

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE CHIRURGICHE

Ciclo XXXI

**Settore Concorsuale: 06/B1**

**Settore Scientifico Disciplinare: MED/09**

**5-metil-tetraidrofolato nel trattamento dell'ipertensione portale in pazienti con cirrosi e in profilassi farmacologica con beta-bloccanti per il rischio di sanguinamento da varici esofagee: trial randomizzato in doppio cieco controllato con placebo**

**Presentata da: Dott. Roberto Di Donato**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof.ssa Annalisa Patrizi**

**Supervisore**

**Prof. Pietro Andreone**

**Co-Supervisore**

**Dr.ssa Ranka Vukotic**

**Esame finale anno 2019**

## **ABSTRACT**

**Introduzione:** La cirrosi viene frequentemente complicata dall'incremento della pressione portale ( e dal conseguente sviluppo di varici esofago-gastriche, ascite e sanguinamento da varici. L'azione dei  $\beta$ -bloccanti nel ridurre il valore dell'HVPG, è mediato da un diminuito afflusso portale, secondario alla riduzione dell'indice e alla vasocostrizione splancnica. Purtroppo, le resistenze vascolari intraepatiche sono scarsamente influenzate dall'azione dei beta-bloccanti. Il 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) può migliorare la funzione vascolare attraverso la sua azione sulla eNOS e sullo stress ossidativo vascolare. Attualmente non è noto se il 5-MTHF possa avere lo stesso effetto sulla microcircolazione epatica.

**Obiettivi:** Valutare l'efficacia del trattamento per 3 mesi con 5-MTHF in associazione con propranololo rispetto a propranololo + placebo, in termini di riduzione dell'HVPG nei pazienti cirrotici con IP. Obiettivi secondari sono: a) Valutare la tollerabilità del 5-MTHF nei pazienti cirrotici con IP; b) Valutare se vi sia un miglioramento del tono vascolare intraepatico mediato dalla diminuzione dello stress ossidativo e dalla maggiore biodisponibilità di NO nei pazienti con cirrosi e IP, trattati per 3 mesi con propranololo + 5-MTHF rispetto a quelli trattati con propranololo + placebo.

**Risultati:** In entrambi i gruppi si evidenzia una riduzione del valore dell'HVPG rispetto al valore basale, ma la modificazione risultava significativamente maggiore nel gruppo trattato con 5-MTHF rispetto al gruppo placebo (20.8%, SD 15.4 nel gruppo 5-MTHF vs 9.2%, SD 21.3 nel gruppo placebo;  $p=0.033$ ). Analoga riduzione si evidenzia per il valore dell'elastometria misurata con FibroScan® (21.8%, SD 34.7 nel gruppo 5-MTHF vs 4.4%, SD 32.5 nel gruppo placebo,  $p=0.064$ ).

**Discussione:** l'analisi di confronto tra il gruppo di trattamento e il gruppo placebo mostra una differenza statisticamente significativa in termini di entità di riduzione del gradiente pressorio porto-epatico. Ulteriori studi multicentrici, su coorti più ampie sono auspicabili per validare l'utilizzo del 5-MTHF+placebo nel ridurre il valore di pressione portale misurato con HVPG

## INDICE DEI CONTENUTI

1. Introduzione .....	5
2. Obiettivi dello studio .....	6
3. Piano dello studio.....	6
3.1 Disegno dello studio .....	6
3.2 Popolazione dello studio .....	7
3.3 Trattamenti .....	8
3.4 Visite e valutazioni.....	11
3.5 Valutazioni di efficacia.....	12
3.6 Valutazioni di sicurezza .....	12
4. Gestione dei dati ed analisi statistica .....	12
4.1 Gestione dei dati .....	12
4.2 Metodi statistici.....	13
□ Dimensione del campione .....	14
5. Procedure amministrative .....	14
6. Risultati.....	15
7. Discussione.....	21
8. Bibliografia .....	25

## LISTA DI ABBREVIAZIONI

CRF	Case Report Form-Scheda Raccolta Dati
GCP	Good Clinical Practice-Norme di Buona Pratica Clinica
IP	Ipertensione portale
NO	Ossido nitrico
5-MTHF	5-metil-tetra-idro-folato
HVPG	Hepatic venous pressure gradient-Gradiente pressorio venosoepatico
PP	Pressione portale
BH4	Tertraidrobiopterina
tHcy	Omocisteina
ADMA	Dimetilarginina asimmetrica
eNOS	Ossido nitrico sintasi endoteliale
HBF	Hepatic blood flow-Flusso sanguigno epatico
ICG	Indocyanine green-Verde di indocianina
EGDs	Esofagogastroduodenoscopia

## 1. Introduzione

La cirrosi viene frequentemente complicata dall'incremento della pressione portale (PP) e dal conseguente sviluppo di varici esofago-gastriche, ascite e sanguinamento da varici (1). La PP dipende dall'interazione tra il flusso all'interno del sistema vascolare portale e la resistenza a esso opposta. L'aumento delle resistenze vascolari intraepatiche rappresenta una componente importante dell'ipertensione portale (IP) ed è principalmente determinata dalle tipiche alterazioni strutturali del parenchima epatico cirrotico. Il valore della PP viene ottenuto misurando l'HVPG, ovvero la differenza tra la pressione all'interno della vena sovraepatica occlusa e la pressione libera (2). Il valore soglia dell'HVPG di 10 mmHg correla con un rischio maggiore di comparsa di complicanze dell'IP (3, 4) mentre un valore  $\geq 12$  mmHg correla con il rischio di rottura delle varici esofagee (5, 6). Attualmente, i  $\beta$ -bloccanti non cardioselettivi o la legatura endoscopica sono le opzioni più praticate per la profilassi primaria del sanguinamento da varici esofagee (7). Lo strumento più affidabile per valutare la risposta al trattamento farmacologico, in termini di riduzione dell'IP, è la misurazione dell'HVPG prima e dopo 1-3 mesi dal raggiungimento di un ottimale  $\beta$ -blocco. Una riduzione dell'HVPG di oltre il 20% rispetto al valore basale o un valore  $< 12$  mmHg, indica la risposta emodinamica ai  $\beta$ -bloccanti e dunque, determina un rischio ridotto di sanguinamento e soprattutto, comporta un miglioramento della sopravvivenza (8). L'azione dei  $\beta$ -bloccanti nel ridurre il valore dell'HVPG, è mediato da un diminuito afflusso portale, secondario sia alla riduzione dell'indice cardiaco (blocco dei recettori adrenergici  $\beta_1$ ) che alla vasocostrizione splancnica ( $\beta_2$ -blocco). Purtroppo, le resistenze vascolari intraepatiche ne sono scarsamente influenzate o, paradossalmente, aumentate. Uno studio sempre più approfondita della fisiologia vascolare epatica, ha permesso di ampliare la conoscenza delle modificazioni dinamiche che comportano l'aumento del tono vascolare intraepatico. In tal senso si è evidenziato che i meccanismi coinvolti determinano una produzione alterata di vasodilatatori/vasocostrittori e una risposta sbilanciata alla loro azione (9). Questi meccanismi sono principalmente innescati dalla mancanza microcircolatoria di ossido nitrico (NO) prodotto dalla eNOS (10) e la ridotta biodisponibilità di NO correla con un aumento dello stress ossidativo (11). Per tale ragione, sono stati utilizzati alcuni agenti antiossidanti nel tentativo di migliorare l'IP, ottenendo efficacemente la diminuzione del tono vascolare intraepatico (12). La tetraidrobiopterina (BH4), un cofattore essenziale degli enzimi NOS, ha dimostrato la sua capacità di ridurre l'IP e di migliorare l'emodinamica sistemica in ratti cirrotici (13). D'altra parte, il 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) appare altresì fortemente

coinvolto nella regolazione delle eNOS, proteggendo la BH4 dalla perdita ossidativa (14, 15). Recentemente, in una serie di 117 pazienti sottoposti a bypass coronarico, la supplementazione di 5-MTHF ha dimostrato di migliorare l'accoppiamento enzimatico della eNOS aumentando la biodisponibilità di BH4 nella parete vascolare (16). Un altro studio ha valutato gli effetti dell'acido folico sui vasi periferici, usando un trattamento ad alte dosi vs basse dosi di acido folico, e dimostrando che, già a basse dosi, l'acido folico migliora la funzione vascolare proprio attraverso la sua azione sulla eNOS e sullo stress ossidativo vascolare (17). Attualmente non è noto se il 5-MTHF possa avere lo stesso effetto sulla microcircolazione epatica.

## **2. Obiettivi dello studio**

### **Obiettivo primario dello studio:**

Valutare l'efficacia del trattamento per 3 mesi con 5-MTHF in associazione con propranololo rispetto a propranololo + placebo, in termini di riduzione dell'HVPG nei pazienti cirrotici con IP.

### **Obiettivi secondari dello studio:**

- a) Valutare la tollerabilità del 5-MTHF nei pazienti cirrotici con IP;
- b) Valutare se vi sia un miglioramento del tono vascolare intraepatico mediato dalla diminuzione dello stress ossidativo e dalla maggiore biodisponibilità di NO nei pazienti con cirrosi e IP, trattati per 3 mesi con propranololo + 5-MTHF rispetto a quelli trattati con propranololo + placebo).

## **3. Piano dello studio**

### **3.1 Disegno dello studio**

Si tratta di uno studio in doppio cieco, randomizzato, controllato con placebo, a gruppi paralleli, monocentrico, in pazienti affetti da cirrosi e ipertensione portale. Lo studio si articola in una fase di selezione ed in una di trattamento e prevede 2 bracci di trattamento:

- a. 30 pazienti verranno randomizzati a ricevere propranololo 40 mg b.i.d. (o la più alta dose tollerata di propranololo) + 5-MTHF 15 mg 1 cps/q.d., per 3 mesi
- b. 30 pazienti verranno randomizzati a ricevere propranololo 40 mg b.i.d. (o la più alta dose tollerata di propranololo) + placebo 1 cps/q.d. per 3 mesi.

Fase	Pre-randomizzazione	Randomizzazione	Trattamento in doppio cieco
Periodo	Selezione	Basale	
Settimana	-3 to-1	0	12 settimane
Visita	V1	V2	V3 (settimana 4), V4 (settimana 8), V5 (settimana 12)
Trattamento	Nessuno	Nessuno	a. 80 mg/die o la più alta dose tollerata di propranololo + 5-MTHF 15 mg/die vs. b. 80 mg/die o la più alta dose tollerata di propranololo + Placebo

### 3.2 Popolazione dello studio

La popolazione in studio è costituita da 60 pazienti ambulatoriali che soddisfino i seguenti criteri:

#### Criteri di inclusione

- Cirrosi epatica confermata dal punto di vista clinico, biochimico, di imaging (eco-doppler addome superiore, elastometria epatica). Nel caso di diagnosi dubbia è prevista l'esecuzione di esame istologico epatico
- HVPg  $\geq$  12 mmHg
- Presenza di varici esofagee che necessitino di profilassi del sanguinamento da rottura (come da indicazioni delle linee guida Baveno V [7])
- Età compresa tra i 18 e 80 anni
- Femmine e maschi
- Firma del consenso informato

#### Criteri di esclusione

- Presenza di epatocarcinoma al momento dell'arruolamento o nei 3 mesi precedenti
- Presenza di trombosi della vena porta al momento dell'arruolamento o nei 3 mesi precedenti
- Presenza di infezioni acute o condizioni compromettenti la stabilità emodinamica al momento dell'arruolamento o nel mese precedente
- Creatinina sierica  $>$  2,5 mg/dL al momento dell'arruolamento
- Bilirubina diretta  $>$  6 mg/dL al momento dell'arruolamento
- Controindicazioni ai beta-bloccanti al momento dell'arruolamento

- Donne in gravidanza e/o in allattamento al momento dell'arruolamento
- Nota o sospetta ipersensibilità al farmaco o alla classe farmacologica in studio
- Pazienti con gravi condizioni cliniche al momento dell'arruolamento che, a giudizio dello sperimentatore, controindicano la partecipazione del paziente allo studio
- Utilizzo di farmaci sperimentali negli ultimi 3 mesi prima dell'inclusione nello studio
- Trattamento per l'epatite C in atto al momento dell'arruolamento nello studio o nei 3 mesi precedenti
- Trattamento per l'epatite B intrapreso da meno di 3 mesi al momento dell'arruolamento

### **3.3 Trattamenti**

#### **Trattamento/i in studio**

Si tratta di uno studio randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco, nel quale i pazienti sono stati randomizzati in due gruppi di trattamento:

- a) Pazienti ai quali è stato somministrato il 5-MTHF in capsule al dosaggio di 15 mg, 1 volta al giorno per 3 mesi in associazione con il propranololo 40 mg due volte al giorno (dosaggio da aggiustare sino a ottenimento dell'adeguato beta blocco con bradicardia farmacologica, frequenza cardiaca target tra 50-68 bpm).
- b) Pazienti ai quali è stato somministrato il placebo in capsule, 1 volta al giorno per 3 mesi in associazione con il propranololo 40 mg due volte al giorno (dosaggio da aggiustare sino a ottenimento dell'adeguato beta blocco con bradicardia farmacologica, frequenza cardiaca target tra 50-68 bpm).

L'allestimento del medicinale sperimentale e del placebo è stata effettuata presso il Laboratorio Galenico della Farmacia Clinica dell'Azienda Ospedaliero-universitaria di Bologna Policlinico Sant'Orsola-Malpighi secondo le NBP FUI XII edizione attualmente in vigore, nel rispetto dei requisiti previsti dal DL 06/11/2007 n. 200.

Per il mascheramento del medicinale sperimentale le compresse di Prefolic® da 15 mg, acquistate dal commercio e contenenti N5-metiltetraidrofolato di calcio pentaidrato 19,18 mg pari a 15 mg di acido, vengono allestite e riconfezionate dal Laboratorio galenico in capsule di gelatina acido resistenti contenenti 15 mg di calcio mefolinato pentaidrato.



Per l'allestimento del placebo è utilizzato amido di riso RPH confezionato nelle stesse capsule di gelatina acido resistenti.

Il medicinale sperimentale e placebo sono stati preparati a lotti con l'utilizzo di un'orientatrice e opercolatrice automatiche con vassoio da 300 capsule.

Per allestire n. 300 capsule tipo 0 (0,68 ml) acido resistenti di calcio mefolinato (5-MTHF) 15 mg/placebo si procede come segue:

**CALCIO MEFOLINATO PENTAIDRATO 15 MG 300 CPS:**

- 300 compresse di PREFOLIC® 15 mg
- Amido di riso RPH q.b. a 204 ml
- 300 cps gelatina acido resistenti tipo 0

**PLACEBO 300 CPS:**

- Amido di riso RPH q.b. a 204 ml
- 300 cps gelatina acido resistenti tipo 0

Le compresse sono polverizzate meccanicamente mediante un apposito frullatore. Una volta ottenuta una polvere fine si versa in un idoneo cilindro nel quale si porta a volume (0.68 ml X 300 cps = 204 ml) con amido di riso in polvere; successivamente si versa la polvere in un apposito mortaio nel quale si effettua l'omogeneizzazione della polvere.

Si procede poi al riempimento delle capsule con incapsulatrice automatica Zuma con vassoio di 300 capsule. Si effettua sul lotto il controllo dell'uniformità di massa secondo F.U.

**Confezionamento:** in barattoli di polietilene contenente ciascuno 30 cps a cui si appone specifica etichetta. Per ogni paziente venivano forniti 3 barattoli contenenti 30 capsule ciascuno per un totale di 90 capsule di acido folico/placebo.

**Validità e conservazione:** in base alla validità dei componenti utilizzati e a quanto indicato dalle NBP si attribuisce la validità di 6 mesi dalla preparazione. La conservazione doveva essere effettuata ad una temperatura non superiore a 25°C.

### **Assegnazione del trattamento**

In occasione della visita **V1**, un unico codice identificativo è stato assegnato a ciascun paziente eleggibile. Il codice è costituito da iniziali del paziente affiancato da un numero progressivo.

Il codice è assegnato dal personale designato dallo sperimentatore del centro. Una volta assegnati, i codici dei pazienti che per qualsiasi motivo non continuano lo studio, non potevano più essere riutilizzati.

I pazienti con caratteristiche che rispettavano i criteri di inclusione e di esclusione sono stati randomizzati a uno dei trattamenti in studio, assegnati secondo la lista di randomizzazione generata da IDS. Ai pazienti è stato assegnato il codice di randomizzazione, partendo dal numero 501. Le informazioni relative alla lista di randomizzazione erano strettamente confidenziali e accessibili solo alle persone autorizzate fino al momento dell'apertura dei codici (che è avvenuta a fine studio dopo la chiusura del Data Base).

### **Terapie concomitanti**

Per evitare possibili bias sull'efficacia, non è stato ammesso durante lo studio, l'inizio di trattamenti con seguenti farmaci:

1. Qualsiasi farmaco beta-bloccante a eccezione del propranololo
2. Farmaci antivirali per il virus dell'epatite C (così come specificato nei Criteri di Esclusione)
3. Farmaci antivirali per il virus dell'epatite B (così come specificato nei Criteri di Esclusione)

Se durante lo studio si fosse reso clinicamente necessario introdurre uno dei suddetti farmaci, lo studio sarebbe stato interrotto dando precedenza a relative indicazioni cliniche.

### **Interruzione del trattamento**

Ogni paziente ha piena facoltà di interrompere la sua partecipazione allo studio in qualsiasi momento; inoltre, qualora si ritenga che sia di beneficio alla sua salute, la partecipazione del paziente allo studio potrà essere interrotta.

### **Aderenza al trattamento**

Ai pazienti è stato chiesto di consegnare a ogni visita ed al termine dello studio, tutto il farmaco/i in studio non utilizzato/i. La quantità di farmaco/i riconsegnata è stata

documentata. Lo sperimentatore ha verificato l'aderenza del paziente alla posologia prescritta. Sono stati esclusi dall'analisi i pazienti che non hanno assunto la terapia in studio per più di 4 giorni consecutivi (massimo 4 somministrazioni omesse consentite).

### 3.4. Visite e valutazioni

#### Schema delle visite e delle valutazioni

Previo ottenimento del consenso informato per la partecipazione allo studio, dopo una misurazione dell'HVPG, ai pazienti con HVPG  $\geq 12$ mmHg è stato misurato il flusso epatico ed eseguito il prelievo ematico per il dosaggio dei biomarcatori di biodisponibilità del NO. In seguito, i soggetti sono stati randomizzati 1:1 a ricevere il trattamento con propranololo + 5-MTHF o propranololo + placebo. Tre mesi dopo è stata ripetuta la misurazione dell'HVPG e del flusso epatico e il prelievo ematico con biomarcatori di biodisponibilità del NO.

Le visite potevano essere anticipata/posticipata di un massimo di 3 giorni.

Numero della visita	V0 Selezione e (gg -3/-1)	V1 Giorno 1 (basale)	V2 Sett 4	V3 Sett 8	V4 Sett 12	V5 Sett 4 follow-up (contatto telefonico)
Consenso informato	x					
Storia clinica/Terapie concomitanti	x	x	x	x	x	x
Misurazione HVPG	x				x	
EGDs	x					
Esame obiettivo	x	x	x	x	x	
Elastometria epatica	x				x	
Esami di laboratorio routinari* + test di gravidanza per donne in età fertile	x	x			x	
Dosaggi dei marcatori di biodisponibilità di NO (ADMA, omocisteina totale, BH4 e 5-MTHF)		x			x	
Criteri di incl./escl.	x	x		x		
Consegna del farmaco		x	x	x		
Resa del farmaco			x	x	x	
Eventi avversi		x	x	x	x	x

#### Visita di selezione (V0)

Prima di iniziare le procedura specifiche dello studio, il ricercatore doveva ottenere dal paziente il consenso informato scritto e firmato.

Le valutazioni di screening comprendevano:

- Valutazione dei criteri di inclusione/esclusione

- Esami di laboratorio (profilo ematochimico routinario per controlli periodici nei pazienti con cirrosi: emocromo completo+formula+conta piastrinica, PT/INR, creatinina,, natriemia, kaliemia, colesterolo, HDL, LDL, trigliceridi, glicemia, bilirubina, elettroforesi proteica, AST, ALT, GGT, fosfatasi alcalina, alfafetoproteina);
- visita clinica con esame obiettivo e valutazione di parametri vitali e antropometrici (PA, FC, peso corporeo);
- test di gravidanza per donne in età fertile.

### **3.5. Valutazioni di efficacia**

L'outcome primario è stato valutato come:

- riduzione assoluta media del valore di HVPG rispetto al valore basale nei gruppi di studio;
- riduzione percentuale media di HVPG rispetto al valore basale nei gruppi di studio;

L'outcome secondario è stato valutato come:

- miglioramento del tono vascolare epatico in termini di miglioramento del valore delle resistenze vascolari intraepatiche.

### **3.6. Valutazioni di sicurezza**

La valutazione della sicurezza del farmaco prevedeva il monitoraggio e la registrazione degli eventi avversi e degli eventi avversi seri e nel monitoraggio degli esami di laboratorio e dei segni vitali.

Per quanto possibile, ogni evento avverso è stato descritto in termini di livello di severità (lieve, moderato, grave), (livelli 1 - 4).

## **4. Gestione dei dati e analisi statistica**

### **4.1. Gestione dei dati**

Il personale designato dallo Sperimentatore ha riportato le informazioni richieste dal protocollo sulla Scheda Raccolta Dati (CRF).

Le informazioni relative ai trattamenti concomitanti sono state codificate mediante la WHO Drug Reference List, che usa il sistema di classificazione Anatomic Therapeutic Chemical

(ATC). Le patologie concomitanti e gli eventi avversi sono stati codificati usando la terminologia della classificazione ICD9.

## **4.2 Metodi statistici**

L'obiettivo di questo studio è valutare se vi sia una maggiore riduzione dell'HVPG nei pazienti cirrotici con IP trattati per 3 mesi con propranololo + 5-MTHF rispetto a quelli trattati con propranololo + placebo.

I dati raccolti sono stati raggruppati e riassunti rispetto alle variabili demografiche, alle caratteristiche basali e alle valutazioni di efficacia e sicurezza. Le analisi esplorative sono state effettuate utilizzando statistiche descrittive. I dati vengono presentati sia per la popolazione intention-to-treat (ossia tutti i pazienti che hanno assunto almeno una dose del farmaco di studio) che per la popolazione per-protocol (ossia tutti i pazienti che hanno completato lo studio senza violazioni maggiori del protocollo).

Sono inoltre state prodotte liste analitiche che riportano informazioni relative a:

1. numero di pazienti che hanno interrotto lo studio e relativi motivi;
2. numero di pazienti che hanno interrotto lo studio per eventi avversi;
3. numero di pazienti che hanno avuto eventi avversi seri;
4. numero di pazienti con valori di esami di laboratorio fuori dai range predefiniti.

I dati relativi alle caratteristiche demografiche e basali e alle osservazioni e misure di efficacia e sicurezza sono stati opportunamente riassunti. Le caratteristiche di somministrazione del farmaco in studio e degli altri trattamenti concomitanti sono stati riassunti, analogamente alle principali malattie concomitanti registrate all'ammissione in studio. Infine i pazienti che hanno interrotto lo studio sono stati elencati e sono stati descritti analiticamente i relativi motivi.

Le variabili continue sono riportate come media  $\pm$  deviazione standard, mentre le variabili categoriche sono riportate come frequenze (%). Il confronto dei gruppi per i dati continui è stato effettuato tramite Student t test o ANOVA, quando appropriato. I dati categorici infine sono stati confrontati mediante  $\chi^2$ . La significatività statistica è stabilita con valore  $P \leq 0.05$ .

#### ▪ **Dimensione del campione**

Lo studio è stato disegnato per dimostrare che l'effetto del propranololo+5-MTHF è superiore propranololo+placebo sulla variabile HVPG rilevata dopo 3 mesi dalla randomizzazione.

Non vi sono dati disponibili sulla modificazione dell'HVPG dopo la somministrazione di propranololo in associazione al 5-MTHF come profilassi del sanguinamento da varici esofagee nei pazienti cirrotici. Abbiamo ipotizzato che la riduzione dell'HVPG dopo l'aggiunta di 5-MTHF sarebbe stata del 10% maggiore rispetto al paziente trattato con propranololo in monoterapia. Ipotizzando una modificazione del 10% di HVPG in pazienti con propranololo+placebo e del 30% con propranololo associato a 5-MTHF, utilizzando un 2-tailed test con  $\alpha=0.05$  e  $\beta=0.20$ , con una potenza 80%, è stato calcolato un campione di 30 pazienti per gruppo.

## **5. Procedure amministrative**

### **Norme di Buona Pratica Clinica**

Questo studio è stato condotto in accordo ai principi della Good Clinical Practice [ICH Harmonized Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice 1996 Directive 91/507/EEC; D.M. 15.7.1997], alla dichiarazione di Helsinki ed alle normative nazionali in materia di conduzione delle sperimentazioni cliniche. Lo sperimentatore, firmando il protocollo, acconsente ad aderire alle procedure ed alle istruzioni in esso contenute ed a svolgere lo studio secondo GCP, la Dichiarazione di Helsinki e le normative nazionali che disciplinano le sperimentazioni cliniche.

Per partecipare allo studio, prima di essere sottoposto ad alcuna procedura studio-specifica, ogni paziente ha fornito il consenso informato scritto (vedi anche paragrafo 3.2 - Popolazione dello studio).

## **Procedure di emergenza per la sospensione della cecità**

Durante lo studio era disponibile una lista di codici di emergenza presso il Laboratorio Galenico della Farmacia Clinica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico Sant'Orsola-Malpighi. Presso il centro di sperimentazione erano inoltre disponibili buste sigillate contenenti all'esterno il numero random e all'interno l'informazione sul trattamento attribuito al paziente. La busta era a disposizione per essere aperta dallo Sperimentatore, solo in caso di emergenza e lo Sperimentatore doveva nel contempo documentare la ragione dell'apertura della busta, la data/ora dell'apertura e apporre la firma sulla busta aperta.

## **Gestione del farmaco di studio**

Il farmaco di studio è stato fornito dalla Farmacia Ospedaliera del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi sotto forma di flaconi contenenti 30 capsule di farmaco o placebo.

Lo Sperimentatore assicura che il farmaco in studio sia usato in conformità al protocollo.

Lo Sperimentatore e/o il farmacista e/o personale competente designato era responsabile della conservazione del farmaco in un luogo sicuro, con accesso limitato. Il farmaco è stato mantenuto in accordo alle condizioni di conservazione riportate sulla confezione.

## **6. Risultati**

In questo studio sono stati arruolati consecutivamente 60 pazienti in totale, randomizzati nei due gruppi di trattamento con 5-MTHF+betabloccante (30 pazienti) e con Placebo+betabloccante (30 pazienti). I dati clinici, biochimici e demografici al basale erano completi in 58 pazienti, mentre quelli emodinamici (epatici e sistemici) erano valutabili in 50 soggetti (4 soggetti non hanno acconsentito al cateterismo delle vene sovraepatiche di controllo, 2 soggetti non avevano il dato relativo al flusso epatico misurato mediante infusione dell'ICG al baseline e 2 alla procedura di fine studio; 1 paziente non ha soddisfatto la compliance al protocollo in quanto non ha assunto regolarmente il farmaco; 1 paziente ha sviluppato una lesione epatica sospetta con successiva diagnosi di HCC).

### ***Popolazione in studio al basale***

Le caratteristiche dei due gruppi al momento della randomizzazione, sono riassunte nella Tabella 1.

**Tabella 1 Caratteristiche della popolazione alla randomizzazione**

	<b>5-MTHF+bb (N=29)</b>	<b>Placebo+bb (N=29)</b>	<b>P</b>
<b>Sex Male no (%)</b>	19 (65.5%)	17 (62.1%)	0.787
<b>Age (years)</b>	63.3 ±10.2	60.3 ±10.9	0.281
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.5±3.5	28.3±4.4	0.103
<b>Child score no. (%)</b>			0.728
<b>A</b>	23 (85.2%)	21 (80.8%)	
<b>B</b>	4 (14.8%)	5 (19.2%)	
<b>MELD</b>	9.4	8.5	0.288
<b>Etiology no. (%)</b>			0.088
<b>HCV</b>	18 (62.1%)	14 (50.0%)	
<b>Alcohol</b>	2 (6.9%)	0 (0%)	
<b>HBV</b>	1 (3.4%)	5 (17.9%)	
<b>NASH</b>	2 (6.9%)	5 (17.9%)	
<b>HDV</b>	2 (6.9%)	1 (3.6%)	
<b>Crypto</b>	2 (6.9%)	0 (0%)	
<b>Various</b>	2 (6.9%)	3 (10.7%)	
<b>Creatinine (mg/dl)</b>	0.9±0.3	0.8±0.2	0.280
<b>Sodium plasma (mEq/l)</b>	138.2±2.3	138.3±	0.809
<b>Total bilirubin (mg/dl)</b>	1.3±0.8	1.2±0.6	0.657
<b>Albumin (g/dl)</b>	4.0±0.5	3.8±0.4	<b>0.049</b>
<b>INR</b>	1.2±0.1	1.2±.1	0.418
<b>Platelets x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	108.3±42.7	104.9±53.1	0.794
<b>MCV (fl)</b>	89.1±4.6	87.0±8.9	0.794
<b>Oesophageal varices no. (%)</b>			0.389
<b>Small</b>	19 (65.5%)	20 (76.9%)	
<b>Medium/large EV</b>	10 (34.5%)	6 (23.1%)	
<b>Previous variceal bleeding no (%)</b>	2 (8.0%)	2 (6.9%)	1
<b>Gastric varices no. (%)</b>	2 (8.3%)	5 (20.8%)	0.416
<b>Actual ascitis (%)</b>	2 (7.7%)	1 (3.6%)	0.604
<b>Previous ascitis (%)</b>	9 (39.1%)	6 (25.0%)	0.742
<b>Liver stiffness (kPa)</b>	26.4±14.4	27.4±12.0	0.786

I due gruppi risultavano adeguatamente bilanciati in termini di caratteristiche demografiche (età, sesso, BMI) e dei parametri di funzionalità epatica (Child score e MELD score).

L'etiologia prevalente nei due gruppi era l'HCV (18 pazienti, 62.1% nel gruppo 5-MTHF+betabloccante vs 14 pazienti, 50.0% nel gruppo placebo+betabloccante, p=0.088).

La maggior parte dei pazienti nei due gruppi presentava varici esofagee di piccole dimensioni (19 pazienti, 65.5% nel gruppo MTHF+betabloccante vs 20 pazienti, 76.9% nel gruppo placebo+betabloccante, p=0.389).

Solo il 7.7% dei pazienti nel gruppo di trattamento presentava ascite obiettivabile all'arruolamento contro il 3.6% dei pazienti nel gruppo placebo (p=0.604), mentre il 39.1%



dei pazienti nel gruppo 5-MTHF e il 25.0% nel gruppo placebo (p=0.742), aveva una storia di pregresso versamento ascitico.

Infine il valore medio di stiffness all'elastometria con FibroScan® era di 26.4±14.4 kPa nel gruppo trattato con 5-MTHF+betabloccante e di 27.4±12.0 kPa nel gruppo placebo+betabloccante (p=0.786), dunque un valore compatibile con cirrosi epatica e ipertensione portale clinicamente significativa (24).

Le caratteristiche emodinamiche dei due gruppi al momento dell'arruolamento, sono riportate nella tabella 2.

Tra il gruppo 5-MTHF e il gruppo placebo, non vi erano differenze statisticamente significative, in particolar modo il valore di HVPG medio del gruppo di trattamento risultava 16.2 mmHg (SD 5.56) vs 15.6 mmHg (SD 3.32) nel gruppo placebo (p=0.571).

**Tabella 2. Caratteristiche emodinamiche della popolazione alla randomizzazione**

Media (Standard Deviation))	5-MTHF+bb (N=25)	Placebo+bb (N=25)	P
RA (mmHg)	3.3, SD 2.1	3.5, SD 2.1	0.537
HR (b·min)	67.5, SD 7.01	69.3, SD 6.1	0.309
MAP (mmHg)	92.0, SD 7.12	93.0, SD 8.0	0.615
IVC (mmHg)	5.7, SD 2.62	6.25, SD 2.6	0.451
WHVP (mmHg)	22.6, SD 5.56	22.6, SD 4.26	0.950
FHVP (mmHg)	7.2, SD 4.08	7.2, SD 2.90	0.948
HVPG (mmHg)	16.2, SD 3.79	15.6, SD 3.32	0.571
HBF (L/min)	0.76, SD 0.86	0.72, SD 2.42	0.924
HC (mL/min)	268.4, SD 268.49	908.52, SD 2764.61	0.255
HSR (dyne·s·cm <sup>-5</sup> )	4792.5, SD 5248.1	5850.9, SD 6284.3	0.789

### ***Cambi emodinamici e di elastometria epatica nei gruppi dopo 90 giorni di trattamento***

Le modificazioni emodinamiche percentuali valutate dopo 90 giorni dall'inizio del trattamento con propranololo+5-MTHF vs propranololo+placebo, sono riportati nella tabella 3.

In entrambi i gruppi si evidenzia una riduzione del valore dell'HVPG rispetto al valore basale, ma la modificazione risultava significativamente maggiore nel gruppo trattato con 5-MTHF rispetto al gruppo placebo (20.8%, SD 15.4 nel gruppo 5-MTHF vs 9.2%, SD 21.3 nel gruppo placebo; p=0.033).

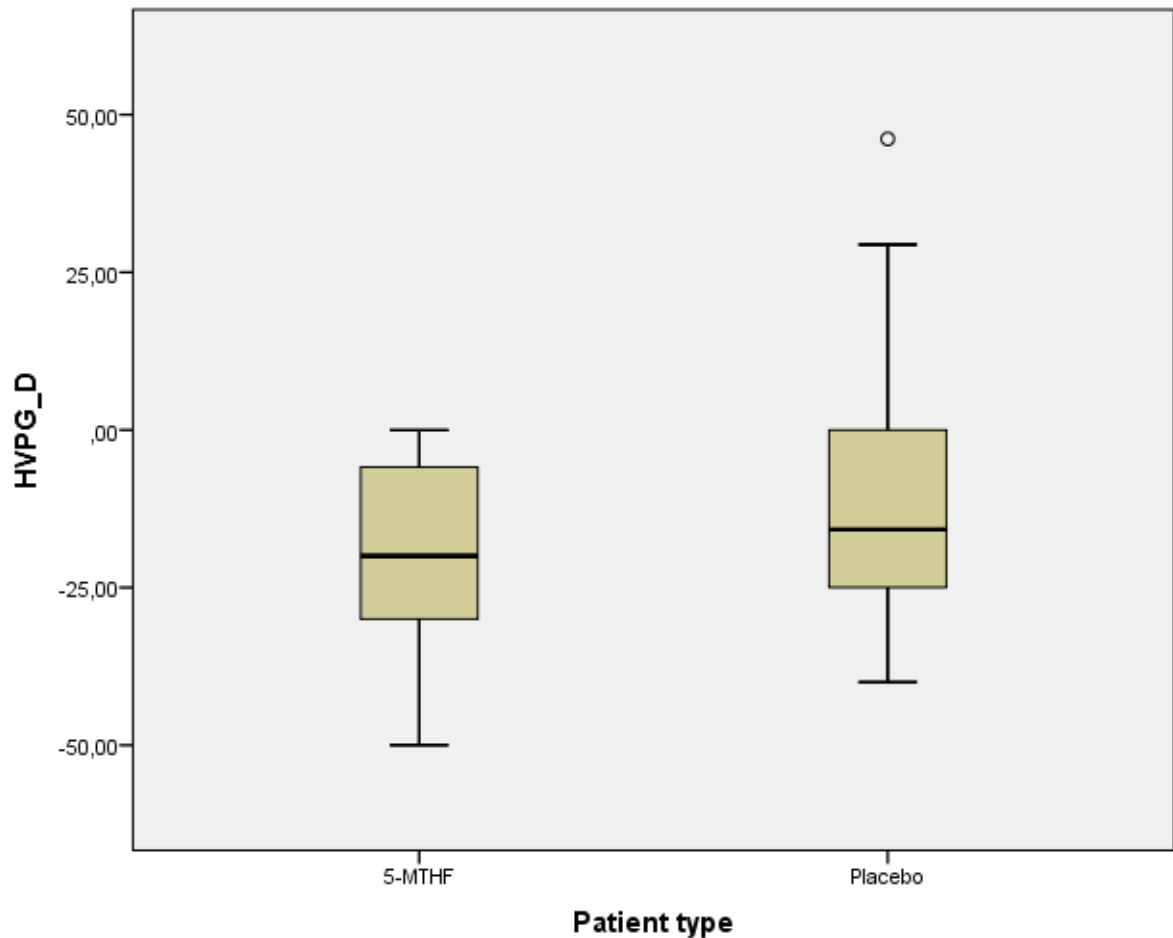
Analogamente si evidenziava una riduzione ai limiti della significatività del valore dell'elastometria misurata con FibroScan® (21.8%, SD 34.7 nel gruppo 5-MTHF vs 4.4%, SD 32.5 nel gruppo placebo, p=0.064).

**Tabella 3. Modificazioni emodinamiche percentuali dopo 90 giorni di trattamento con propranololo+5-MTHF/placebo**

mean% ± SD	5-MTHF+bb (N=25)	Placebo+bb (N=25)	P
<b>HR (b·min)</b>	-10.8, SD 9.5	-10.3, SD 9.3	0.868
<b>MAP(mmHg)</b>	-0.6, SD 7.7	-0.59, SD 8.5	0.591
<b>PAD (mmHg)</b>	-48.6, SD 119.2	-56.5, SD110.0	0.809
<b>IVC (mmHg)</b>	-16.2, SD 60.8	-19.0, SD 57.6	0.869
<b>WHVP (mmHg)</b>	-2.2, SD 3.7	-1.2, SD 3.8	0.381
<b>FHVP (mmHg)</b>	-20.9, SD 73.4	-17.1, SD 49.8	0.838
<b>HVPG (mmHg)</b>	-20.8, SD 15.4	-9.2, SD 21.3	<b>0.033</b>
<b>HBF (L/min)</b>	-381.5, SD 1301.3	3025.5, SD 14256	0.288
<b>HC (mL/min)</b>	-201.4, SD 638.6	672.5, SD 2994.5	0.488
<b>IHVR (dyne·s·cm<sup>-5</sup>)</b>	-72.0, SD 913.6	-28.7, SD 125.3	0.169
<b>Liver stiffness (kPa)</b>	-21.8, SD 34.7	-4.4, SD 32.5	0.064

Nella figura 1 si evidenzia la riduzione del valore di HVPG, presente come atteso in entrambi i gruppi di trattamento ma significativamente maggiore nel gruppo che ha ricevuto propranololo+5MTHF rispetto al gruppo di pazienti che hanno assunto propranololo+placebo.

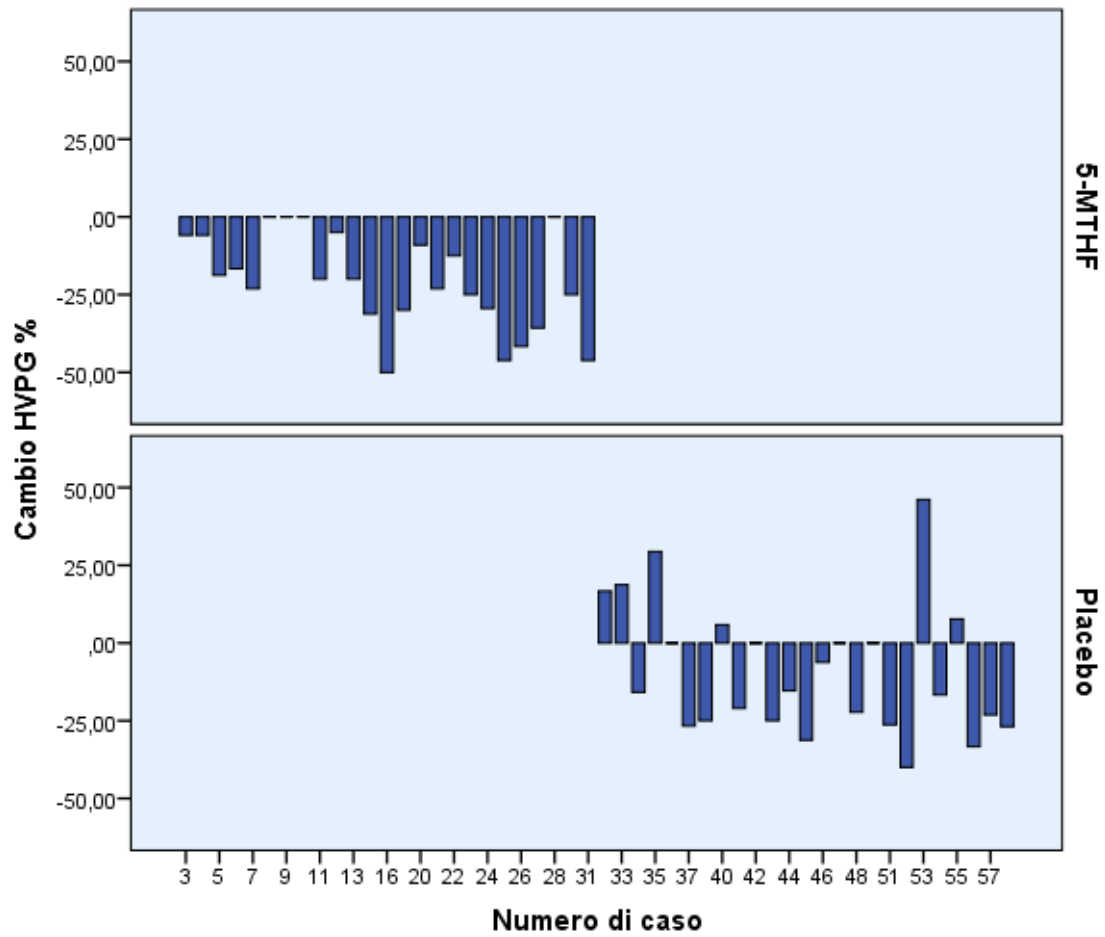
**Figura 1. Box plot delle modificazioni percentuali del valore di HVPG dopo 90 giorni di trattamento con propranololo+5-MTHF/placebo**



Nella figura 2 è stata analizzato il comportamento dei singoli pazienti appartenenti ai due gruppi, in termini di modificazione del valore di HVPG.

Mentre in entrambe le popolazioni ci sono pazienti che non presentano alcuna modificazione del valore di HVPG rispetto al basale (non responder), nel gruppo trattato con propranololo+5-MTHF, non vi è stato alcun paziente con incremento del valore di HVPG, mentre un peggioramento dell' HVPG rispetto al basale è stato riscontrato in 6/25 (24%) pazienti trattati con propranololo+placebo.

**Figura 2. Variazioni percentuali per singolo paziente del valore di HVPG dopo 90 giorni di trattamento con propranololo+5-MTHF/placebo**



## 7. Discussione

L'ipertensione portale nella cirrosi è determinata dall'interazione tra il flusso portale e le resistenze vascolari intraepatiche, seguita dalla vasodilatazione splancnica e dalla formazione di collaterali porto-sistemici con la conseguente insorgenza di una circolazione iperdinamica. Oltre alle alterazioni strutturali tipiche del fegato cirrotico, le modificazioni dinamiche dovute all'alterata produzione e suscettibilità verso fattori ad azione vasodilatatoria e vasocostrittoria, contribuiscono ad aumentare le resistenze vascolari intraepatiche. Il meccanismo più rilevante sembra essere correlato alla carenza di ossido nitrico (NO) nella microcircolazione epatica. L'attuale trattamento farmacologico dell'ipertensione portale comprende  $\beta$ -bloccanti che agiscono riducendo l'afflusso portale, ma hanno scarso effetto sulle resistenze intraepatiche. Il 5-metil-tetraidrofolato (5-MTHF), la principale forma di acido folico circolante, ha dimostrato di migliorare la funzione endoteliale, sia arteriosa periferica, che venosa, aumentando la biodisponibilità dell'NO e diminuendo di conseguenza lo stress ossidativo.

Questo studio ha avuto come obiettivo quello di esaminare se l'aggiunta di 5-MTHF al propranololo permettesse una maggiore riduzione della pressione portale, potenziando l'efficacia e in virtù del suo effetto sulle resistenze vascolari intraepatiche.

Abbiamo eseguito l'analisi descrittiva della popolazione dello studio che conferma un buon bilanciamento dei gruppi in studio, in termini di eziologia, caratteristiche cliniche e conferma il rispetto dei criteri di inclusione ed esclusione previsti dal protocollo.

L'analisi di confronto tra il gruppo di trattamento e il gruppo placebo mostra una differenza statisticamente significativa in termini di entità di riduzione del gradiente pressorio porto-epatico, confermando il raggiungimento dell'outcome primario dello studio.

Questo dato rappresenta una novità in letteratura focalizzata sul trattamento dell'ipertensione portale e offre un eccellente spunto per l'approfondimento delle conoscenze sulla fisiopatologia dell'ipertensione portale. Costituisce anche la base per il disegno di nuovi protocolli, volti a validare il presente studio di proof-of-concept, questa volta in contesti multicentrici, su coorti più ampie ed eventualmente con dosaggi differenti di 5-MTHF ovvero con altre formulazioni disponibili di acido folico.

D'altro lato, l'analisi di confronto tra il gruppo di trattamento e il gruppo placebo, mostra anche una marcata tendenza statistica, in termini di differente entità nella riduzione delle resistenze vascolari intraepatiche (IHVR), confermando il possibile meccanismo di ottimizzazione dell'effetto ipotensivo portale del 5-MTHF, effetto che riteniamo si realizzi attraverso un'azione sul tono vascolare intraepatico additiva all'effetto del propranololo. Quest'aspetto di grande interesse, è meritevole di un'ulteriore analisi mediante il dosaggio di marcatori di biodisponibilità di NO e sarà oggetto di un successivo sottostudio a sé stante.

Pur non essendoci ancora dati derivanti dal progetto e di cui si possa ritenere adeguato l'inserimento in linee guida e documenti di indirizzo, tale impatto può essere ragionevolmente ipotizzato e auspicato, qualora gli outcome mostrati in questo lavoro venissero confermati da studi di validazione.

I risultati di questo studio potranno dare un contributo determinante nel progresso del trattamento dell'ipertensione portale. I costi globali della gestione dell'emorragia da varici sono estremamente alti, trattandosi di un evento clinico acuto che richiede sempre l'ospedalizzazione, interventi endoscopici diagnostici/terapeutici urgenti, uso di farmaci vasoattivi ad alto costo, ricorso a trasfusioni di sangue ed emoderivati e, talvolta, il posizionamento, come trattamento *rescue*, di uno shunt transgiugulare intraepatico portosistemico (TIPS) (25).

I risultati del presente progetto apriranno un nuovo scenario nella gestione della profilassi del sanguinamento da varici esofagee nei pazienti cirrotici con HVPG $\geq$ 12mmHg, mediante un approccio farmacologico innovativo, a basso costo, ben tollerato e con dimostrata azione sull'efficacia sinergica con l'attuale standard di cura.

Una volta validati, la trasferibilità dei risultati ad altri centri epatologici sarà semplice, trattandosi di un farmaco maneggevole e molto ben tollerato. Infatti, nel presente studio non è stato rilevato nessun evento avverso potenzialmente in relazione con il farmaco sperimentale.

I risultati del presente studio, una volta validati anche su coorti più ampie, saranno ampiamente applicabili su qualsiasi eziologia della cirrosi epatica complicata da ipertensione portale clinicamente significativa.

La cirrosi epatica rappresenta un importante problema di salute e il vantaggio dell'utilizzo di una nuova strategia terapeutica ben tollerata e accessibile, potrà essere rilevante grazie al migliore controllo dell'ipertensione portale con una presumibile riduzione delle spese dipendenti dalla morbilità, dall'ospedalizzazione, da procedure/trattamenti ad alto costo e soprattutto da un miglioramento della sopravvivenza.

In conclusione, i dati ottenuti da questo studio prospettico, randomizzato in doppio cieco, controllato con placebo dimostrano l'efficacia del 5-MTHF come trattamento sinergico ai betabloccanti non-cardioselettivi nel setting dell'ipertensione portale cirrotica. Questo dato è di grande stimolo per disegnare studi di validazione che rafforzino l'indicazione all'utilizzo del 5-MTHF nella pratica clinica in pazienti cirrotici con HVPG  $\geq 12$ mmHg. Infine, i presenti dati forniscono una base clinica, per esplorare ulteriormente l'impatto, nel metabolismo epatico, dei folati e sui pathway della fisiopatologia dell'ipertensione portale sinusoidale.

La conduzione del presente studio è stata possibile grazie al finanziamento ricevuto dal Bando Programma Regione-Università 2010-2012, Bando Giovani Ricercatori "Alessandro Liberati" 2012 – PI titolare fondi: dott.sa Ranka Vukotic.



## 8. Bibliografía

1. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *J Hepatology* 2006;44:217-231.
2. Groszmann R, Wongcharatrawee S. The hepatic venous pressure gradient. Anything worth doing should be done right. *Hepatology* 2004;39:280–282.
3. Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace ND, Burroughs AK, Planas R et al. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:2254–2261.
4. Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, Grace N, Burroughs A, Planas R et al. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2007 Aug;133(2):481-488.
5. Merkel C, Bolognesi M, Sacerdoti D, Bombonato G, Bellini B, Bighin R et al. The hemodynamic response to medical treatment of portal hypertension as a predictor of clinical effectiveness in the primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhosis. *Hepatology* 2000;32(5):930-934.
6. Abraldes JG, Tarantino I, Turnes J, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. *Hepatology* 2003;37(4):902-908.
7. de Franchis R. Revising consensus in portal hypertension: Report of the Baveno V consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol* 2010;53:762–768.
8. D'Amico G, García-Pagán JC, Luca A, Bosch J. Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review. *Gastroenterology* 2006;131:1611–1624.
9. Bosch J. Vascular Deterioration in Cirrhosis - The Big Picture. *J Clin Gastroenterol* 2007;41:S247–S253.
10. Wiest R and Groszmann R. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002 35(2):478-491.
11. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008;47:1248-1256.
12. Bosch J, Abraldes JG, Fernández M, García-Pagán JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatology* 2010;53:558–567
13. Matei V, Rodríguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, García-Calderó H, Fernández M, Bosch J, Garcia-Pagán JC. Three-day tetrahydrobiopterin therapy increases in vivo hepatic NOS activity and reduces portal pressure in CCl4 cirrhotic rats. *J Hepatology* 2008;49:192-197.
14. Alp NJ and Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:413-420.
15. Schmidt TS and Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clinical Science* 2007;113:47-63.
16. Antoniadou C, Shirodaria C, Warrick N, Cai S, de Bono J, Lee J et al. 5-Methyltetrahydrofolate Rapidly Improves Endothelial Function and Decreases Superoxide Production in Human Vessels: Effects on Vascular Tetrahydrobiopterin Availability and Endothelial Nitric Oxide Synthase Coupling. *Circulation* 2006;114(11):1193-1201.

17. Shirodaria C, Antoniades C, Lee J, Jackson CE, Robson MD, Francis JM et al. Global Improvement of Vascular Function and Redox State With Low-Dose Folic Acid: Implications for Folate Therapy in Patients With Coronary Artery Disease *Circulation* 2007;115(17):2262-70.
18. Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway. Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2001;104:2569–2575.
19. Leeming RJ, Pollock A, Melville LJ, Hamon CG. Measurement of 5-methyltetrahydrofolic acid in man by high-performance liquid chromatography. *Metabolism*. 1990;39:902–904
20. Steinlauf AF, Garcia Tsao G, Zakko MF, Dickey K, Gupta T and Groszmann RJ. Low-dose midazolam sedation: an option for patients undergoing serial hepatic venous pressure measurements. *Hepatology* 1999;29(4):1070-3.
21. Turnes J, Hernández-Guerra M, Abrales JG, Bellot P, Oliva R, García-Pagán JC, Bosch J. Influence of beta-2 adrenergic receptor gene polymorphism on the hemodynamic response to propranolol in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2006 Jan;43(1):34-41.
22. Faizi AK, Kornmo DW, Agewall S. Evaluation of Endothelial Function Using Finger Plethysmography. *Clin Physiol Funct Imaging* 2009. Sep;29(5):372-5.
23. Bonetti PO et al. Research Highlights – editorial review of A Non-invasive Test for Endothelial Dysfunction. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2005; 2: 64-65.
24. Procopet B and Berzigotti A. Diagnosis of cirrhosis and portal hypertension: imaging, non-invasive markers of fibrosis and liver biopsy. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2017 May;5(2):79-89.
25. García-Pagán JC, Caca K, Bureau C, Laleman W, Appenrodt B, Luca A, Abrales JG, Nevens F, Vinel JP, Mössner J, Bosch J; Early TIPS (Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt) Cooperative Study Group. Early use of TIPS in patients with cirrhosis and variceal bleeding. *N Engl J Med*. 2010 Jun 24;362(25):2370-9.