

Confronto fra livelli medi di ciclosporinemia in pazienti con e senza recidiva di HCC dopo trapianto di fegato.

