

Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN TRAPIANTO DI FEGATO:
IMMUNOLOGIA CLINICA E DI BASE ED IMMUNODEPRESSIONE

Terapia di combinazione con Micofenolato
Mofetile ed inibitori della calcineurina a basse
dosi: utilità della riduzione della
concentrazione ematica pre-dose in pazienti
sottoposti a trapianto di fegato con
insufficienza renale cronica.

Tesi di Dottorato

Coordinatore: Chiar.mo
Prof. Roberto Bellusci

Relatore: Chiar.mo
Prof. Piero Andreone

Presentata da
Dott.ssa Alessandra Scuteri

Correlatore: Chiar.mo
Prof. Gian Luca Grazi

Parole chiave: Micofenolato Mofetil, Trapianto, Fegato, Insufficienza renale cronica,
Inibitori calcineurina

Anno Accademico 2006/2007

INDICE

1. PARTE INTRODUTTIVA

1.1 L'IMMUNOSOPPRESSIONE NEL TRAPIANTO DI FEGATO:

Corticosteroidi

Inibitori della Calcineurina (IC)

Sirolimus

Everolimus (RAD)

Azatioprina(AZA)

Inibitori della proliferazione linfocitaria:

– Globulina Antitimocita(ATG)

– OKT3

Bloccanti il recettore linfocitario per l'IL-2:

– Anticorpi Anti-CD25

1.2 MICOFENOLATO MOFETILE:

– Caratteristiche

– Applicazioni terapeutiche

– Effetti collaterali

– Micofenolato Mofetile e Tumori de novo post-OLT

– Azioni al di fuori del trapianto d'organo

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 INTRODUZIONE

2.2 PAZIENTI E METODI

2.3 RISULTATI

2.4 DISCUSSIONE

3. BIBLIOGRAFIA

1. PARTE INTRODUTTIVA

Il trapianto ortotopico di fegato (OLT: orthotopic liver transplantation), è oramai uscito dalla fase sperimentale per diventare un'opzione terapeutica di elezione per il trattamento delle numerose patologie metaboliche, congenite e per le epatopatie acute e croniche in fase terminale, le cosiddette End-stage liver Diseases. E' trascorso più di un quarto di secolo da quando, a Denver nel 1963 Thomas Starzl, effettuò il primo tentativo di trapianto di fegato, su un bambino affetto da atresia biliare, senza riuscirci. Sebbene l'insuccesso, il lavoro del Dr. Starzl rappresentò una pietra miliare nella chirurgia aprendo la strada al primo trapianto ortotopico di fegato umano riuscito nel 1967.

A partire dagli anni '80 l'affinamento delle tecniche chirurgiche, la progressione delle conoscenze dei meccanismi che regolano la risposta immune, le nuove conoscenze in materia di immunosoppressione, l'ottimizzazione del supporto anestesilogico e rianimatorio, hanno fatto sì che la sopravvivenza ad un anno, a cinque anni e a dieci anni si attestasse nei centri d'esperienza rispettivamente sul 90%, sull'80% e sul 70%, rendendo questo tipo di approccio una terapia efficace (1). Nella maggior parte delle casistiche, la più frequente indicazione al trapianto è rappresentata dalla cirrosi epatica ad eziologia virale (57,4%), difatti attualmente circa un terzo dei pazienti che vanno al trapianto è affetto da cirrosi da virus C non più controllabile clinicamente. Tra le altre indicazioni di maggiore riscontro rientrano l'epatopatia alcolica (9,2%), le epatopatie autoimmuni (0,8%), la steatoepatite non alcolica, le epatopatie colestatiche (cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante primitiva, atresia biliare), l'insufficienza epatica acuta post-epatitica o tossica, le malattie genetiche (emocromatosi, malattia di Wilson, amiloidosi, etc.). Il numero dei trapianti epatici ha subito negli ultimi

anni un notevole incremento, superando negli anni'90 i 4000 interventi negli USA e i 3000 interventi in Europa. (2).

1.1 L'IMMUNOSOPPRESSIONE NEL TRAPIANTO DI FEGATO

La terapia immunosoppressiva nell'ambito del periodo post-OLT ha un ruolo cruciale per la sopravvivenza del paziente e del graft dopo il trapianto. Il notevole miglioramento della sopravvivenza nei pazienti nel post trapianto è dovuto, tra l'altro, allo sviluppo di nuovi farmaci immunosoppressori, e all'adozione di schemi di terapia immunosoppressiva combinata, i quali, prevedendo farmaci con differenti meccanismi d'azione e con un diverso profilo di effetti collaterali, hanno reso il trattamento più efficace e sicuro.

Gli immunosoppressori possono essere classificati in cinque categorie:

- corticosteroidi;
- Inibitori della Calcineurina (IC) quali tacrolimus (Tac) e ciclosporina (CsA);
- inibitori della biosintesi delle purine, quali azatioprina (AZA) e micofenolato mofetile (MMF);
- inibitori del recettore mammario della rapamicina, quali sirolimus (Sir) ed everolimus (RAD);
- anticorpi monoclonali o policlonali (OKT3, anticorpi anti-CD25, globuline antitimocita) (3).

L'alba di una nuova era nel campo dell'immunospressione ha inizio negli anni'80 con l'impiego degli inibitori della calcineurina (IC): ciclosporina A (CsA) o Tacrolimus (Tac) (1,4,5,6). Sebbene l'incidenza di rigetto acuto e di rigetto cronico durante il primo anno dopo il

trapianto sia più alta nei pazienti immunosoppressi con CsA rispetto a quelli immunosoppressi con Tac (40%-50% vs 30%-50% rispettivamente) (4,5), entrambi si sono rivelati sicuri ed efficaci, nonostante la possibilità di controllare adeguatamente gli episodi rigettuali ricorrendo all'uso di steroidi. Nel post-OLT il rigetto cellulare acuto si verifica circa 5-15 giorni dopo il trapianto, o anche più tardi, nell'eventualità in cui il regime immunosoppressivo sia stato inadeguato. Il rischio più elevato di rigetto cellulare acuto riguarda la fase precoce dopo il trapianto è sospettato in presenza di un rialzo delle transaminasi e/o della fosfatasi alcalina, che precede tipicamente la comparsa di febbre e ittero. La diagnosi è confermata istologicamente dal rilievo di endotelialite, stigmate di colangite ed infiltrato portale mononucleato (7).

Il trattamento di prima scelta è rappresentato da alte dosi di steroidi (500-1000 mg di metilprednisolone per 3-5 giorni), efficace nel 75% dei casi; un secondo ciclo è efficace in un addizionale 10% dei casi (8,9). In circa il 10% dei casi il rigetto acuto risulta resistente alla terapia steroidea, nonostante la presenza di efficaci concentrazioni ematiche di IC e il ricorso ad altre strategie terapeutiche (1,5). Tra queste, la sostituzione ("switch") da CsA a Tac o l'uso di anticorpi monoclonali diretti contro le cellule T (OKT3), quest'ultima possibilità gravata però da un aumentato rischio di infezioni e di malattie linfoproliferative. L'introduzione di nuovi immunosoppressori quali il sirolimus (Sir) e il micofenolato mofetile (MMF), hanno permesso che gran parte di questi importanti effetti collaterali fossero evitati. Nonostante la messa in atto di queste strategie terapeutiche una piccola percentuale di pazienti, progredirà comunque verso un severo rigetto duttopenico, rendendo necessario il ricorso al ritrapianto. Oggi il rigetto non rappresenta più uno fra i problemi principali dei pazienti nel post-OLT, tanto che solo un quarto circa di loro ne sviluppa un episodio. Tuttavia, il trattamento a lungo

termine con IC, espone il paziente trapiantato al rischio di sviluppare importanti effetti collaterali, come la nefrotossicità, l'ipertensione arteriosa, l'iperlipemia, l'osteoporosi, una percentuale compresa fra il 10% e il 28% dei pazienti sviluppa manifestazioni neurologiche (dal fine tremore delle mani alla neuropatia periferica), i quali incidono in maniera determinante sulla sopravvivenza a lungo termine dell'organo trapiantato e del paziente stesso (10). Di seguito sono sintetizzate le principali caratteristiche degli agenti immunosoppressori adoperati nella gestione del trapianto di fegato.

CORTICOSTEROIDI

I corticosteroidi continuano a far parte del regime immunosoppressivo iniziale e di mantenimento del trapianto di fegato. La loro attività immunosoppressiva è caratterizzata dal ridurre la sintesi di citochine (IL-1,IL-2,IL-3,IL-6) attraverso l'interazione con la trascrizione genica, inibiscono la migrazione e la fagocitosi dei macrofagi ed incrementano la stabilità di membrana. Molteplici sono gli effetti collaterali legati alla terapia steroidea a lungo termine e la maggior parte è dose-dipendente: diabete, infezioni, sindrome di Cushing, osteoporosi, ipertensione arteriosa, iperlipemia, irsutismo, sintomi gastrointestinali (ulcera gastrica e duodenale), cataratta.e complicanze cardio-vascolari, con un'incrementata morbilità e mortalità. Studi recenti hanno dimostrato che è possibile la progressiva riduzione fino alla sospensione (il cosiddetto "tapering") a partire dai primi sei mesi dal trapianto, lasciando il paziente solo in terapia immunosoppressiva con IC o con terapie combinate che non prevedono lo steroide, senza comunque un'aumentata incidenza di rigetti acuti (11,12). Inoltre, vista la promozione della replicazione virale relata all'utilizzo di steroidi, il loro

“tapering” e la loro interruzione precoce sono fortemente raccomandati nei pazienti sottoposti a OLT per cirrosi epatiche virus-indotte (13).

INIBITORI DELLA CALCINEURINA (IC)

Gli IC continuano a rappresentare il cardine negli schemi immunosoppressivi della maggior parte dei Centri Trapianto di fegato. I principali farmaci di questa categoria sono la Ciclosporina (CsA) e il Tacrolimus (Tac) entrambi si legano a specifici recettori citoplasmatici (Ciclofilina e FK binding protein 12, rispettivamente) e, attraverso l'interazione con questi ultimi, inattivano la calcineurina, un enzima cardine nell'attivazione e nel segnale delle cellule Thelper. L'inibizione del complesso calcineurina-calmodulina, impedisce la trascrizione dei geni per l'interleuchina 2 (14). Figura: 1

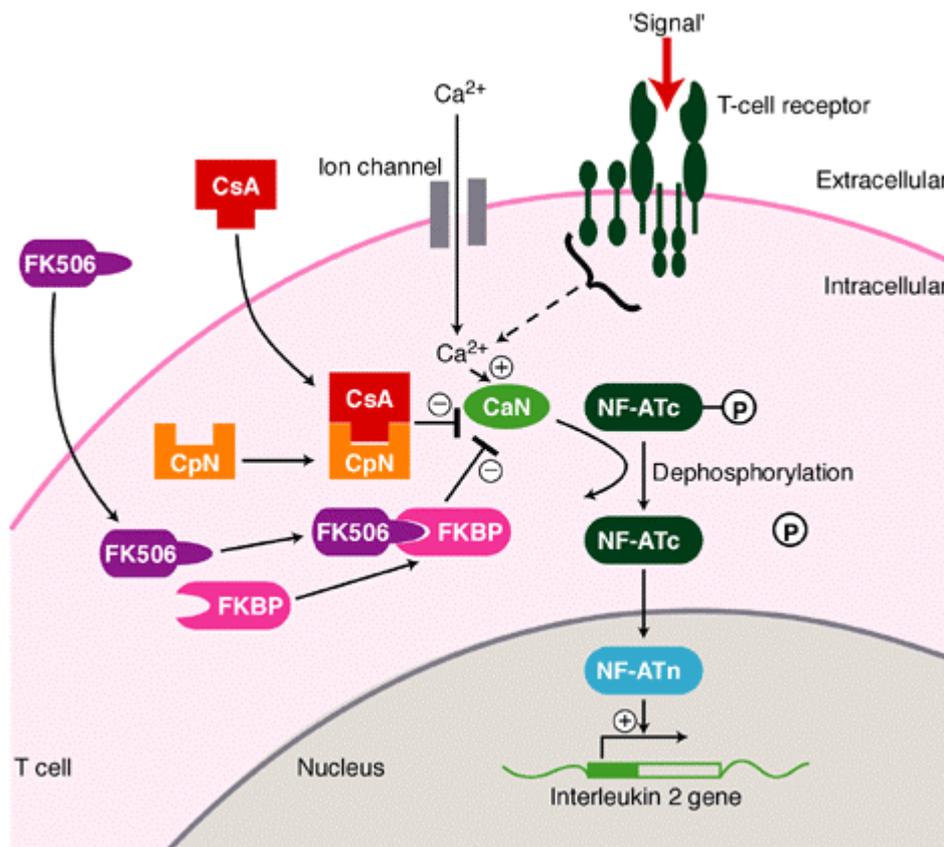


Figura 1. *Meccanismo di azione degli Inibitori della Calcineurina*

Anche la Ciclosporina si associa a severi e significativi effetti indesiderati: ipertensione arteriosa, nefrotossicità acuta e cronica, tremori, irsutismo, iperplasia gengivale, cefalea, meno frequenti disturbi gastrointestinali, acne e diabete. La minimizzazione di questi effetti può essere ottenuta attraverso il dosaggio periodico della concentrazione della CsA sierica, al fine di evitare oscillazioni verso l'alto, che esacerberebbero il corteo di effetti collaterali, e oscillazioni verso il basso, che favorirebbero il verificarsi di rigetti; oppure adottando dosaggi di CsA più bassi in associazione ad altri farmaci immunosoppressivi, tra i quali per esempio, il MMF, ma questo approccio non è ancora stato consistentemente dimostrato.

Il Tac è un antibiotico macrolide con potenti proprietà immunosoppressive; infatti è 100 volte più potente in vitro, e 10 volte in vivo della CsA nell'inibire le risposte T-cellulari. Sotto il profilo tossicologico il Tac è simile a quello della CsA ma con una più bassa incidenza e severità di rigetti nella terapia immunosoppressiva, assieme ad una migliore sopravvivenza del graft e del paziente (6). Sebbene il Tac abbia lo stesso meccanismo d'azione della CsA, differente è il profilo di effetti collaterali; infatti, a parità di nefrotossicità, i pazienti trattati con Tac hanno, da un lato, una più alta incidenza di diabete, neurotossicità, disordini gastrointestinali e, dall'altro, una più bassa incidenza di ipertensione, dislipidemia, irsutismo ed iperplasia gengivale (10).

SIROLIMUS

Il sirolimus (Sir), noto anche con il termine di rapamicina, condivide con il Tac numerose similarità nella struttura, ma diversamente da questo o dalla CsA non sembra influenzare segnali Ca^{2+} -dipendenti; si lega alla FKBP12 (la stessa immunofillina che lega il Tac) tuttavia il complesso non inibisce l'azione della calcineurina, mentre sembra che il complesso Sir-FKBP interagisca con altre proteine cellulari per inibire una differente via di segnale, compresa quella risultante dall'iterazione dell'IL-2 con il suo recettore, inibendo la progressione della cellula T nella fase S del ciclo cellulare. Il Sir inibisce anche la proliferazione delle cellule B e la proliferazione mediata dai fattori di crescita delle cellule non appartenenti al sistema immunitario. Inoltre inibisce la stimolazione delle cellule muscolari lisce ad opera del PDGF (platelet-derived growth factor), elemento che può contribuire alla prevenzione e al trattamento del rigetto cronico (15). Di questo farmaco si ipotizza anche un effetto antiproliferativo nei confronti delle cellule neoplastiche, pertanto si è invocato il suo utilizzo in quei pazienti sottoposti a trapianto di fegato per la presenza di epatocarcinoma (16). Il Sir ha come principali effetti collaterali l'iperlipemia, la comparsa di afte orali, la ridotta cicatrizzazione ed inoltre anemia, leucopenia, dolori gastrointestinali, responsabile anche di nefrotossicità ma inferiore rispetto ai IC. Già approvato nel trapianto di rene, sono in corso numerosi studi per validarne la sicurezza e l'efficacia anche nel trapianto di fegato (17).

EVEROLIMUS

L'Everolimus (RAD) è un nuovo lattone macrolide, un derivato chimico ottenuto mediante introduzione di una catena 2-idrossietilica in posizione 40 nella struttura del sirolimus che determina un incremento della polarità della molecola e migliora la biodisponibilità dopo somministrazione orale con potenti proprietà immunosoppressive ed

antiproliferative, attualmente in corso di valutazione in studi clinici per la prevenzione del rigetto del trapianto di organi solidi. Raggiunge una concentrazione massima entro due ore dall'assunzione, mostra un'emivita di 28 ± 7 ore, ha quindi una più rapida clearance e necessita pertanto di una somministrazione bigiornaliera. La concentrazione ottimale è raggiunta in 4 giorni. Gli studi di farmacocinetica hanno dimostrato una proporzionalità con la dose ed una buona correlazione tra il livello ematico basale e l'area sotto la curva; la farmacocinetica del RAD non è influenzata in modo differente se somministrato con dosi piene o ridotte di ciclosporina. RAD viene metabolizzato principalmente dal citocromo CYP3A4 nel fegato e, in una certa misura, anche a livello della parete intestinale. L'Everolimus è efficace nel prevenire il rigetto acuto del trapianto d'organo e nel trattamento del rigetto nell'animale da esperimento. Ha effetti immunospressivi leggermente meno potenti del Sir forse per minore attività di legame con l'FKBP. Tramite il blocco dell'attivazione dell'enzima mTOR (mammalian target of rapamycin) e della p70 S6 chinasi, everolimus inibisce i segnali di proliferazione trasmessi a seguito dell'intervento di IL-2 e IL-5, determinando l'arresto del ciclo cellulare in fase G1. Inibisce anche i segnali forniti da fattori di crescita cellulari ematopoietici e non quali fibroblasti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce.

Il RAD ha lo stesso spettro di effetti collaterali del Sirolimus, principalmente l'iperlipemia, trattabile con adeguate misure dietetiche ed ipolipemizzanti. Recentemente si è visto che il RAD, a differenza di CsA, Tac e Sir che inibiscono il metabolismo ad alta energia di fosfati nelle fette di cervello di ratto in vitro, non solo non esplica questa azione ma antagonizza la riduzione della via ad alta energia di fosfati indotta dalla CsA. Poiché si è postulato che l'inibizione di questa via metabolica possa essere il potenziale meccanismo responsabile della nefrotossicità e

neurotossicità CsA correlata, questa proprietà del RAD potrebbe avere potenziali benefici clinici (3) .

AZATIOPRINA

L'Azatioprina è un farmaco fase-specifico; agente antiproliferativo, agisce mediante l'inibizione enzimatica competitiva bloccando la sintesi dell'acido inosinico, il precursore dei composti purinici acido adenilico e guanilico, per cui il principale effetto è una diminuita sintesi del DNA con conseguente riduzione della replicazione cellulare e fase specificità dell'azione del farmaco. L'azatioprina sembra inibire preferenzialmente le risposte T cellulari rispetto a quelle risultanti dall'attivazione dei linfociti B; nonostante ciò, entrambe le risposte, cellulo-mediata e umorale, possono essere sopresse. è usato come immunosoppressivo dagli anni '60, nei soggetti trapiantati e nel trattamento di molti disordini autoimmuni, in genere quando la terapia corticosteroidica da sola non è in grado di garantire un adeguato controllo. La tossicità dose-dipendente si esplica, principalmente attraverso la mielosoppressione e la conseguente leucopenia. L'azatioprina è meno efficace del MMF nel prevenire l'incidenza di rigetti nei primi sei mesi post-OLT, mentre sono sovrapponibili nella prevenzione della perdita del "graft" a un anno dal trapianto (18).

INIBITORI DELLA PROLIFERAZIONE LINFOCITARIA: GLOBULINE ANTITIMOCITA E OKT3

Alla fine degli anni '60 l'introduzione di anticorpi policlonali contro le cellule T (globulina antilinfocitaria, siero antitimociti, globulina antitimocitica) aprì una strada nel trapianto di organi solidi e portò ad una

aumentata sopravvivenza dell'organo trapiantato. Tali anticorpi policlonali eterologhi, vengono estratti da animali quali il coniglio e il cavallo, immunizzati per mezzo di linfociti T e timociti umani, Queste preparazioni policlonali sono dirette contro svariati epitopi dei linfociti T (CD2, CD3, CD4, CD8, CD28 e T cell-receptor) e contro il CD16, caratteristico delle cellule natural killer e dei macrofagi. Queste immunoglobuline agiscono causando la deplezione dei linfociti T attraverso l'apoptosi, la citolisi Ig-mediata e l'internalizzazione dei recettori cellulari di superficie. Vengono utilizzate nella terapia induttiva post-OLT al fine di ridurre la dose di IC o eliminare l'utilizzo dello steroide. Gli effetti collaterali sono legati a fenomeni allergici e al rilascio di elevate quantità di citochine, causando febbre, brividi, broncospasmo, disturbi gastrointestinali, turbe pressorie (3). A causa dell'immunosoppressione non specifica raggiunta con gli anticorpi policlonali e l'aumentata conoscenza sul rigetto e sull'attivazione delle T cellule, la ricerca si indirizzò allo sviluppo di anticorpi monoclonali specifici contro le cellule T.

Il primo anticorpo monoclonale commercialmente disponibile fu il muromonab-CD3 (OKT3) nel 1981 (anti CD3 di topo) diretto verso una specifica porzione dei linfociti T. Esplica la sua attività legandosi all'antigene CD3 presente sulla superficie delle cellule T. Questo legame inattiva l'adiacente T cell-receptor, che gioca un ruolo critico per l'attivazione dei T linfociti. Il risultato è un rapido decremento del numero di linfociti maturi. L'indicazione all'utilizzo dell'OKT3 è il rigetto acuto refrattario alla terapia steroidea; oggi però viene usato meno che in passato, visto il profilo di effetti collaterali, simile alle ATG, la perdita di efficacia dopo la prima somministrazione (per la formazione di anticorpi anti-OKT3) e la minore incidenza di rigetti acuti severi nei pazienti sottoposti a OLT (oggi molti centri preferiscono aumentare le

dosi del Tac e, se il rigetto è ancora presente, utilizzare boli di steroidi) (19,20).

BLOCCANTI IL RECETTORE LINFOCITARIO PER L'IL-2: ANTICORPI ANTI CD 25

Rientrano in questa categoria il basiliximab ed il daclizumab, diretti contro il recettore dell'interleuchina 2, sono di origine chimerica, e di derivazione umana, che riducono l'immunogenicità e aumentano le funzioni effettrici umane immuni. L'immunosoppressione è ottenuta mediante un antagonismo competitivo della proliferazione T cellulare indotta dall'interleuchina 2. Non sono documentati effetti collaterali e, sebbene il loro utilizzo non sia approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trapianto di fegato, il loro impiego sembra essere in continuo aumento (19).

1.2 MICOFENOLATO MOFETILE: CARATTERISTICHE

Il MMF (Figura 2) è l'estere 2-morfolinoetilico dell'acido dell'acido micofenolico (MPA), un prodotto ottenuto dalla fermentazione di specie fungine del genere *Penicileium*.

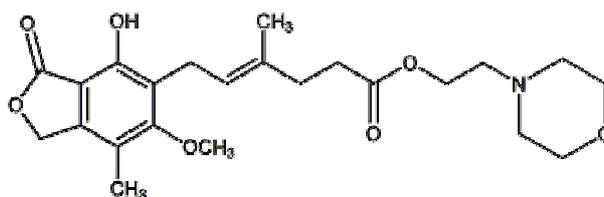


Figura 2. *Struttura del MMF*

MPA è un potente inibitore non competitivo e reversibile della inositolo-monofosfato-deidrogenasi (IMPDH) un enzima critico nella sintesi de novo delle purine durante la proliferazione cellulare (21,22).

I linfociti T e B utilizzano di preferenza la via de novo per la sintesi delle purine e perciò sono particolarmente sensibili all'azione del farmaco rispetto alle altre popolazioni cellulari che sono in grado di sintetizzare la purine anche attraverso vie biochimiche alternative (via di salvataggio) (23,24) (Figura 3).

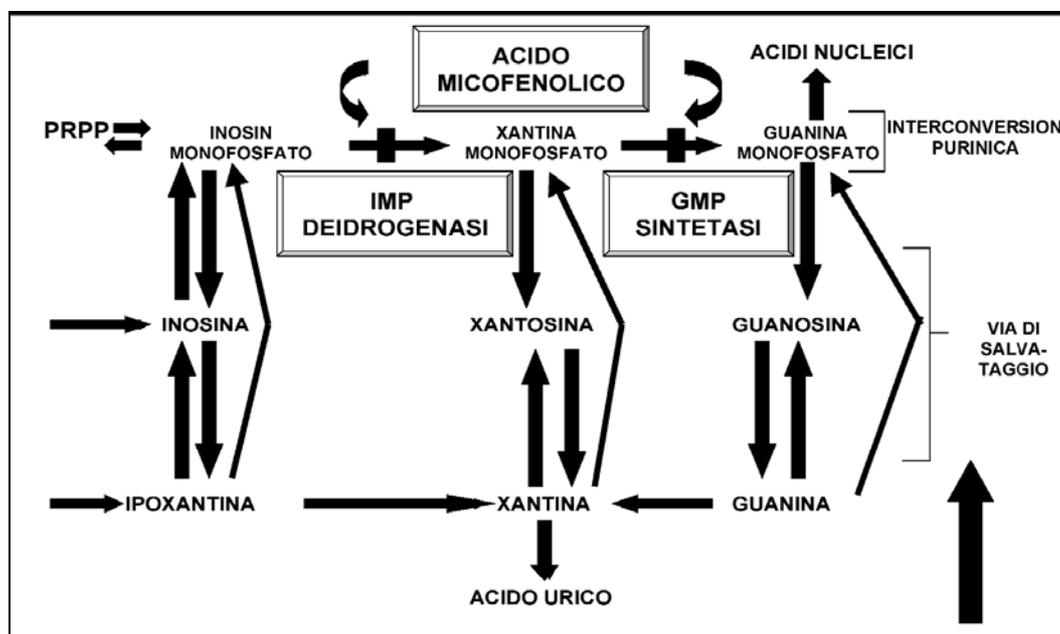


Figura 3. *Meccanismo d'azione del MMF*

Diversi studi sul MMF mostrano oltre l'ormai ben noto effetto immunosoppressivo, altri effetti aggiuntivi, compreso quello antinfiammatorio che si esplica attraverso l'inibizione della glicosilazione delle molecole di adesione, l'inibizione dell'osteopontina e del reclutamento dei leucociti nei luoghi dell'infiammazione. Inoltre, riduce la produzione di citochine derivanti dai linfociti e macrofagi e di fattori di crescita come PDGF, TNF, TGF1 (25). L'attività

immunosoppressiva del MMF è stata per la prima volta descritta da Morris e collaboratori nel 1990 con il prolungamento della sopravvivenza di un ratto sottoposto a trapianto di cuore (26). L'efficacia immunosoppressiva del MMF è dimostrata nella prevenzione e nel trattamento del rigetto acuto dei riceventi il trapianto di rene (27), il trapianto di cuore (28), il trapianto di fegato (18) e il trapianto combinato rene-pancreas (29). Il MMF mostra un effetto sinergico con gli IC, senza evidenza di un incremento dei tipici effetti collaterali della CsA o del Tac. Inoltre il MMF, inibendo la proliferazione delle cellule muscolari lisce e dei fibroblasti in studi sperimentali, sembra incidere positivamente sullo sviluppo e sul decorso del rigetto cronico (23,24,30).

Il MMF è un profarmaco, somministrato per via orale, ha un elevato assorbimento, superiore al 90% (31). L'idrolisi ad Acido Micofenolico il metabolita attivo (MPA) avviene già a livello delle cellule epiteliali della mucosa gastrointestinale. A causa del suo rapido assorbimento a livello gastrico, la sua somministrazione risulta essere indipendente dall'assunzione di cibo; infatti, durante l'ingestione di alimenti, il raggiungimento della massima concentrazione sierica dell'MPA viene ritardato solamente di un'ora (32). L'assunzione del MMF prima dei pasti mostra livelli sierici massimi di MPA dopo 1-2 ore (35). Questo porta ad una immediata inibizione dell'inositolo-monofosfato-deidrogenasi (IMPHD) e, conseguentemente, ad un massimo effetto immunosoppressivo, che persiste per più di 12 ore (31,33). Una volta trasformato nel metabolita inattivo MPA-glucoronide (MPAG), ad opera del fegato, e secreto all'interno della bile nell'intestino, l'MPAG viene, in questa sede, riconvertito in MPA e riassorbito nuovamente (circolo enteroepatico). Gli altri metaboliti giocano solo un ruolo minore e così, finalmente, l'MPAG può essere escreto attraverso le urine. Il ricircolo dell'MPA conduce ad un secondo picco delle sue concentrazioni sieriche

6-12 ore dopo la sua assunzione, generando un effettivo periodo di emivita di circa 16 ore (31,35).

Da questa osservazione ne consegue la posologia del farmaco che prevede due somministrazioni al giorno (33,34). La via di somministrazione endovenosa è necessaria soltanto nei primi giorni (almeno quattro) immediatamente successivi al trapianto di fegato al fine di ottenere efficaci concentrazioni sieriche (36).

MICOFENOLATO MOFETILE:

APPLICAZIONI TERAPEUTICHE

MMF NELLA TERAPIA DE NOVO DEL TRAPIANTO

Il MMF, in combinazione con CsA e corticosteroidi, è indicato per la profilassi del rigetto acuto dopo trapianto di organi solidi (rene, cuore, fegato), con particolare riferimento ai trapianti renali in età pediatrica. Lo studio principale presentato a supporto di tale indicazione è uno studio multicentrico, in doppio cieco randomizzato e controllato, condotto da Weisner e collaboratori, su un campione di 565 pazienti sottoposti a trapianto di fegato, hanno valutato l'efficacia del MMF, in combinazione con CsA e steroidi, nel prevenire il rigetto acuto, confrontandolo con l'AZA, sempre in combinazione con CsA e steroidi. Il MMF, alle dosi di 2 x 1,5 g/die, dopo un'applicazione di 2 x 1 g/die endovena per 4/10 giorni, era associato ad un'incidenza di rigetto acuto del 38.8% versus il 47.7% (p=0.025) del gruppo trattato con AZA (1-2 mg pro Kg/die); minore era anche l'incidenza di rigetti resistenti agli steroidi (3.8% versus 8.2%, rispettivamente, p<0.02). Il profilo di effetti collaterali era identico per i due gruppi (disturbi gastrointestinali e tossicità midollare)

(18,36). Anche la combinazione di Tac, MMF e steroidi è risultata essere efficace e sicura nella prevenzione del rigetto d'organo post OLT, con una sopravvivenza a 4 anni del paziente e del graft rispettivamente dell'81.4% e del 77.7%, confrontata con il 77.2% e il 74.2% ($p < 0.0001$) dei pazienti trattati con Tac in associazione agli steroidi (37-39).

MMF NEL RIGETTO RESISTENTE AGLI STEROIDI

In generale il trattamento del rigetto acuto post OLT risulta efficace, verificandosi i rigetti resistenti agli steroidi in meno del 10% dei casi (5). Vista l'alta incidenza di malattie linfoproliferative post trapianto, legate all'utilizzo di anticorpi diretti contro i linfociti T, si è avvertita la necessità di ricercare trattamenti alternativi. Numerosi studi documentano l'efficacia del MMF in questa tipologia di rigetto. Tra questi menzioniamo lo studio di McDiarmid e collaboratori (40), i quali, su una casistica di 23 rigetti resistenti agli steroidi e agli OKT3, hanno osservato una risoluzione del rigetto in 14 pazienti e un miglioramento in 7 dopo trattamento con MMF. Pfitzmann e colleghi (41), su 47 rigetti resistenti agli steroidi (17 casi resistenti anche agli OKT3), hanno documentato una normalizzazione delle transaminasi nell'80.9% dei casi con l'uso di MMF.

MMF NEL RIGETTO CRONICO E NELLA DISFUNZIONE CRONICA D'ORGANO

Fortunatamente rigetto cronico e disfunzione cronica dell'organo trapiantato sono eventi rari, pertanto anche i dati della letteratura sono

piuttosto scarsi e limitati a casistiche numericamente poco rappresentative. Nonostante l'inconsistenza dei dati, sembra che l'uso del MMF sia piuttosto efficace in queste sia pur rare complicanze del trapianto di fegato. In particolare, Pfitzmann ha documentato la stabilizzazione di 5 pazienti su 8 con diagnosi istologica di rigetto cronico e un vantaggio terapeutico (bilirubina e fosfatasi alcalina migliorate da 2.8 ± 0.8 a 1.3 ± 0.3 mg/dl e da 330 ± 40 a 203 ± 18 U/L, rispettivamente, entro sei mesi; $p < 0.019$ per la bilirubina e $p < 0.002$ per la fosfatasi alcalina) in 52 trapiantati su un totale di 60 con diagnosi di disfunzione cronica d'organo (definita dal peggioramento degli indici di funzionalità epatica in assenza di rigetto, epatopatia virale, ischemia e ricorrenza della malattia primitiva), grazie a un dosaggio di 2-3 grammi/die di MMF (41).

MMF E SOSPENSIONE PRECOCE DEGLI STEROIDI

A causa degli importanti e numerosi effetti collaterali legati alla terapia steroidea, nel post-OLT la loro precoce sospensione sarebbe auspicabile. Nel paziente trapiantato difatti gli effetti collaterali degli steroidi si associano ad un aumentato rischio di malattie cardiovascolari con una più alta morbilità e mortalità, facilitano la replicazione del virus C, aumentando così il numero di ritrapianti (42-44). In molti casi la sospensione dello steroide è possibile e il 75 % dei pazienti rimane in monoterapia con IC nel primo anno dopo il trapianto. Anche in questo caso il MMF potrebbe rivelarsi utile. Ringe e collaboratori hanno proposto con successo in 30 pazienti uno schema terapeutico immunosoppressivo, comprendente una singola dose di 500 mg di metilprednisone durante il trapianto, seguita da una terapia di

associazione con MMF e Tac; l'incidenza di rigetti rilevata è stata solo del 26.2% (45).

MMF E TRATTAMENTO DELLA TOSSICITÀ IC-RELATA

Nella terapia immunosoppressiva a base di IC gli effetti collaterali sono dose-correlati, comprendono effetti neurotossici, nefrotossici, ipertensione arteriosa, diabete, ipercolesterolemia, osteoporosi, iperplasia gengivale, alopecia, ipertricosi. In letteratura sono già presenti diversi lavori che documentano un beneficio derivante dall'associazione del MMF a basse dosi di IC, (per la cui trattazione si rimanda alla parte sperimentale), invece pochi e poco concordanti sono gli studi riguardo all'interruzione completa degli IC e all'uso del MMF in monoterapia post OLT.

MMF E INFEZIONI VIRALI NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A OLT

Il MMF si è dimostrato essere in grado di inibire in vitro la replicazione di alcuni virus: il parainfluenzale-3, il Coxsackie virus B4, l'Epstein-Barr virus, il virus dell'epatite B (46). l'herpes virus (47) e l'HIV (48). Non vi sono dati, ne in studi prospettici ne randomizzati, che abbiano dimostrato un qualche ruolo di questo farmaco sulla recidiva da virus B nel post-OLT (49). In pazienti affetti da infezione HCV relata, è stato suggerito un possibile ruolo del MMF nel rallentamento della recidiva post OLT (50). Questo effetto potrebbe essere dovuto all'attività inibitoria del MMF sulla fibrogenesi piuttosto che ad una sua attività antivirale diretta. Tale risultato non ha trovato conferma in uno studio randomizzato, che ha analizzato gli effetti del MMF su una larga coorte di pazienti HCV

positivi (106 trapiantati, divisi in MMF versus no MMF) (51). In conclusione, i risultati promettenti ottenuti in vitro sulle presunte attività antivirali del MMF, sono ben lontani dal trovare un riscontro concreto nella pratica clinica.

EFFETTI COLLATERALI

Il MMF è generalmente ben tollerato. Tuttavia, l'uso di questo farmaco può essere associato a disturbi gastrointestinali (nausea e diarrea) tossicità midollare con (leucopenia, anemia e, raramente, trombocitopenia). L'incidenza è dose dipendente e può essere gestita con successo riducendo il dosaggio del MMF (43); solo in pochi casi si rende necessario la sospensione del trattamento. Senza dubbio i disturbi gastrointestinali sono i più frequenti; in recenti studi, Tredger (52) e Koch (53) riportano rispettivamente il 28.6% e il 25% di disordini gastrointestinali, e il 26.8% e 28.1% di tossicità midollare in 147 e 32 pazienti sottoposti a OLT. L'azione sistemica dell'MPA durante il ricircolo enteroepatico, è la principale responsabile degli effetti lesivi sulla mucosa dell'apparato digerente, rende pertanto identiche le modalità di somministrazione orale ed endovenosa (54). Si può ottimizzare la tollerabilità verso il MMF, attraverso il frazionamento in 3-4 dosi giornaliere e un lento e progressivo incremento della sua dose (55).

MMF E TUMORI DE NOVO POST OLT

Un problema ben noto, legato alla terapia immunosoppressiva è rappresentato dall'incrementata incidenza di tumori de novo e di disordini linfoproliferativi nel post-OLT. Studi prospettici condotti a lungo termine sui pazienti sottoposti a trapianto di rene e trattati con

MMF hanno documentato una più bassa incidenza di tumori maligni, specialmente dei disordini linfoproliferativi (56). Risultati simili sono stati ottenuti dall'analisi dell'UNOS database (57). Si può pensare che l'azione antiproliferativa svolta dal MMF sui linfociti B potrebbe contribuire a una più bassa incidenza di malattie linfoproliferative durante il trattamento immunosoppressivo (36).

AZIONI DEL MMF AL DI FUORI DEL TRAPIANTO D'ORGANO.

Il MMF viene usato in un'ampia varietà di condizioni cliniche e sperimentali oltre che nella gestione dei trapianti di organi solidi. Il MMF ha una delle sue applicazioni di forza nelle malattie dermatologiche; nella cura della psoriasi sebbene con benefici inferiori rispetto alla CsA, nel Pemfigo volgare, fogliaceo, bolloso, paraneoplastico e cicatriziale con buoni risultati e scarsi effetti collaterali. Nella dermatite atopica severa ha prodotto una riduzione delle severità negli "scores" di stadiazione della malattia in una percentuale compresa tra il 68% e il 74%. Risultati contrastanti si leggono in letteratura circa l'utilizzo del MMF nelle malattie croniche intestinali. Oggi è opinione comune il fatto che esso rappresenti l'alternativa di scelta nei pazienti che non tollerano l'AZA. Ulteriore applicazione è rappresentata dall'artrite reumatoide, refrattaria ad altri farmaci antireumatici; alla dose giornaliera di 2 grammi, migliorando il quadro clinico, riducendo il titolo del fattore reumatoide ed i livelli di IgG e IgM, il numero di linfociti T, al prezzo comunque di frequenti sintomi gastrointestinali. Utilizzato con successo in associazione al prednisone nei pazienti con nefrite lupica, refrattari al trattamento a base di ciclofosfamide e prednisone. Utilizzato anche nell'uveite, nella vasculite, nella nefropatia membranosa, nella sclerosi

segmentale focale, nella nefropatia da IgA, ma gli studi segnalati in letteratura sono aneddotici o con campioni e disegni tali da non poter trarre delle conclusioni certe riguardo il vantaggio terapeutico, derivante dall'utilizzo del MMF in queste condizioni patologiche (58).

2. PARTE SPERIMENTALE

STUDIO CLINICO CONTROLLATO SUGLI EFFETTI DELLA CONVERSIONE DALLA TERAPIA CON INIBITORI DELLA CALCINEURINA ALLA TERAPIA CON MICOFENOLATO E INIBITORI DELLA CALCINEURINA A DOSAGGIO RIDOTTO IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI FEGATO.

2.1 INTRODUZIONE

Gli Inibitori della Calcineurina (IC), vale a dire Ciclosporina (CsA) e successivamente Tacrolimus (Tac), rappresentano il cardine della terapia immunosoppressiva nel trapianto ortotopico di fegato, dal momento che essi hanno notevolmente migliorato la sopravvivenza sia del paziente che dell'organo trapiantato. Comunque, gli IC si associano ad un ampio spettro di effetti collaterali rappresentati da: nefrotossicità, diabete, ipertensione e dislipidemia, i quali contribuiscono ad aumentare il tasso di morbilità e mortalità nell'ambito trapiantologico (59,60). L'alterazione della funzione renale si manifesta fra il 50 e l'80% dei pazienti in terapia con IC a lungo termine, e sviluppo di severa insufficienza renale cronica nel 9% dei pazienti dopo 13 anni dal trapianto con progressione nel 10% dei casi verso una forma terminale (61). Inoltre l'insufficienza renale è associata ad una aumentata mortalità (62). Alla luce di questi dati, al fine di limitare il danno renale da IC è stato proposto nei pazienti sottoposti ad OLT una loro sostituzione con altri agenti immunosoppressivi privi di tossicità renale, oppure una riduzione della dose somministrata in associazione ad altri immunosoppressori tra cui il Micofenolato Mofetile (MMF). Questi studi hanno proposto differenti risultati (41,53,63-76). L'MMF è un immunosoppressore specifico nei confronti delle cellule T e B con un ampio profilo di effetti collaterali immunomediati, ma a differenza degli IC non è stata documentata alcuna nefrotossicità. Perciò l'utilizzo del MMF al posto degli IC o in associazione ad essi a dosi ridotte è considerata la strategia di scelta per migliorare la disfunzione renale nei pazienti sottoposti al trapianto. Tuttavia la maggior parte degli studi proposti era disegnato senza la presenza di un gruppo di controllo che ricevesse una terapia con IC a dosaggio standard, quando gli studi erano

randomizzati la sostituzione degli IC si è accompagnata ad un aumentato rischio di rigetto (73-74) o avevano i loro principali limiti nella presenza di un follow-up inadeguato (75) o nell'assenza del braccio del gruppo di controllo (76). Pertanto, in questo studio clinico controllato abbiamo valutato l'impatto della terapia combinata con MMF e con gli IC a basse dosi sulla sicurezza del farmaco, con particolare attenzione all'incidenza del rigetto, e sulla funzionalità renale.

2.2 PAZIENTI E METODI

A partire dal Dicembre 2003, 272 pazienti sottoposti a OLT sono stati seguiti presso due cliniche epatologiche dell'Ospedale S.Orsola-Malpighi, in 94 casi hanno sviluppato una insufficienza renale cronica IC-relata definita come un incremento di creatinina sierica superiore al 10% rispetto al valore basale, in almeno tre rilevazioni consecutive a cadenza mensile. Fra i pazienti con alterata funzione renale, uno dei due centri epatologici ha deciso di trattare i propri pazienti con un regime immunosoppressivo di tipo conservativo (IC a dosaggio standard), mentre l'altro, a partire dal Febbraio 2003, ha deciso di trattare i propri 30 pazienti con combinazione di MMF e IC a dosi ridotte.

L'eleggibilità dei pazienti del gruppo di studio è stata valutata tenendo conto di una serie di criteri di inclusione e di esclusione.

Criteri di inclusione

- Età ≥ 18 anni.
- Trapianto ortotopico di fegato eseguito almeno 12 mesi prima dell'arruolamento.
- Conta totale dei globuli bianchi $> 2000/\text{mm}^3$,
- emoglobina > 10 gr/dl.
- Test di funzionalità epatica stabili ed assenza di rilievo di episodi di rigetto acuto negli ultimi sei mesi

Criteri di esclusione

- Storia di patologie neoplastiche maligne negli ultimi 5 anni prima dell'inizio dello studio ad esclusione del carcinoma epatocellulare, insorto prima dell'OLT, nei criteri di Milano
- Trattamento antivirale in corso per recidiva di infezione da virus C dell'epatite.
- Altre possibili cause di insufficienza renale escluse mediante esami clinici, laboratoristici e strumentali.

Dopo la fase iniziale di screening i pazienti hanno seguito i dosaggi e le modalità di somministrazione della terapia con MMF secondo il seguente schema: il MMF è stato somministrato alla dose di 1 gr due volte al giorno, e dopo tre giorni la dose degli IC è stata progressivamente ridotta al fine di ottenere i livelli sierici di Tac compresi fra 2,5 e 3,5 ng/ml e livelli di CsA compresi fra 40 e 55 ng/ml. Il dosaggio del MMF è stato modificato in caso d'insorgenza di effetti collaterali a livello gastroenterinale (nausea, vomito e diarrea) e/o tossicità a livello midollare, diminuendo il dosaggio a 1,5 gr al giorno, o se opportuno a 1 gr al giorno, incrementando contemporaneamente il dosaggio degli IC per mantenere i livelli di Tac fra 3,5 e 4,5 ng/ml e di CsA fra 55 e 70 ng/ml. Nei casi di sospensione del MMF, i livelli degli IC (CsA e Tac) sono stati ripristinati ai valori precedenti l'introduzione del MMF. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato prima di essere considerati eleggibili per lo studio. Il gruppo dei pazienti in studio è stato confrontato con individui provenienti dal gruppo dei 64 pazienti che continuavano ad assumere gli IC con dosaggi di Tac mantenuti tra 5-10 ng/ml e livelli di CsA compresi fra 100-150 ng/ml; i pazienti del gruppo di controllo selezionati rispettavano i criteri d'inclusione usati per i soggetti del gruppo di studio ed erano confrontabili con i soggetti del gruppo in studio per i seguenti parametri: sesso, età, eziologia della patologia epatica di

base, tempo trascorso dal trapianto, tipo di trattamento immunosoppressivo (Tac o CsA), livelli sierici di IC al basale, presenza di diabete, livelli sierici di creatinina e velocità di filtrato glomerulare (GFR) calcolato con la formula di Cockcroft-Gault (77) (tabella 1).

Tabella 1. *Dati dei pazienti e controlli al basale*

Caratteristiche	Gruppo MMF (n=30)	Gruppo Controllo (n=30)	p
Sesso (M/F)	25/5	25/5	NS
Età (anni)	61±7	60±7	NS
Distanza dall'OLT al primo riscontro di creatinina sierica alterata (mesi)	35±33	47±36	NS
Distanza dall'OLT al basale (mesi)	65±43	64±37	NS
Eziologia della cirrosi			NS
Infezione da virus C dell'epatite	16 (53.3%)	18 (60%)	
Infezione da virus B dell'epatite	8 (26.7%)	3 (10%)	
Infezione da virus Delta dell'epatite	1 (3.3%)	1 (3.3%)	
Coinfezione epatite C, B e Delta	0	1 (3.3%)	
Criptogenetica	1 (3.3%)	2 (6.7%)	
Alcolica	3 (10%)	4 (13.3%)	
Epatite Autoimmune	1 (3.3%)	1 (3.3%)	
Tipo di Immunosoppressore (n/%)			NS
Ciclosporina	20 (66.7%)	21 (70%)	
Tacrolimus	10 (33.3%)	9 (30%)	
Livelli di IC al basale (ng/ml)			NS
Ciclosporina	115±42	140±45	
Tacrolimus	6.4±1.2	7.2±0.8	
Diabete (n/%)			NS
Si	9 (30%)	7 (23.3%)	
No	21 (70%)	23 (76.7%)	
Prima creatinina sierica alterata (mg/dl)	1.51±0.34	1.52±0.16	NS
Creatinina sierica al basale (mg/dl)	1.77±0.51	1.62±0.25	NS
GFR al basale (ml/m')	48.4±14	48.9±11.2	NS
Dislipidemia (Colesterolo>200 mg/dl e/o trigliceridi >170 mg/dl (n/%)	15 (50%)	16 (53%)	NS

I pazienti appartenenti al gruppo MMF sono stati sottoposti ad OLT fra il Novembre 1989 e il Dicembre 2003, per quanto riguarda il gruppo di controllo fra il Novembre 1988 e il Settembre 2003. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un esame obiettivo completo, uno screening dei principali parametri biochimici, emocromo completo, dosaggio dei livelli di CsA e Tac al basale, ogni tre mesi e ogni qualvolta ritenuto clinicamente rilevante; inoltre i pazienti trattati con MMF sono stati sottoposti ad un controllo aggiuntivo ad un mese di distanza dall'arruolamento. Infine, in tutti i pazienti sono stati analizzati i livelli di CsA e Tac dopo gli opportuni aggiustamenti del dosaggio somministrato.

ANALISI STATISTICA

Le variabili continue sono state opportunamente espresse come media \pm deviazione standard (SD), oppure come mediana e range. Il confronto fra i due gruppi di pazienti è stato fatto utilizzando il test χ^2 e il test di Fischer per le variabili categoriche, mentre il t-test per dati indipendenti è stato utilizzato per le variabili continue.

Il test di Friedman è stato utilizzato per il confronto tra misurazioni ripetute e il test di Wilcoxon per dati appaiati per confrontare le misurazioni all'inizio e alla fine del periodo di osservazione.

Al confronto fra i due gruppi, tutte le variabili che all'analisi univariata mostravano una significatività < 0.1 sono state inserite nell'analisi multivariata eseguita mediante regressione logistica multipla.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software SPSS 13.0 (versione per Windows). La significatività statistica è stata definita come $p < 0.05$.

2.3 RISULTATI

Le principali caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei pazienti arruolati sono descritte nella tabella 1. Non sono state rilevate differenze significative fra i due gruppi per quanto riguarda il sesso, l'età, l'eziologia della cirrosi, il tempo trascorso dall'esecuzione del trapianto, la distanza dal trapianto alla prima rilevazione di una creatinina sierica alterata, livelli di creatinina sierica al momento del rilievo della prima elevazione, il tipo di immunosoppressione (CsA o Tac), livelli di IC al basale, presenza di diabete e dislipidemia. La media del periodo di monitoraggio per tutti i pazienti dall'inizio del trattamento con MMF è stata di 11.2 ± 2.8 mesi, mentre nel gruppo di controllo è stata di 12 mesi; questa differenza è legata alla presenza nel gruppo con MMF di 2 casi di sospensione precoce del trattamento dovuta all'insorgenza dopo circa 1 mese di eventi avversi. In un caso il paziente ha manifestato importanti disturbi gastrointestinali e anemia, mentre nell'altro è insorta un'orticaria. Un terzo paziente ha presentato dopo 10 mesi dall'inizio della terapia con MMF una stenosi della via biliare principale con rapido deterioramento dei parametri di funzionalità epatica e conseguente decesso. Gli eventi avversi registrati nei 12 mesi dallo studio sono riportati in tabella 2.

Tabella 2: *Prevalenza degli eventi avversi*

Eventi avversi	Gruppo di studio	Gruppo di controllo	p
	Pz 30 (n/%)	Pz 30 (n/%)	
Disordini gastrointestinali	8 (26.7%)	1 (3.3%)	0.02569
Infezione batteriche	4 (13.3%)	0 (0%)	NS
Anemia	3 (10%)	0 (0%)	NS
Astenia	3 (10%)	2 (6.7%)	NS
Disturbi neurovegetativi	2 (6.7%)	1 (3.3%)	NS
Rigetti	0 (0%)	2 (6.7%)	NS
Altri	2 (7%)	6 (20%)	NS

Diciassette pazienti (57%) inseriti nel gruppo di trattamento con MMF hanno manifestato uno o più eventi avversi. I più frequenti sono risultati i disturbi gastrointestinali rappresentati da (diarrea, dolore addominale, nausea, vomito), reversibili nella gran parte dei pazienti senza necessità di riduzione della dose o sospensione del farmaco. In 4 pazienti l'intensità degli effetti collaterali ha richiesto la riduzione della dose del MMF, in 2 pazienti per importanti disturbi gastrointestinali, in un altro per ansia ed insonnia e nell'ultimo per una severa forma di anemia, caratterizzata da un rapido calo del livello di emoglobina > 2 gr/dl. In tutti i casi descritti la riduzione della dose del MMF ha permesso di poter continuare il trattamento. Di contro nel gruppo di controllo 9 pazienti (30%) hanno presentato eventi avversi, in 2 casi ipertensione arteriosa, in 2 pazienti stenosi delle vie biliari trattate con successo per via endoscopica, in 2 casi sono stati rilevati episodi di rigetto acuto di grado lieve, controllati incrementando i livelli di Tac in un paziente e mediante boli di corticosteroidi nell'altro. Nei pazienti con alterazione dei livelli sierici di colesterolo e/o trigliceridi al basale, la diminuzione della dose degli IC ha determinato miglioramento della dislipidemia in 6 casi su 16

(37.5%), mentre nel gruppo di controllo tutti e 15 i pazienti con alterati livelli del profilo lipidico hanno presentato le stesse alterazioni ad 1 anno di distanza ($p=0.029$). Si segnala inoltre che, nel gruppo con il MMF nessuno dei 14 pazienti con normale profilo lipidico al basale ha mostrato la comparsa de novo di dislipidemia, mentre nel gruppo controllo ciò è avvenuto in 2 casi su 15 (13%). Il trattamento immunosoppressivo al momento dell'arruolamento era costituito da una monoterapia con ciclosporina (CsA) in 41 pazienti (20 nel gruppo di trattamento con MMF e 21 nel gruppo di controllo) o con Tac in monoterapia in 19 pazienti (10 nel gruppo con MMF e 9 nel gruppo di controllo). I livelli medi sia della CsA che del Tac risultavano simili fra i due gruppi al momento dell'arruolamento, mentre alla fine del periodo di osservazione presentavano una significativa riduzione nel gruppo con MMF rispetto al gruppo di controllo (CsA 52 ± 14 vs 103 ± 29 ng/ml, $p=0.0000$; Tac 4.1 ± 0.8 vs 7.1 ± 2.7 ng/ml, $p=0.0066$). La riduzione del livello delle concentrazioni sieriche degli IC si è accompagnata ad un significativo miglioramento della funzionalità renale a 12 mesi con una diminuzione dei livelli di creatinina sierica da 1.77 ± 0.51 a 1.49 ± 0.51 mg/dl, ($p=0.0000$), e con un incremento del GFR dal 48.4 ± 14 a 60.2 ± 17.9 ml/m' ($p=0.0000$) Figura 1 e 2. Nei 27 pazienti trattati con MMF che hanno completato l'anno di follow-up, in 5 casi (19%) si è ottenuto una normalizzazione dei livelli di creatinina sierica; inoltre il miglioramento di almeno il 10% dei livelli sierici di creatinina (Δ creatinina) e del GFR (Δ GFR), identificato sulla scorta di studi precedenti come significativo miglioramento della funzione renale (65,72,73,74), è stato osservato in 19 casi su 27 (70%), mentre nel gruppo di controllo era presente solo in 5/30 (17%) casi per quanto riguarda la creatinina, ed in 6/30 casi (20%) per quanto riguarda il GFR ($p=0.00004$ e $p=0.00013$ rispettivamente). E' interessante notare che, considerando l'ultima visita eseguita dopo una media di 35 ± 17 mesi

dal basale per il gruppo MMF e di 44 ± 19 mesi per il gruppo di controllo ($p=NS$), il miglioramento dei livelli sierici di creatinina (da 1.77 ± 0.51 a 1.62 ± 0.8 , $p=0.0014$) e di GFR (da 48.4 ± 14 a 53.5 ± 16.4 , $p=0.0053$) è stato mantenuto nei pazienti trattati con MMF (figura 1 e figura 2), mentre il gruppo di controllo non ha mostrato alcuna differenza rispetto al basale (creatinina da 1.62 ± 0.25 a 1.82 ± 0.7 e GFR da 48.9 ± 11.2 a 46.5 ± 14.5) (figura 1 e figura 2).

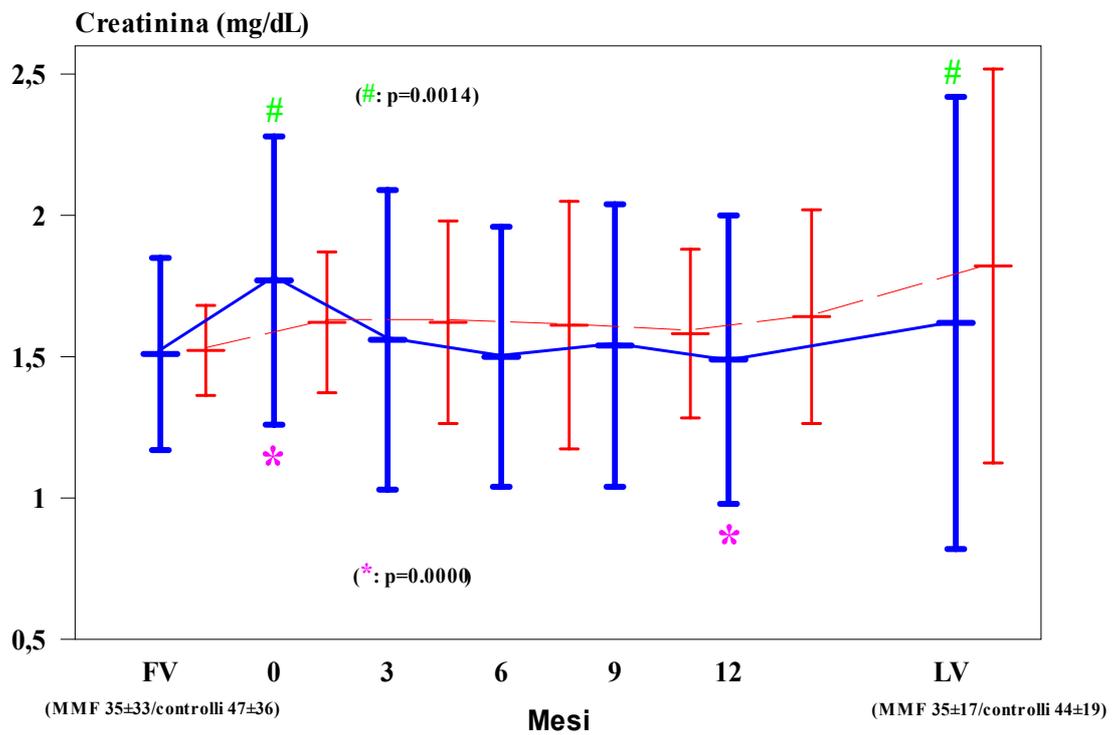


Figura1.

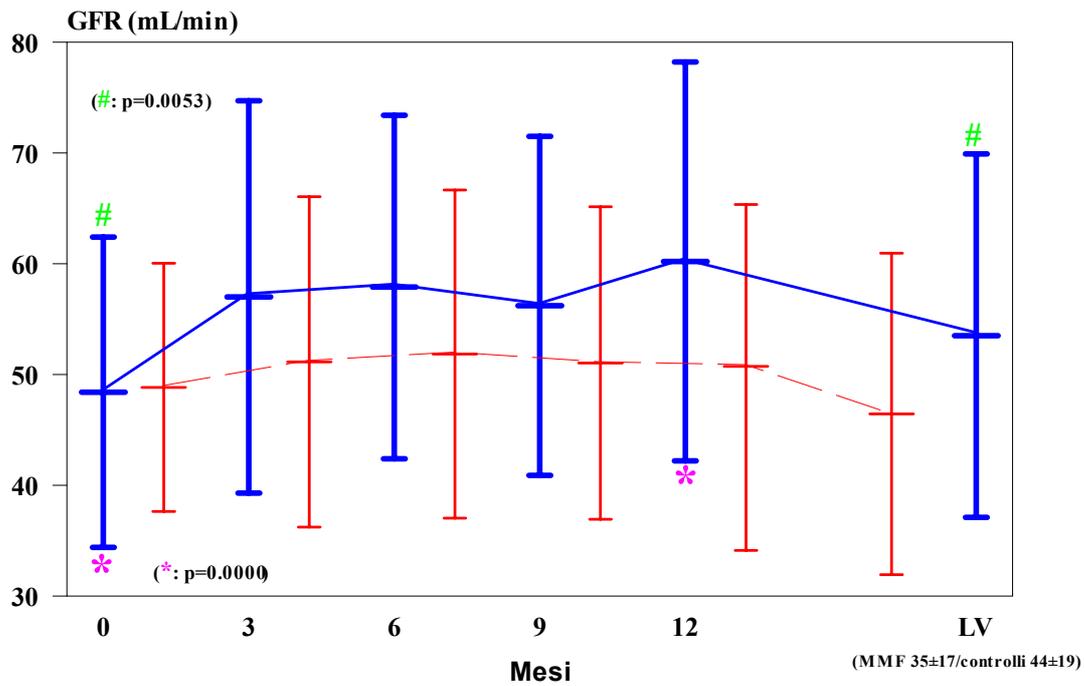


Figura2.

Analizzando poi i pazienti che presentavano al tempo 0 un'alterazione della funzione renale di grado lieve, definita come presenza di livelli di creatinina sierica al di sotto e di GFR al di sopra della media calcolata al tempo basale nei due gruppi di pazienti in esame, non abbiamo osservato nessuna differenza nella percentuale dei soggetti che presentavano il Δ creatinina e/o il Δ GFR al termine dello studio (Tabella 3).

Tabella 3: *Pazienti con livelli di creatinina sierica al di sotto e di GFR al di sopra della media calcolata al basale, e miglioramento di almeno il 10% della funzione renale rispetto al basale*

	Δ creatinina sierica e/o Δ GFR (n/%)		p	
	Si	No		
Creatinina al basale \leq media (MMF 1.77 mg/dl- controllo 1.62 mg/dl):	37/60 (62%)	15/37 (41%)	22/37 (59%)	NS
GFR al basale \geq media (MMF 48.35 ml/m ² -controllo 48.94 ml/m ²):	31/60 (52%)	12/31 (39%)	19/31 (61%)	NS

L'analisi statistica univariata, eseguita utilizzando il Δ creatinina e il Δ GFR come variabile dipendente, ha preso in considerazione le seguenti variabili categoriche:

- sesso
- tipo di immunosoppressione (CsA o Tac)
- terapia con MMF
- eziologia della cirrosi
- presenza di diabete mellito
- presenza di uno degli eventi avversi

e le seguenti variabili continue:

- età (anni)
- peso (kg)
- Csa (ng/ml)
- Tac (ng/ml)
- creatinina (mg/dl)
- GFR (ml/m²)
- tempo dall'OLT (mesi)
- creatinina alla prima elevazione (mg/dl)

- tempo dall'OLT alla prima elevazione della creatinina
(mesi)

Dall'analisi univariata sono emerse come variabili significativamente correlate con il miglioramento della funzione renale l'esecuzione della terapia di combinazione MMF ed IC a basso dosaggio, il tempo trascorso dall'OLT prima dell'inizio dello studio ed il tempo trascorso dall'OLT fino al primo rilievo di elevazione della creatinina sierica (tabella 4).

Tabella 4. *Variabili significative nell'analisi univariata*

Variabili	Δcreatinina sierica		p	ΔGFR		P
	Si (n=24)	No (n=36)		Si (n=25)	No (n=35)	
Terapia con MMF (n/%)			0.00023			0.00066
Si	19 (79%)	11 (31%)		19 (76%)	11 (31%)	
No	5 (21%)	25 (69%)		6 (24%)	24 (69%)	
Distanza dall'OLT (mesi)			0.031			0.04
(media ±DS)	52±32	73±43		53±32	73±43	
Distanza dall'OLT alla prima creatinina sierica alterata (mesi)			0.036			0.069
(media ±DS)	30±29	48±37		32±30	48±37	

Note: *Le variabili sono considerate significative se la $p < 0.1$*

Il modello di regressione logistica in cui sono state inserite le tre suddette variabili, e che prevedeva come variabile dipendente il Δcreatinina o il ΔGFR, ha mostrato che l'utilizzo del MMF ($p=0.0001$ e $p=0.0003$ rispettivamente) e il tempo dall'OLT ($p=0.0162$ e $p=0.0244$, rispettivamente) sono gli unici parametri statisticamente significativi (tabella 5).

Tabella 5. *Analisi multivariata (regressione logistica)*

Variabili	Δ creatinina sierica	p	Δ GFR	p
	Exp (B)/IC (95%)		Exp (B)-IC (95%)	
Terapia con MMF	10.775/2.9-40.035	0.0001	8.232/2.377-28.514	0.0003
Distanza dall'OLT	1.02/1.002-1.037	0.0162	1.018/1.001-1.034	0.0244

Note: IC (*Intervallo di confidenza*)

Infine, la stessa analisi eseguita separatamente in entrambi i gruppi di pazienti (MMF e controlli), non ha dimostrato nel gruppo di controllo nessuna significatività, mentre nel gruppo dei pazienti trattati con MMF la distanza dall'OLT ha rappresentato una variabile significativa per entrambi le variabili dipendenti utilizzate ($p=0.0199$). E' interessante notare, infine, come i pazienti trattati con MMF che presentavano Δ creatinina e Δ GFR hanno mostrato una distanza dall'OLT di 49 ± 32 mesi, di gran lunga più corta, rispetto i 93 ± 48 mesi rilevata nel sottogruppo di pazienti che non hanno sperimentato un miglioramento della funzionalità renale ($p=0.016$).

2.4 DISCUSSIONE

Attualmente, la terapia con IC rappresenta il cardine della terapia immunosoppressiva nei pazienti sottoposti ad OLT. Con l'utilizzo di questi farmaci, l'insufficienza renale cronica è risultata essere il maggior problema clinico, ed è stato stimato che circa l'80% dei pazienti sviluppa una disfunzione renale da lieve a moderata a 5 anni dal trapianto e fino al 5% sviluppa una insufficienza renale cronica in forma terminale (78,79). Studi precedenti sostengono l'utilizzo dell'MMF nel trattamento dei pazienti con insufficienza renale cronica IC relata (41,65,67,68,72) e quasi tutti tranne alcuni mostrano un miglioramento (66,69). Allo stesso

tempo, non è stato pubblicato nessuno studio con un gruppo di controllo caratterizzato da un adeguato periodo di follow-up che consideri l'impatto della terapia di combinazione MMF e IC a dosi ridotte sulla funzione renale nei pazienti sottoposti ad OLT, a parte un solo studio in cui però non è presente un braccio di controllo non trattato ed il numero di pazienti arruolati risulta ridotto (76). Nel nostro studio è stato utilizzato un gruppo di controllo formato da pazienti seguiti contemporaneamente ed in maniera parallela, presso un'altra clinica epatologica di questo ospedale, ed in cui non è stato impiegato l'MMF. La scelta della terapia di combinazione con basse dosi di IC e MMF al posto del MMF in monoterapia con la sospensione completa degli IC si è basata sul fatto che non tutti i pazienti traggono beneficio da quest'ultimo approccio terapeutico, vista l'elevata incidenza di sviluppo di rigetti acuti (20-30% dei casi) (73,76) o di severo rigetto duttopenico (74). Nel nostro studio al fine di evitare episodi di rigetto acuto, ci siamo posti l'obiettivo di ridurre progressivamente la dose degli IC raggiungendo il livello di concentrazione ematica desiderata, piuttosto che ridurre il dosaggio degli IC con la somministrazione di dosi fisse. In altre esperienze, infatti, il trattamento degli IC a dosaggio fisso ha avuto un prezzo da pagare in termini di insorgenza di episodi di rigetto acuto, con una incidenza variabile fra l'11% e il 29% (67,76), al contrario, nel nostro studio nessuno dei pazienti del gruppo di studio trattato ha manifestato un episodio di rigetto acuto. E' da sottolineare che, quando tale approccio non ha dato buoni risultati in termini di bassa incidenza di rigetti acuti, ciò era attribuibile alla presenza di soggetti con storia recente di rigetto (68). Per tale motivo, noi non abbiamo incluso nello studio pazienti che avevano avuto un episodio di rigetto acuto negli ultimi sei mesi, e l'ottimale risultato ottenuto è probabilmente dovuto a questo tipo di approccio combinato.

Anche se il nostro studio non è stato disegnato per identificare gli effetti della riduzione degli IC su altri eventi avversi correlati all'uso di questi farmaci, a causa del breve periodo di follow-up, abbiamo visto che nel gruppo di pazienti trattati con MMF e dislipidemia al basale, dopo un anno di osservazione, era presente una riduzione della prevalenza della stessa, mentre nel gruppo di controllo in nessun paziente tale evento avverso era stato risolto. Questo lavoro dimostra che la funzione renale, è significativamente migliorata al termine del periodo di monitoraggio come dimostrato dai valori sierici di creatinina e del GFR calcolato secondari alla riduzione delle dosi degli IC e l'associazione del MMF. Anche se nella gran parte dei casi non si è ottenuto, nel gruppo di studio, una normalizzazione dei valori di creatinina sierica al termine del periodo di osservazione, abbiamo comunque osservato che nella maggior parte dei casi era rilevabile un miglioramento della funzionalità renale di almeno il 10% rispetto ai valori presenti al tempo basale, mentre tale miglioramento era presente solo nel 17% dei pazienti del gruppo di controllo. Tale osservazione suggerisce che la nefrotossicità cronica da IC è solo parzialmente dovuta ad un danno organico renale, mentre esiste una quota funzionale di danno renale potenzialmente reversibile, tutt'altro che trascurabile. Inoltre l'MMF sembrerebbe avere un benefico effetto diretto sulla funzione renale (80). Questo suggerimento è stato suffragato dall'osservazione del fatto che il mantenimento della migliorata funzione renale è presente dopo una media di tre anni dall'inizio dello studio, mentre, nel gruppo di controllo si osserva un lento, ma progressivo, deterioramento della funzione renale. Per mezzo di un'analisi univariata seguita da un modello di regressione logistica, abbiamo cercato di identificare i fattori determinanti nel miglioramento della disfunzione renale nell'intero gruppo di pazienti studiati. Se da un lato non sorprende che, il trattamento di combinazione MMF e basse dosi

di IC tenda a migliorare la funzione renale, dall'altro un altro elemento è emerso come variabile indipendente correlata al miglioramento della funzione renale, rappresentato dal tempo intercorso dall'OLT all'inizio dello studio. E' da sottolineare che il miglioramento della funzione renale non sembra correlare con la severità dell'alterazione renale al basale, ma con la lunghezza della malattia. Malgrado gli effetti benefici, vi è l'evidenza di eventi potenzialmente avversi dovuti al MMF. Infatti, è noto che il MMF può provocare effetti collaterali dose dipendenti a livello gastrointestinale e del midollo osseo. Effettivamente, circa un terzo dei nostri pazienti ha presentato disturbi gastrointestinali (nausea, dolori addominali e diarrea) e anemia. Tuttavia, la maggior parte di tutti gli eventi avversi sono stati reversibili e soltanto in 2 casi è stato necessario sospendere la somministrazione del MMF, in un caso per problemi gastrointestinali ed anemia, nell'altro per comparsa di orticaria, entrambi i casi comunque si sono risolti prontamente alla sospensione della terapia con MMF.

Concludendo, l'introduzione del MMF e la diminuzione graduale degli IC nella terapia a lungo termine dei pazienti sottoposti ad OLT con alterata funzionalità renale secondaria all'utilizzo degli IC, sembra, nella nostra esperienza, migliorare significativamente la funzione renale, in particolar modo se il trattamento viene iniziato appena possibile dopo l'insorgenza della disfunzione renale. Inoltre, lo schema di trattamento utilizzato associato alla precauzione di non includere pazienti con un episodio di rigetto acuto negli ultimi sei mesi, ha assicurato l'assenza di episodi di rigetto acuto e solo in pochi pazienti si è resa necessaria l'interruzione del trattamento. Tuttavia, i nostri dati necessitano di studi ampi con un più lungo periodo di osservazione allo scopo di identificare gli eventuali effetti benefici della riduzione degli IC sull'ipertensione,

diabete e dislipidemia, e verificare la stabilità a lungo termine del miglioramento della disfunzione renale.

BIBLIOGRAFIA

1. Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM, et Al. Quadruple tacrolimus-based induction therapy including azathioprine and ALG does not significantly improve outcome after liver transplantation compared with a standard induction with tacrolimus and steroids: Results of prospective randomized trial. *Transplantation* 2000; 69: 2343.
2. Arrojo V, Bosch J, Broguera M, et Al. Treatment of liver diseases. Masson S.A,1999, Barcellona: 153.
3. Conti F, Morelon E, Calmusi Y. Immunosuppressive therapy in liver transplantation. *J Hepatol.* 2003; 39: 664.
4. U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 1110.
5. European FK506 Multicenter Liver Study Group. Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. *Lancet* 1994; 344: 423.
6. O'Grady JG, Burroughs A, Hardy P, et Al; UK and Republic of Ireland Liver Transplant Study Group. Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet.* 2002; 360: 1119.
7. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25: 658.
8. Adams DH, Neuberger JM. Patterns of graft rejection following liver transplantation. *J Hepatol* 1990; 10: 113.
9. Adams DH, Neuberger JM. Treatment of acute rejection. *Semin Liver Dis* 1992; 12: 80.

10. Encke J, Uhl W, Stremmel W, et Al. Immunosuppression and modulation in liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19 S4:22.
11. Levy GA. Long-term immunosuppression and drug interactions. *Liver Transplant* 2001; 7: S53.
12. Greig P, Lilly L, Scudamore C, et Al. Early steroid withdrawal after liver transplantation: the Canadian tacrolimus versus microemulsion cyclosporin A trial: 1 year follow-up. *Liver Transplant* 2003; 9: 587.
13. Everson GT. Impact of immunosuppressive therapy on recurrence of hepatitis C. *Liver Transplant* 2002; 8: S19.
14. Kahan BD, Cyclosporine. *N Eng J Med* 1989; 321: 1725.
15. 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: 1036.
16. Majewski M, Korecka M, Joergensen J, et Al. Immunosuppressive TOR kinase inhibitor everolimus (RAD) suppresses growth of cells derived from posttransplant lymphoproliferative disorder at allograft-protecting doses. *Transplantation* 2003;75:1710.
17. Kahan BD, Camardo JS. Rapamycin: Clinical results and future opportunities. *Transplantation* 2001;72:1181.
18. Wiesner R, Rabkin J, Klintmalm G, et Al. A randomized double-blind comparative study of mycophenolate mofetil and azathioprine in combination with cyclosporine and corticosteroids in primary liver transplant recipients. *Liver Transplant* 2001;7:442.
19. Post DJ, Douglas DD and Mulligan DC. Immunosuppression in Liver Transplantation. *Liver Transplantation* 2005; 11: 1307.

20. Klein A. Tacrolimus rescue in liver transplant patients with refractory rejection or intolerance or malabsorption of cyclosporine. The US Multicenter FK506 Liver Study Group. *Liver Transpl Surg* 1999;5: 502.
21. Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev* 1993; 136: 5.
22. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000; 47: 85.
23. Fraser-Smith EB, Rosete JD, Schatzman RC. Suppression by mycophenolate mofetil of the neointimal thickening caused by vascular injury in a rat arterial stenosis model. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 1204.
24. Gregory C, Huang X, Pratt R, et Al. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995; 59: 655.
25. van Gelder T, Klupp J, Kavanau K, et Al. Novel mechanisms of action of mycophenolic acid (MPA): Inhibition of expression of CD28 and CD154 costimulatory molecules and induction of apoptosis in vivo in humans after treatment with mycophenolate mofetil (MMF). *Transplantation* 2000; 69: S393.
26. Morris RE, Hoyt EG, Eugui EM, et Al. Prolongation of rat heart allograft survival by RS-61443. *Surg Forum* 1989; 40: 337.
27. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebocontrolled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995; 345: 1321.

28. Kobashigawa J, Miller L, Renlund D, et Al. A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients. Mycophenolate Mofetil Investigators. *Transplantation* 1998; 66: 507.
29. Odorico J, Pirsch J, Knechtle S, et Al. A study comparing mycophenolate mofetil to azathioprine in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1751.
30. Klupp J, van Gelder, T, Dambrin C, et Al. Sustained suppression of peripheral blood immune functions by treatment with mycophenolate mofetil correlates with reduced severity of cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:334.
31. Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, et Al. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 315.
32. Bullingham R, Shah J, Goldblum R, et Al. Effects of food and antacid on the pharmacokinetics of single doses of mycophenolate mofetil in rheumatoid arthritis patients. *Brit J Clin Pharmacol* 1996; 41: 513.
33. Klupp J, van Gelder, T, Dambrin C, et Al. Sustained suppression of peripheral blood immune functions by treatment with mycophenolate mofetil correlates with reduced severity of cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:334.
34. Klupp J, van Gelder, T, Dambrin C, et Al. Mycophenolate mofetil pharmacodynamics and pharmacokinetics correlate with rejection score in a BN-to-LEW heterotopic heart transplant model. *Transplant Proc* 2001; 33: 2170.
35. Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34: 429.

36. Klupp J, Pfitzmann R, Langreher JM, et Al. Indication of Mycophenolate Mofetil in Liver Transplantation. *Transplantation* 2005; 80: S142.
37. Klupp J, Bechstein WO, Platz KP, et Al. Mycophenolate mofetil added to immunosuppression after liver transplantation—first results. *Transpl Int* 1997; 10: 223.
38. Jain AB, Hamad I, Rakela J, et Al. A prospective randomized trial of tacrolimus and prednisone versus tacrolimus, prednisone, and mycophenolate mofetil in primary adult liver transplant recipients: an interim report. *Transplantation* 1998; 66: 1395.
39. Jain AB, Kashyap R, Kramer D, et Al. Prospective randomized trial of tacrolimus and prednisone versus tacrolimus, prednisone, and mycophenolate mofetil: complete report on 350 primary adult liver transplantations *Transplant Proc* 2001; 33: 1342.
40. McDiarmid SV. Mycophenolate mofetil in liver transplantation. *Clin Transplant* 1996; 10: 140.
41. Pfitzmann R, Klupp J, Langrehr JM, et Al. Mycophenolate mofetil for immunosuppression after liver transplantation: a follow-up study of 191 patients. *Transplantation* 2003; 76: 130.
42. Tur-Kaspa R, Laub O. Corticosteroids stimulate hepatitis B virus DNA, mRNA and protein production in a stable expression system. *J Hepatol* 1990; 11: 34.
43. McCaughan G, Doughty A, Zekry A, et Al. Immunopathogenesis of hepatitis B and hepatitis C infection in the nonimmunosuppressed and immunosuppressed state. *Graft* 1999; 2: 201.
44. Contreras JL, Eckhoff DE. Management of viral hepatitis after liver transplantation. *Graft* 1999; 2: 124.

45. Ringe B, Braun F, Schutz E, et Al. A novel management strategy of steroid-free immunosuppression after liver transplantation: efficacy and safety of tacrolimus and mycophenolate mofetil. *Transplantation* 2001; 71: 508.
46. Gong ZJ, De Meyer S, Clarysse C, et Al. Mycophenolic acid, an immunosuppressive agent, inhibits HBV replication in vitro. *J Viral Hepat* 1999; 6: 229.
47. Neyts J, Andrei G, De Clercq E. The novel immunosuppressive agent mycophenolate mofetil markedly potentiates the antiherpesvirus activities of acyclovir, ganciclovir, and penciclovir in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42 :216.
48. Hossain MM, Coull JJ, Drusano GL, et Al. Dose proportional inhibition of HIV-1 replication by mycophenolic acid and synergistic inhibition in combination with abacavir, didanosine, and tenofovir. *Antiviral Res.* 2002; 55: 41.
49. Ben-Ari Z, Zemel R, Tur-Kaspa R. The addition of mycophenolate mofetil for suppressing hepatitis B virus replication in liver recipients who developed lamivudine resistance--no beneficial effect. *Transplantation.* 2001;71:154-6.
50. Bahra M, Neumann UP, Harren M, et Al. Significance of mycophenolate mofetil treatment in patients with HCV reinfection after liver transplantation: impact on clinical course and histologic damage. *Transplant Proc.* 2002; 34: 2934.
51. Jain A, Kashyap R, Demetris AJ, et Al. A prospective randomized trial of mycophenolate mofetil in liver transplant recipients with hepatitis C. *Liver Transpl.* 2002; 8: 40.
52. Tredger JM, Brown NW, Adams J, et Al. Monitoring mycophenolate in liver transplant recipients: toward a therapeutic range. *Liver Transpl* 2004; 10: 492.

53. Koch RO, Graziadei IW, Schulz F, et Al. Long-term efficacy and safety of mycophenolate mofetil in liver transplant recipients with calcineurin inhibitor-induced renal dysfunction. *Transpl Int* 2004; 17: 518.
54. Pescovitz MD, Conti M, Gonwa T, et Al. Intravenous mycophenolate mofetil: safety, tolerability, and pharmacokinetics. *Clin Transpl* 2000; 14: 179.
55. Simmons WD, Rayhill SC, Sollinger HW. Preliminary risk-benefit assessment of mycophenolate mofetil in transplant rejection. *Drug Safety* 1997; 17: 75.
56. Heemann U. Malignominzidenz unter der Therapie mit MMF. 6. Basler Transplantationsgespräch, vol.19 (2004). Basel, Schweiz, 31.10-1.11.2003: *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 128. Jahrgang, 2003.
57. Cherikh WS, KauffmanHM, McBride MA, et Al. Association of the type of induction immunosuppression with posttransplant lymphoproliferative disorder, graft survival, and patient survival after primary kidney transplantation. *Transplantation* 2003;76:1289.
58. Quiroz Y, Herrera-Acosta J, Johnson RJ, et Al. Mycophenolate Mofetil in conditions different from organ transplantation. *Transplantation Proceedings* 2002; 34. 2523.
59. Moreno JM, Cuervas-Mons V, Rubio E, Pons F, Herreros de TA, Turrion VS, Millan I. Chronic renal dysfunction after liver transplantation in adult patients: prevalence, risk factors and impact on mortality. *Transplant proc* 2003;35:1907-1908.
60. Pawarode A, Fine DM, Thuluvath PJ. Independent risk factors and natural history of renal dysfunction in liver transplant recipients. *Liver transpl* 2000;9:741-747.

61. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, Hays SR, Goldstein RM, Levy MF, et al. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation* 2001;72:1934-1939.
62. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N.Engl J Med* 2003;349:931-940.
63. Sandborn WJ, Hay JE, Porayko MK, Gores GJ, Steers JL, Krom RA, et al. Cyclosporine withdrawal for nephrotoxicity in liver transplant recipients does not result in sustained improvement in kidney function and causes cellular and ductopenic rejection. *Hepatology* 1994;19:925-932.
64. Chan CY, DasGupta K, Baker AL. Cyclosporin A: drug discontinuation for the management of long-term toxicity after liver transplantation. *Hepatology* 1996;24:1085-1089.
65. Barkmann A, Nashan B, Schmidt HHJ, et Al. Improvement of acute and chronic renal dysfunction in liver transplant patients after substitution of calcineurin inhibitors by Mycophenolate mofetil. *Transplantation* 2000; 69: 1886.
66. Neau-Cransac M, Morel D, Bernard PH, et Al. Renal failure after liver transplantation: outcome after calcineurin inhibitor withdrawal. *Clin Transplant.* 2002; 16: 368-373.
67. Cantarovich M, Tzimas GN, Barkun J, et Al. Efficacy of Mycophenolate mofetil combined with very low-dose Cyclosporine microemulsion in long-term liver transplant patients with renal dysfunction. *Transplantation* 2003;76: 98-102.

68. Raimondo ML, Dagher L, Papatheodoridis GV, et Al. Long term Mycophenolate mofetil monotherapy in combination with calcineurin inhibitors for chronic renal dysfunction after liver transplantation. *Transplantation* 2003;75:186-190.
69. Gonwa TA. Treatment of renal dysfunction after orthotopic liver transplantation: options and outcomes. *Liver transpl* 2003;9:778.
70. Moreno Planas JM, Cuervas-Mons Martinez V, Gonzales ER, et Al. Mycophenolate Mofetil can be used as monotherapy late after liver transplantation. *Am J Transplant*. 2004; 4: 1650-1655.
71. Jain A, Vekatramanan R, Eghtesad B, et Al. Long-term outcome of adding mycophenolate mofetil to tacrolimus for nephrotoxicity following liver transplantation. *Transplantation*. 2005; 80: 859-864
72. Hong MKh, Angus PW, Jones RM, et Al. Predictors of improvement in renal function after calcineurin inhibitor withdrawal for post-liver transplant renal dysfunction. *Clin Transplant* 2005; 19: 193-198.
73. Schlitt HJ, Barkmann A, Boker KHW, et Al. Replacement of Calcineurin inhibitors with Mycophenolate mofetil in liver transplant patients with renal dysfunction: a randomized controlled study. *Lancet* 2001; 357:587-591.
74. Stewart SF, Hudson M, Talbot D, Manas D, Day CP. Mycophenolate mofetil monotherapy in liver transplantation. *Lancet* 2001;357:609-610.
75. Beckebaum S, Cicinnati VR, Klein et Al. Impact of combination Mycophenolate Mofetil and low-dose calcineurin inhibitor therapy on renal function, cardiovascular risk factors, and graft function in liver transplant patients: preliminary results of an open prospective study. *Transplant Proc* 2004; 36: 2671.

76. Reich DJ, Clavien PA, Hodge EE; MMF Renal Dysfunction after Liver Transplantation Working Group. Mycophenolate mofetil for renal dysfunction in liver transplant recipients on cyclosporine or tacrolimus: randomized, prospective, multicenter pilot study result. *Transplantation* 2005;80:18-25.
77. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*;1976; 16: 31.
78. Fisher NC, Nightingale PG, Gunson BK, Lipkin GW, Neuberger JM. Chronic renal failure following liver transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation* 1998;66:59-66
79. Cohen AJ, Stegall MD, Rosen CB, Wiesner RH, Leung N, Kremers WK, et al. Chronic renal dysfunction late after liver transplantation. *Liver Transpl.*2002;8:916-921.
- 80 Romero F, Rodriguez-Iturbe B, Parra G, et Al. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int* 1999;55:945-55.